

PATENTE DE INVENCION

403655

Case W266.

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA ESTABILIZAR UN PREPARADO ENZIMATICO
MICROBIAL DEL CUAJO DE LA LECHE.

=====

Solicitante BAXTER LABORATORIES, INC., entidad norteamericana,
residente en 6301 North Lincoln Avenue, Morton Grove,
Illinois, EE.UU. de A.

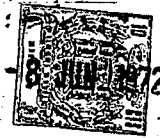
=====

Int. Cl.: C12D//A23C

Esta invención se relaciona con un procedi-
miento para preparar una nueva enzima microbial de
cuajo de leche. Más particularmente, la invención se
relaciona con un procedimiento para preparar una enzima
5. estabilizada de la coagulación de la leche, obtenida a

403655

- 2 -



partir del caldo de cultivo del microorganismo Mucor miehei.

5. La presente invención proporciona un preparado de enzima microbial, estabilizada, del cuajo de la leche, que comprende el producto sólido enzimático recuperado del caldo de fermentación de Mucor miehei mezclado con un 2 a un 3 % en peso, aproximadamente, de monoésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitan con 12 a 22 átomos de carbono aproximadamente en la mitad de ácido
10. graso y una media de 20 unidades oxietileno por molécula, aproximadamente.

15. La presente invención proporciona también un procedimiento para estabilizar un preparado de enzima microbial del cuajo de la leche, que comprende mezclar el producto sólido enzimático, recuperado del caldo de fermentación de Mucor miehei, con 2 a 3 % en peso, aproximadamente, de monoésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitan con 12 a 22 átomos de carbono aproximadamente en la mitad de ácido graso y una media de 20
20. unidades oxietileno por molécula aproximadamente.

25. El procedimiento convencional para fabricar queso implica el empleo de cuajo para coagular la leche. El cuajo es un preparado enzimático obtenido generalmente del cuarto estómago de vaquillas alimentadas con leche. En el procedimiento de fabricación del queso, el cuajo
30. se añade a la leche y la enzima, ejerce acción suavemente proteolítica sobre la caseína y otras proteínas presentes en la leche. Esta rotura de las proteínas provoca la coagulación de la leche y la formación de cuajadas sólidas. Estas cuajadas o requesones se separan del suero,



el cual es predominantemente una suspensión acuosa de bajo contenido en sólidos. A continuación, las cuajadas se mezclan con sal, etc. y se conforman en bloques o redondos, curándose luego para formar los quesos.

5. A causa del origen animal particular del cuajo, el suministro y calidad del cuajo está sometido a amplias fluctuaciones. A la vista de estos factores variables, los investigadores de este campo han intentado encontrar unos sustitutos de los cuajos para la fabricación de los
10. quesos, que sean naturalmente adecuados. Recientemente, se ha encontrado que el microorganismo Mucor miehei posee un empleo significativo para la producción de cuajo microbial de buena calidad. Dicho empleo se describe, por ejemplo, en las patentes británicas Nos. 1.108.287
15. y 1.207.892 y en la patente USA No. 3.549.390. Una descripción más completa del microorganismo Mucor miehei puede encontrarse en el tratado de Cooney y Emerson, "Thermophilic Fungi", págs. 17-27 (1964), publicado por W.H. Freeman y Co., San Francisco y Londres.
20. La producción de cuajo microbial de acuerdo con las patentes antes mencionadas, comprende generalmente la inoculación de un medio nutriente con un cultivo seleccionado de Mucor miehei, la incubación bajo condiciones de fermentación aeróbicas junto con unas condiciones adecuadas de pH, tiempo y temperatura, efectuándose de nuevo la recuperación del cuajo resultante a partir del caldo de fermentación.
25. En la patente británica Nº 1.207.892, un procedimiento preferido para la recuperación del producto
30. de cuajo, comprende la precipitación con sal o con disol-

403655

- 4 -



5. vente del caldo de fermentación y la recuperación de un polvo blanco, fino, concentrado. A pesar de que este polvo tiene un nivel de estabilidad aceptable, con frecuencia es más deseable preparar el cuajo disponible en forma de líquido. Sin embargo, el material pulverulento no contribuye por sí mismo a la facilidad de manipulación o preparación de un producto líquido, como sería deseable; es decir, el polvo tiende a espolvorearse y no posee la solubilidad óptima.

10. De acuerdo con la presente invención, se prepara un cuajo microbial estabilizado a partir de Mucor miehei mediante mezcla del producto sólido enzimático, recuperado del caldo de fermentación, con un 2 a un 3 % en peso, aproximadamente, de monoésteres de ácidos grasos de polioxi-
15. etilen-sorbitan. Los ésteres empleados en la invención tienen de 12 a 22 átomos de carbono aproximadamente en la mitad de ácido graso y una media de 20 unidades oxietileno por molécula, aproximadamente. Estos ésteres se encuentran disponibles en el comercio bajo la marca registrada "Tween"
20. y su método de preparación se describe detalladamente en la patente USA No. 2.380.166.

25. Es importante una mezcla de la cantidad establecida del éster con el producto sólido enzimático de la fermentación de Mucor miehei; el empleo de una cantidad inferior al 2 % aproximadamente del éster no proporciona la facilidad deseada de manipulación desde el punto de vista de espolvoreado y solubilidad en solución acuosa, mientras que el empleo de una cantidad superior al 3 % aproximadamente del éster produce un producto sólido que
30. está demasiado humedecido y apelmazado y que es difícil

403655

- 5 -

- 8 JU



por otra parte de manejar o almacenar.

El monoéster de polioxietilen-sorbitan preferido, para mezclarse con el producto de cuajo seco, es el monooleato de polioxietilen (20) sorbitan ("Tween 80").

5. Esta sustancia tiene un equilibrio óptimo de mitades hidrófilas y lipófilas en la molécula, para mezclarse con el producto enzimático microbial de cuajo, de acuerdo con los objetivos de la presente invención.

10. El producto de cuajo seco que puede ser estabilizado de acuerdo con la presente invención, puede comprender el caldo de cultivo filtrado y precipitado que se obtiene a partir de una fermentación adecuada, tal y como se describe, por ejemplo, en la patente británica Nº 1.207.892, o puede comprender, por ejemplo, productos
15. similares que han sido concentrados o secados adicionalmente, tal como mediante secado en vacío, secado por congelación, secado por aspersion y procedimientos de secado análogos.

20. En general, la fermentación se realiza por inoculación de un medio que contiene carbono, nitrógeno y trazas de nutrientes, disponibles, con un caldo seleccionado de Mucor miehei y la fermentación, bajo condiciones aeróbicas sumergidas, a un pH de 3 a 8 aproximadamente y a una temperatura de 30 a 55°C aproximadamente, durante 2 a 14 días aproximadamente. El cuajo se recupera
25. preferiblemente a partir del caldo de fermentación mediante precipitación con un disolvente orgánico, tal como una cetona de bajo peso molecular, por ejemplo, acetona o metiltilcetona, o un alcohol de bajo peso molecular,
30. por ejemplo, metanol o etanol. Cualquier lipasa residual

403655

- 6 -



indeseada existente en el producto se inactiva preferiblemente mediante un ajuste temporal a un pH inferior a 3 aproximadamente y a una temperatura superior a 40°C aproximadamente, durante por lo menos 60 minutos aproximadamente.

5.

Las cepas preferidas de Mucor miehei que son empleadas en la invención, se encuentran disponibles al público, sin restricción alguna, bajo las designaciones codificadas NRRL A13.131 y A13.042 en Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois.

10.

Podrá apreciarse que el preparado de enzima estabilizada de cuajo, de esta invención, puede contener también, para sus efectos deseados, menores cantidades de aditivos convencionales de los cuajos, por ejemplo, sales tales como cloruro sódico, inhibidores del moho y agentes preservativos tales como ácido sórbico, sorbato potásico o benzoato sódico y otras sustancias no tóxicas compatibles con los cuajos.

15.

Cuando se utiliza en forma líquida, el preparado enzimático está contenido preferiblemente en una solución de base acuosa que contiene aproximadamente 17,5 % de cloruro sódico y aproximadamente 2,5 % de propilenglicol.

20.

Para los expertos en la técnica, serán evidentes otros aditivos que pueden ser incorporados en el preparado enzimático de cuajo de la presente invención, a partir de la presente Memoria y reivindicaciones adjuntas.

25.

Los siguientes ejemplos ilustrarán adicionalmente esta invención si bien ha de entenderse que dichos ejemplos específicos no intentan limitar en modo alguno

30.

403655

- 7 -



la presente invención.

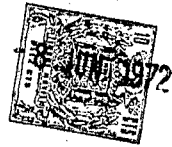
- Tal como se emplea en esta Memoria, el término SRA significa la actividad standard del cuajo. La SRA de un producto de cuajo se define como el número de unidades de cuajo por gramo del producto basado en un extracto de cuajo standard comercialmente disponible, conocido como cuajo de queso de Chris Hansen. Este extracto de cuajo standard, que es un cuajo de vaca, es asignado con un valor SRA de 100. Por lo tanto, una unidad de cuajo es la actividad de 10 mg de extracto de cuajo standard. Las condiciones de ensayo comprenden la incubación del producto de cuajo a 25°C en un sustrato consistente en 10 % de sólidos de leche seca no grasa en cloruro cálcico acuoso 0,01 molar.

15. EJEMPLO 1

Se transfiere el microorganismo Mucor miehei, NRRL A13.042 desde una placa inclinada de agar, bajo condiciones estériles, al interior de un matraz Fernbach de 1 litro, que contiene 200 mm del siguiente medio acuoso:

20.	Harina de soja (Nutrisoy 300 c.)	1,5 %
	Suero seco	3,0 %
	Almidón de maíz degradado	12,0 %
	Agua	83,5 %
25.		<hr/>
		100,0 %

- El matraz se incuba en un sacudidor rotativo a 37°C durante 114 horas. El caldo de fermentación se filtra y el filtrado muestra una actividad igual a 125 SRA. A continuación, se evapora el filtrado a un 15-20 % aproxima-



- damente de su volúmen. El evaporado concentrado se ajusta entonces a un pH de 2,6 con ácido clorhídrico 0,1 N y se calienta entonces a 44°C, manteniéndose a esta temperatura durante 90 minutos. El pH se reajusta a 4, el producto se precipita con metanol y el disolvente se evapora, obteniéndose un polvo de cuajo libre de lipasas que tiene una actividad de 1.000 SRA. El polvo blanco fino se mezcla entonces con 2 % en peso de monooleato de polioxietilen (20) sorbitan. Esta mezcla es estable en el almacenamiento, está libre de polvo y es fácilmente soluble en solución acuosa. Como tal, su facilidad de manejo es sustancialmente superior a la del polvo original.
- 5.
- 10.

- Una muestra de la mezcla sólida libre de polvo se disuelve fácilmente en una solución acuosa que contiene 17,5 % de cloruro sódico y 2,5 % de propilenglicol. La actividad del cuajo de esta solución final es igual a 115 SRA. Como agentes preservativos se añaden sorbato potásico (1 %) y benzoato sódico (1/8 de 1 %).
- 15.

- Se prepara un queso sustituyendo el preparado de cuajo normalmente empleado en la etapa de sedimentación, por una cantidad equivalente del producto de cuajo microbial, líquido, preparado anteriormente. En este procedimiento, se ajusta a 30-31°C, leche pasteurizada, y se añade 1 % en peso de una solución de partida de ácido láctico, comercial. El cuajo microbial se añade entonces a la leche en una proporción de 56,7 a 113,4 g por 450 kg de leche. La mezcla se incuba hasta que se obtiene una cuajada o requesón con una firmeza satisfactoria. La cuajada se corta en cubos y se cuece entonces a 37,6°C durante varias horas. La cuajada se separa del suero y se
- 20.
- 25.
- 30.

403655

- 9 -



- apila en láminas. La cuajada molturada se salifica entonces con un 3 % en peso de sal de queso. La cuajada sólida se transfiere a unos aros, se prensa y se coloca entonces en la habitación de curado. El queso fabricado a partir del cuajo microbial de este ejemplo se corta en muestras, periódicamente, después de varios días de curado, encontrándose que poseen una excelente calidad y que están esencialmente libres de malos olores.
- 5.

EJEMPLO 2

10. Se repite el ejemplo 1 excepto que la cepa de Mucor miehei designada con NRRL A13.131, es sustituida por una cepa designada con A13.042. Se obtienen unos resultados de buena calidad, estabilidad y manejo como en el ejemplo 1.

15. EJEMPLO 3

- Se repiten los ejemplos 1 y 2 excepto que el monooleato de polioxietilen (20) sorbitan empleado en dichos ejemplos, se sustituye por monoestearato de polioxietilen (20) sorbitan. Al igual que en los ejemplos 1 y 2 se obtienen buenos resultados de calidad, estabilidad y manejo.
- 20.

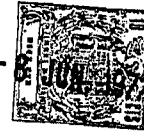
N O T A

=====

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Norteamérica con el No. de Ser. 151.992 de 10 de junio de 1971, acogiéndose por lo
- 25.
- 30.

403655

- 10 -



tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA ESTABILIZAR UN PREPARADO ENZIMÁTICO MICROBIAL DEL CUAJO DE LA LECHE; caracterizándose por lo siguiente:

5. 1.- Procedimiento para estabilizar un preparado enzimático microbioal del cuajo de la leche, caracterizado porque comprende mezclar el producto enzimático sólido, recuperado del caldo de fermentación de Micor miehei, con 2 a 3 % en peso, aproximadamente, de monoésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitan, con 12 a 22 átomos de carbono aproximadamente en la mitad de ácido graso y una media de 20 unidades oxietileno por molécula aproximadamente.
10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo Mucor miehei, se elige entre las cepas designadas con NRRL A13.131 y 13.042.
15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque comprende añadir adicionalmente un 17,5 % aproximadamente de cloruro sódico y un 2,5 % aproximadamente de propilenglicol a una solución acuosa diluida del preparado.
20. 4.- Procedimiento para estabilizar un preparado enzimático microbioal del cuajo de la leche, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 10 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

- 8 JUN. 1972

30.

ME

BAXTER LABORATORIES, INC.

J. GOMEZ ACEBO Y MODET

p p Firmados J. Suarez Diez

José Suárez