



| | | | |
|-------|----|-----------------------|-------|
| 19 ES | 21 | NUMERO | 10 A1 |
| | 22 | 433030 | |
| | | FECHA DE PRESENTACION | |
| | | 18 DIC. 1974 | |

CAS O.Z. 722/31

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------------|
| 30 PRIORIDADES: | | |
| 31 NUMERO | 32 FECHA | 33 PAIS |
| 17760/73 | 19-12-73 | Suiza |
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 61 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
| | C120 | |
| 64 TITULO DE LA INVENCION | | |
| "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA ENZIMA QUE COAGULA LA LECHE" | | |
| 71 SOLICITANTE (ES) | | |
| SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLE S.A. | | |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE | | |
| VEVEY (Suiza) | | |
| 72 INVENTOR (ES) | | |
| Marc HORISBERGER, Tomaso SOZZI, Robert POUSAZ. | | |
| 73 TITULAR (ES) | | |
| SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLE S.A. | | |
| 74 REPRESENTANTE | | |
| D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial. | | |

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a la preparación de productos dotados de actividad enzimática y más concretamente, a la obtención de productos que provocan la coagulación de la leche y que poseen las características del cuajo, a partir de estómagos de aves.

5.

El cuajo, producto de origen natural que ejerce una acción coagulante sobre la caseína de la leche, es un producto obtenido a partir de las mucosas gástricas de terneros alimentados solamente de leche. Esta acción coagulante se debe a la presencia en dicho extracto de una enzima, la renina, que posee una actividad proteolítica específica frente a la K-caseína. Teniendo en cuenta la naturaleza de su origen, el cuajo sólo puede obtenerse de un modo irregular, en cantidades que varían según las estaciones y que son insuficientes para cubrir la demanda creciente de las industrias lechera y quesera.

10.

15.

Por esta razón, se ha intentado y se sigue intentando, preparar cuajos llamados "microbianos", es decir, producidos por biosíntesis. Desgraciadamente estos últimos tienen el inconveniente de provocar con frecuencia el desarrollo de sabores desagradables y/o dar lugar a requesones de calidad inferior, particularmente para la fabricación del queso.

20.

Por otra parte, se sabe que el aparato digestivo de ciertos pájaros, sobre todo los carnívoros, es un centro de actividades proteolíticas intensas de tipo péptico. La patente israelí nº 30.520 describe un procedimiento para extraer una enzima que cuaja la leche con la

25.

ayuda de un agente alcalino, o también mediante el prensado de estómagos.

Según la invención, se ha descubierto un procedimiento para producir una enzima que coagula la leche cuya actividad es mayor que la que posee la pepsina de ave obtenida por extracción alcalina. El procedimiento se caracteriza porque se tratan tejidos de estómago de aves con una solución acuosa salina de pH inferior a 4, separándose las sustancias no disueltas y recuperándose la solución que contiene la enzima que coagula la leche.

Se emplearán con preferencia, en calidad de tejidos de estómago, tejidos de estómago glandulares ó pre-ventriculares, aún cuando los estómagos de aves, particularmente las domésticas, puedan en general liberar una enzima coagulante de la leche de calidad aceptable. En estos órganos se halla, en efecto, la concentración máxima de pepsinógeno, precursor de la pepsina.

El tratamiento de estos tejidos consiste en sumergirlos en una solución acuosa salina de pH inferior a 4, el valor del pH puede establecerse con la ayuda de una solución tampón o de cualquier agente acidificante, ácido mineral u orgánico, mejor "alimentario" como el ácido oxalúrico. Es ventajoso procurar que la superficie de contacto tejido-solución, sea la mayor posible, teniendo en cuenta los imperativos de la humectabilidad. También es preferible agitar fuertemente la suspensión tejido-solución. Además, se obtienen los mejores rendimientos en la extracción del principio activo, con soluciones salinas cuyos valores aproximados de fuerza iónica estén entre

- 0,085 y 1,2, sin tener en cuenta el agente acidificante, por ejemplo con soluciones de cloruro de sodio cuyas concentraciones se hallen entre 0,5 y 70 %; la sal empleada con preferencia es el cloruro de sodio, sobre todo en el
5. campo del empleo "alimentario" de la enzima que coagula la leche; pero ni que decir tiene, que puede emplearse cualquier otra sal (cloruro de potasio, fosfato o sulfato de sodio, etc.) ó mezcla de sal que tenga una fuerza iónica adecuada. El tiempo de contacto óptimo, es decir,
10. aquel tiempo más allá del cual no aumenta el rendimiento de la extracción ó incluso disminuye, es de 15 a 20 minutos para posibles temperaturas de trabajo comprendidas entre 0 y 40° C. Finalmente, se recupera la enzima coagulando la leche en la solución obtenida, después
15. de separar las fases sólida y líquida, esta separación se puede realizar mediante técnicas adecuadas, como filtración, pero debido a la naturaleza de la suspensión, podrá llevarse a cabo por centrifugación de una manera muy práctica.

20. Se agrupan en la figura anexo, las distintas etapas del procedimiento de esta invención con trazos gruesos, señalándose con trazos finos las variantes posibles y preferidas.

25. En una primera variante, se ajusta o modifica el valor de la fuerza iónica en la fase líquida de la suspensión, antes de la separación de fases. Efectivamente, es preferible hacer esta separación con unos valores que permiten precipitar gran cantidad de fracciones proteicas no interesantes que se han extraído median

- te el tratamiento ácido, sin introducir con ello demasiada sal en la fase líquida ni entorpecer reducciones posteriores de volumen. Así, utilizando como sal el cloruro de sodio, hay que atenerse a una serie de concentraciones entre el 6 y 10 % aproximadamente. Se puede paralelamente ajustar el pH de la suspensión a un valor inferior a 4, como ejemplo de valor inicial, habiéndose observado efectivamente que el pH varía durante el tratamiento.
- 5.
10. Según una segunda variante preferible, pues representa una mejora de la primera, se procede a una separación previa de fases de la suspensión, por ejemplo por centrifugación, interviniendo las modificaciones en la fuerza iónica y/o pH de la solución separada de sustancias insolubles, por ejemplo, de la parte que sobrenada.
- 15.
- La solución obtenida después de la separación ó con preferencia, pre-separación y separación, es un extracto que contiene la enzima que coagula la leche.
20. Este extracto se presenta bajo el aspecto de un líquido turbio que se puede emplear directamente para coagular la leche. No obstante, se acostumbra a clarificar, es decir, desengrasar y desaceitar. Además es conveniente, rebajar el pH de este extracto, clarificado o no, hasta un valor próximo a 2, que es donde se muestra más activa la enzima que cuaja la leche. Este pH, por una parte y por otra, la presencia de sal en notable proporción, aseguran una excelente conservación de la solución de esta enzima, lógicamente, se puede concentrar esta solución por cual-
- 25.

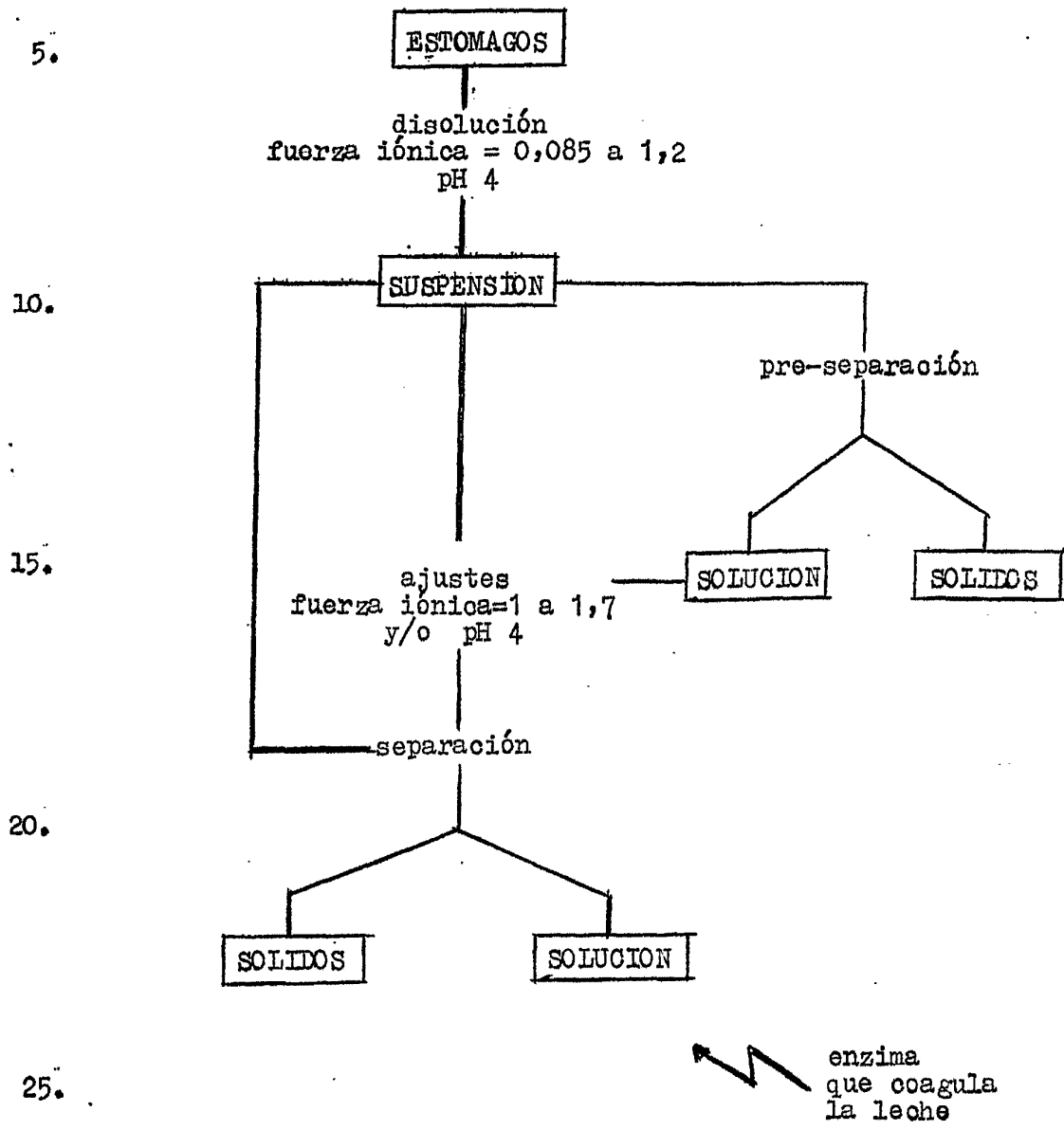
quier método que no desnaturalice la enzima, por ejemplo, evaporación al vacío ó por ósmosis inversa. También se puede eliminar el agua completamente y recuperar el producto seco, por ejemplo, por liofilización.

5. Según un método particular, se prepara un triturado de estómagos glandulares de pollo que se suspende, mediante una agitación intensa, en una solución al 0,88% de cloruro de sodio en agua desionizada (suero fisiológico). Se lleva a pH 3 añadiendo ácido clorhídrico. Después de 15 min. de contacto y en continua agitación a la temperatura ambiente, se separan las fases por centrifugación, se recoge la parte que sobrenada (presoparación), se añade un 7% de cloruro de sodio y se ajusta el pH a 3 con una nueva adición de ácido clorhídrico. Se vuelve a centrifugar y se desengrasa la parte que sobrenada en una centrifuga espumadora. Después se añade ácido clorhídrico a la parte que sobrenada desengrasada, hasta lograr un pH 2. Si se desea, se reduce el volumen aproximadamente a un tercio, por evaporación al vacío. Se emplea directamente la solución o la solución concentrada para coagular la leche.
- 10.
- 15.
- 20.

25. La enzima que coagula la leche, extraída en medio ácido según la invención presenta en igualdad de volumen, una actividad casi doble que la enzima extraída en medio alcalino, se puede explicar esto por conseguirse un rendimiento mejor con la extracción en medio ácido. Además, los efectos que causa en la leche son análogos a los productos por el cuajo de ternero. Así, los quesos preparados mediante esta enzima que coagula la leche, no se distinguen de los quesos tradicionales ó se diferencian poco de los mis-

mos. Respondo, pues bien a los criterios de las indus -
trias lechera y quosera, constituyendo en cierto modo un
"cuajo do avo".

ESQUEMA DE FLUJO



Los ejemplos que siguen ilustran la apli-
cación del procedimiento según la invención.

EJEMPLO 1

Se tritura en un molino Stephan provisto de una rejilla con orificios de 1,5 mm de diámetro, 56 kg de estómagos glandulares de pollo, se sumergen en 165 litros de agua desionizada que contiene 1,45 kg de NaCl. Se añade luego una solución de HCl al 12,5 % hasta lograr un pH 3. Se agita luego vigorosamente durante 15 minutos y se centrifuga la suspensión a 2000 rev/min. en una centrifuga Heine. Se obtienen así 55 kg de sedimento que se desecha y 167,6 kg de la parte que sobrenada a la que se añade 11,7 kg de cloruro sódico y 400 g de HCl al 12,5 % para ajustar el pH a 2,95. Nuevamente se centrifuga, a 5000 rev/min. en una centrífuga de Laval, se desengrasa la parte que sobrenada al pasar por una centrífuga espumadora de Laval a 28° C que gira a 7000 rev/min. Se obtienen así 131,5 kg de solución. Se separan previamente 60 kg de esta solución que se acidifica hasta un pH igual a 2 añadiendo 500 g de HCl al 12,5 %. Las dosificaciones de esta solución acidificada que contiene la enzima que coagula la leche, han dado los resultados que figuran a continuación (extracción ácida). A título comparativo, se dan los resultados relativos de una solución acidificada a pH 2, obtenida por el procedimiento israeli de extracción alcalina, señalado al principio de esta descripción (extracción alcalina), coincidiendo por otra parte, todo lo demás:

| | <u>extracción ácida</u> | <u>extracción alcalina</u> |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| % de materias secas | 9,90 | 7,15 |

| | <u>extracción ácida</u> | <u>extracción alcalina</u> |
|----|-----------------------------|--------------------------------|
| | 0,04 | 0,01 |
| | 0,005 | 0,05 |
| 5. | 7,95 | 6,10 |
| | 0,30 | 0,17 |
| | 0,27 | 0,16 |

Los resultados bacteriológicos referentes a la enzima que coagula la leche, obtenidos por el procedimiento ácido según la invención, son los siguientes :

| | |
|-----|----------|
| | negativo |
| | 20/ml |
| | <10/ml |
| | <10/ml |
| 15. | <10/ml |
| | <10/ml |
| | <10/ml |
| | <10/ml |

EJEMPLO 2

Se concentra hasta un peso de 21 kg, los 71,5 kg restantes de la solución obtenida en el ejemplo 1 después de desengrasar, por evaporación al vacío y con la ayuda de un baño mantenido a 42°C. Se lleva la solución concentrada a un pH igual a 2, añadiendo 370 g de HCl al 12,5%. Los resultados de las dosificaciones son los que figuran a continuación (la solución obtenida por el procedimiento alcalino ha experimentado evidentemente el mismo proceso de concentración):

| | <u>extracción ácido</u> | <u>extracción alcalina</u> |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| % de materias secas | 31,40 | 29,13 |

| | <u>extracción ácida</u> | <u>extracción alcalina</u> |
|----|-----------------------------|--------------------------------|
| | 0,017 | 0,031 |
| | 0,017 | 0,011 |
| | 24,4 | 24,0 |
| 5. | 0,95 | 0,71 |
| | 0,75 | 0,66 |

EJEMPLO 3

Se añade 0,1 ml de la solución acidificada que contiene la enzima coagulante de la leche, obtenida por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, a los 100 ml de leche completa pasteurizada a 72° C durante 3 min. Se mantiene la temperatura a 37° C. La leche es coagulada a los 7,5 min, lo que corresponde, en números redondos, a una fuerza de 1:5300, proporcionalmente alrededor de 1:3200 para la solución de extracción alcalina acidificada que requiere 12,5 min. para coagular la misma cantidad de leche en idénticas condiciones. A título indicativo, se calcula la fuerza por la fórmula siguiente :

$$\text{fuerza} = 10000 \times 240/t$$

siendo t el tiempo necesario para que 0,1 ml de solución que contenga la enzima, sea capaz de coagular 100 ml de leche a la temperatura de 37° C.

EJEMPLO 4

Se añade 0,1 ml de la solución concentrada y acidificada que contiene la enzima coagulante de la leche, obtenida en el ejemplo 2, a 100 ml de leche completa pasteurizada a 72° C, durante 3 min. Se mantiene la temperatura a 37° C. La leche es coagulada a los 3 min. lo que corresponde, en números redondos, a una fuerza de 1:13000,

proporcionalmente 1:8000 para la solución de extracción alcalina concentrada y acidificada del ejemplo 2, que requiere 5 min. para coagular la misma cantidad de leche en idénticas condiciones.

5.

EJEMPLO 5

Se inoculan 80 kg de leche completa previamente pasteurizada a 65° C durante 5 s, con el 1% de la cepa *S. thermophilus* y se mantiene la leche inoculada a 37° C durante 1 hora; entonces el pH es 6,20. Se divide esta leche en dos porciones iguales de 40 kg cada una. Se añade el cuajo a la primera porción, mediante la adición de 20 ml. de la solución concentrada indicada en el ejemplo 2, solución acidificada que contenga la enzima coagulante de la leche cuya fuerza es de 1:13000, añadiéndose después 10 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Se añade paralelamente el cuajo a la segunda porción con 1,5 g de cuajo Hansen de fuerza 1:150000, añadiéndose igualmente 10 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Cada porción de leche coagula a los 10 min.

Cada requesón ó coágulo así preparado, sufre luego las operaciones clásicas de fabricación de "mozzarella", operaciones bien conocidas por el especialista:

- se elabora el requesón durante 6 min.
- se coloca en moldes
- se recupera al cabo de 15 min.

25.

- se hace gotear durante 4 horas a 37° C.
- se rocía la pasta a 60° C
- se sala al 1 %
- se coloca en cámara fría en agua helada.

Al cabo de 24 horas se prueban las "mozzarollas"

- obtenidas de este modo. La "mozzarella" preparada con la ayuda de la solución que contiene la enzima que coagula la leche, presenta pocas diferencias con la tradicional preparada con el cuajo de Hansen. Sin embargo, se observa
5. que aparece una masa más fina y untuosa.

EJEMPLO 6

- Se preparan dos series de "pizzas", empleando, entre otros ingredientes, las "mozzarellas" descritas en el ejemplo 5. Después de cocidas, ambas series de "pizzas" tienen la misma estructura e idéntico sabor, la que
10. contiene "mozzarella" tradicional y la preparada con ayuda de la solución que contiene la enzima que coagula la leche.

REIVINDICACIONES

15. Describo el objeto del presente invento se de claran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 17760/73 del 19 de diciembre de 1973.

- 1.- Procedimiento de obtención de una enzima que coagula la leche, caracterizado por el hecho de que
20. se tratan tejidos de estómago de aves con una solución acuosa salina de pH inferior a 4, separándose las sustancias no disueltas y recuperándose la solución que contiene la enzima coagulante de la leche.

25. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que los tejidos de estómago de aves, son tejidos de estómago glandulares, de aves domésticas.

- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1,

caracterizado por el hecho de que la solución acuosa salina tiene una fuerza iónica entre 0,085 y 1,2 aproximadamente, sin tener en cuenta el agente acidificante.

5. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que la solución acuosa salina es una solución de cloruro sódico cuya concentración varía entre 0,5 y 7% aproximadamente.

10. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que antes de la separación de los productos no disueltos, se ajusta la fuerza iónica de la solución a unos valores comprendidos entre 1 y 1,7 aproximadamente sin tener en cuenta el agente acidificante.

15. 6.- Procedimiento según las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado por el hecho de que, antes de la separación de sustancias no disueltas, se ajusta la concentración de cloruro de sodio en la solución, a unos valores comprendidos entre el 6 y 10 % aproximadamente.

20. 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que, antes de la separación de las sustancias no disueltas, se ajusta el pH a un valor menor de 4.

25. 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 y 7 caracterizado por el hecho de que se separan las sustancias sólidas, antes de ajustar la fuerza iónica y/o el ajuste del pH.

9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se desengrasa la solución que contiene la enzima que coagula la leche.

- 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 9, caracterizado por el hecho de que se acidifica la solución que contiene la enzima que coagula la leche, a un pH igual a 2.
5. 11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 9 ó la 10, caracterizado por el hecho de que se concentra la solución que contiene la enzima que coagula la leche.
10. 12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 9, 10 ó la 11, caracterizado por el hecho de que se liofiliza la solución que contiene la enzima que coagula la leche.
- 13.- Procedimiento para la obtención de un enzima que coagula la leche.
15. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 14 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, acompañadas de los dibujos correspondientes.

Madrid, a 18 Diciembre 1974

p.a.

JAIME ISERN

p. p.

Firmado por JOSE L. MORA