

(18) ES (11) (21) (22)	NUMERO 514701	(19) A1
	FECHA DE PRESENTACION - 3 AGO. 1982	



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

(20) PRIORIDADES:		
(21) NUMERO	(22) FECHA	(23) PAIS
189.166	22 de septiembre de 1.980	EE.UU. de A.
Int. Cl. ³ <u>A 23 C 19/032, C12 N 9/64</u>		

(27) FECHA DE PUBLICIDAD	(28) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(29) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
		505.688

(34) TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA FABRICACION DE QUESO.

(71) SOLICITANTE (S)
GIST-BROCADES N.V.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
P.O.Box 1, Wateringseweg 1, 2600 MA DELFT, Holanda.

(72) INVENTOR (ES)
Andre JOYEAUX

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La invención se relaciona con un procedimiento me-
jorado para la producción de queso mediante coagulación de
leche con un nuevo enzima. Dicho enzima puede obtenerse por
cultivo del hongo *Mucor miehei* NRRL 12268 o sus variantes
o mutantes.

El método convencional para la producción de queso
implica el uso de cuajo para la coagulación de leche. El cuajo
es una composición conteniendo enzima preparada a partir del
cuarto estómago de vacas alimentadas con leche. En el proceso
de producción de queso, el cuajo se añade a la leche y el
enzima, renina, ejerce una acción proteolítica suave sobre la
caseína y otras proteínas presentes en la leche. Esta rotura
de las proteínas causa la coagulación de la leche o la forma-
ción de cuajadas sólidas. Estas cuajadas son separadas del
suero, el cual es predominantemente una suspensión acuosa de
bajo contenido en sólidos. Las cuajadas se mezclan entonces
con sal, etc., y se conforman en bloques o redondos y se curan
para formar queso.

Debido al origen animal particular del cuajo, el
suministro y calidad del cuajo están sujetos a amplias fluc-
tuaciones. A la vista de estos factores variables, los inves-
tigadores de este campo han intentado encontrar sustitutos
del cuajo para la fabricación de queso. Se han investigado
numerosos preparados enzimáticos vegetales y microbiales en
la vista de un sustituto adecuado que tenga las propiedades
coagulantes de leche del cuajo. Entre los microorganismos
que han sido descritos como de utilidad para este fin se
encuentran, por ejemplo, los diversos microorganismos descri-
tos en la Patente USA No. 1.391.219, el *Endothia parasitica*
descrito en la Patente USA 3.275.453 y el *Mucor pusillus* des-

crito en las patentes USA Nos. 3.151.039 y 3.212.905.

Las Patentes USA Nos. 4.136.201 (reissue No. 30.669) y No. 3.988.207 describen *Mucor miehei* que producirá un enzima útil para la coagulación de leche en procesos de producción de queso y la Patente USA No. 4.136.201 describe un enzima libre de lipasa derivado de *Mucor miehei* capaz de producir una amplia variedad de quesos por coagulación de leche.

Como resultado de las amplias investigaciones y experimentaciones llevadas a cabo, se ha encontrado sorprendentemente un proceso mejorado para la producción de un enzima coagulador de leche con baja actividad proteolítica en un rendimiento significativamente incrementado.

La preparación de la renina microbial que tiene alta actividad de coagulación de leche y baja actividad proteolítica, comprende cultivar, bajo condiciones aeróbicas, *Mucor miehei* NRRL 12268 o una variante productiva o mutante del mismo, en un medio de cultivo que contiene carbono, nitrógeno y trazas de nutrientes, asimilables, y recuperar la renina microbial del medio de cultivo.

Una descripción de las características generales del hongo *Mucor miehei* es proporcionada por Cooney y Emerson en su libro *Thermophilic Fungi*, p. 17-27 (1964) publicado por W.H. Freeman and Co., San Francisco y Londres. El *Mucor miehei* específico de la presente invención ha sido depositado en Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Ill, habiendo sido identificado por el No. NRRL 12268. Dicho depósito ha sido realizado de acuerdo con las provisiones de la sección 608.01 (p) del Manual del Método de Examen de Patente y bajo las provisiones de la Norma 28 de la Convención de la Patente Europea.

El *Mucor miehei* NRRL 12268 se prepara sometiendo la cepa de *Mucor miehei* NRRL A-13042 a agentes de alquilación tal como metilsulfonato de etilo (EMS) y seleccionando, mediante cultivo de bacterias en placas, un medio de caseína de agar y buscando los clones que proporcionan las zonas de coagulación más grandes y seleccionando además los microorganismos mediante cultivo en un medio líquido, tal como los descritos en la Patente USA No. 4.136.201.

La cepa *Mucor miehei* NRRL 12268 muestra características morfológicas y taxonómicas, que son bastante similares a las exhibidas por las cepas *Mucor miehei* de la técnica anterior, por ejemplo, NRRL A-13042, NRRL A-13131, NRRL A-7772 y NRRL 3169.

La renina microbial de la presente invención se prepara preferiblemente mediante crecimiento de un cultivo de la cepa NRRL 12268 *Mucor miehei* seleccionada o una variante o mutante de la misma, en un medio adecuado, en presencia de aire, a temperaturas de 30 a 55°C aproximadamente, durante periodos de tiempo de 2 a 14 días aproximadamente. El medio de fermentación tiene generalmente un pH de 3 a 8 aproximadamente, con preferencia de 4 a 7 aproximadamente. Para preparar la renina microbial de la presente invención se puede utilizar el método de fermentación aeróbica sumergida, por ejemplo, fermentación profunda, en tanques de fermentación comerciales o fermentación en matraces sobre un sacudidor rotativo, así como diversos métodos de fermentación aeróbica superficial. Se prefiere el método de fermentación aeróbica sumergida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la sensibilidad térmica de la renina microbial puede mejorarse tratando la renina con un agente oxidante, de forma conocida per se. El proceso se puede aplicar igualmente a un filtrado obtenido por recuperación del caldo de fermentación, o a un filtrado más o menos concentrado, obtenido por evaporación bajo vacío o

5 ultrafiltración. Agentes oxidantes adecuados son, por ejemplo, sales de ácido triclorocianúrico, ácido peryódico, ácido hipoclorórico, ácido clórico y ácido yódico y con preferencia sus sales de sodio, potasio o calcio. Un agente oxidante preferido es el hipoclorito sódico.

0 Sorprendentemente, se ha encontrado que cuando se utiliza la nueva cepa, se obtiene una viscosidad más baja del medio de fermentación. Según otra característica de la invención, la fermentación puede efectuarse en presencia de sulfato amónico con el fin de bajar la viscosidad del medio de fermentación. Podrá apreciarse que dichas viscosidades inferiores representan ventajas atractivas, tales como inferior potencia y energía para el mezclado, mejor transferencia y más fácil recuperación.

15 La recuperación se puede efectuar mediante simple separación sólido-líquida, tal como filtración o centrifugado, con lo cual la mayor parte del enzima deseado se encuentra en la fase líquida, o mediante simple concentración de la fase líquida por evaporación, ultrafiltración o por otros métodos usados convencionalmente en la separación de proteínas de mezclas, por ejemplo, precipitación con disolvente, precipitación de sal, 20 cromatografía y otros métodos de recuperación de proteínas. Ejemplos de disolventes que pueden ser usados para la precipitación de la renina microbial son cetonas tal como acetona, metiletilcetona, alcoholes tal como metanol, etanol o isopropanol, y otros disolventes orgánicos. Ejemplos ilustrativos de las sales que se pueden emplear son sulfato amónico, sulfato sódico y sales minerales similares. Se pueden utilizar todavía otros métodos de recuperación de la renina microbial, por ejemplo, 25 dialisis, electroforesis y liofilización.

30 Los medios de fermentación adecuados se pueden pre-

parar a partir de materiales de carbohidratos tales como suero, almidón de maíz degradado, Cerelose, salvado de trigo y otras fuentes orgánicas de carbono disponible, y a partir de materiales nitrogenados tales como levadura de cerveza, proteína de soja, caseína, urea, sales amónicas, nitratos y otras fuentes orgánicas o inorgánicas de nitrógeno disponible. Las fuentes de estos ingredientes de los medios de fermentación pueden ser materiales naturales en bruto o sustancias más altamente purificadas. Las trazas de nutrientes que pueden ser requeridos por el organismo están normalmente presentes con los ingredientes principales de los medios de fermentación, de manera que en general no se necesita la adición separada de trazas de nutrientes. Por ejemplo, en los medios de fermentación están generalmente presentes trazas de sales inorgánicas tales como cloruros, sulfatos, fosfatos y nitratos metálicos en asociación con los ingredientes carbonáceos y nitrogenados.

Las proteasas, en general, coagulan leche. Sin embargo, la mayoría de las proteasas causan una digestión considerable de proteínas. Cuando estas proteasas, de origen animal, vegetal o microbial, se utilizan para la coagulación de la leche, las cuajadas resultantes desarrollan sabores malos indeseables debido a proteólisis y de este modo no son muy adecuadas para la producción de queso. Una ventaja principal de la presente invención es que la renina preparada a partir de *Mucor miehei* como aquí se describe, tiene sorprendentemente una actividad proteolítica muy baja en asociación con una actividad coagulante de leche elevada. Las curvas de proteólisis de leche obtenidas a partir del *Mucor miehei* de la presente invención, son idénticas a las obtenidas con cuajo, lo cual indica una actividad proteolítica muy baja.

En la producción de fuertes quesos es conveniente utilizar una renina microbial obtenida a partir de *Mucor miehei* en donde la renina está esencialmente libre de cualquier lipasa y/o esterasa, mientras que en la producción de otros quesos puede ser deseable utilizar una renina microbial obtenida a partir de *Mucor miehei* en donde la renina contiene algo de lipasa y/o esterasa. Podrá entenderse que ambas reninas microbiales citadas se incluyen dentro del alcance de la presente invención, aunque se prefiera un producto libre de lipasa. Una renina microbial que contiene lipasa obtenida por el proceso de la invención, se puede tratar de forma conocida, por ejemplo, calentándola a 60°C, para obtener un producto libre de lipasa.

La actividad de la renina microbial de la invención se puede determinar por el método SRA efectuado como sigue:

Sustrato: 10% de leche seca y desgrasada

90% 0,01 M CaCl_2

5,0 ml

Enzima:

Temperatura: 25° cC

Observar el tiempo requerido para la aparición del primer flóculo.

Gama: 100 - 600 segundos de tiempo de floculación.

DERIVACION DE LA ECUACION

Definición: SRA = unidades de actividad renina/g.

Una unidad de actividad de renina se define como

1/100 de la actividad de 1 g de extracto de cuajo

resistencia única standard (Hansen)

SRA de extracto de cuajo standard = 100 ó 1 unidad

SRA es la actividad de 10 mg de extracto de cuajo standard.

$$\text{SRA} = \frac{1}{X (\text{seg. tiempo floc.})/g}$$

Let X = segundos tiempo Floc.

El gráfico de $\frac{1}{X} \cdot 10^5$ vs. mg extracto de cuajo standard de muestra:

a) una línea interseca el eje Y a $50 \frac{1}{\text{sec}} \cdot 10^5$ por encima del origen se requiere una corrección (c).

$$\text{SRA} = (K) \left(\frac{1}{X} \cdot 10^5 \right) - C/g$$

b) Pendiente de la línea = $153 \frac{1}{\text{sec}} \cdot 10^5 / \text{mg}$.

$$\text{mg} = \frac{\frac{1}{X} \cdot 10^5 - 50}{153}$$

$$\text{mg} = 654 \left(\frac{1}{X} \right) - 0,33$$

$$\text{SRA} = 65.400 \left(\frac{1}{X} \right) - 33/\text{mg}$$

Fracción de trabajo

$$\text{SRA} = 65.400/\text{seg. tiempo Floc.} - 33/\text{mg}$$

En los siguientes ejemplos se describen varias modalidades preferidas para ilustrar la invención. Sin embargo, debe entenderse que la invención no queda limitada a las modalidades específicas y que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones de las composiciones y procedimientos sin por ello desviarse del espíritu o alcance de la invención.

EJEMPLO 1

A un tanque de inóculo se añade una composición de papilla consistente en 9,8 kg de glucosa, 4,5 kg de hidrolisado de caseína, 0,45 kg de extracto de levadura y agua suficiente para conseguir un peso total de 454 kg y el pH se ajusta a 5,3-5,7. El líquido se esteriliza luego por calentamiento a 130-131°C durante 45-50 minutos y a continuación la mezcla se

enfria a 35,6-37,2°C. La mezcla se inocula luego con 0,1 % (volumen/volumen) de un precultivo de *Mucor miehei* NRRL 12268 que contiene los mismos ingredientes principales y se deja crecer el inóculo a la citada temperatura con agitación, mientras se pasa aire a través del mismo durante 20 - 50 horas.

Se carga un tanque fermentador con una papilla que comprende 74 kg de almidón en perlas, 18,6 kg de harina de soja, 0,5 kg de sólidos de suero, 0,06 kg de aceite de soja, suficiente alfa-amilasa bacteriana secada por aspersión para proporcionar la licuofacción del almidón y suficiente agua para conseguir un peso total de 454 kg. Después de la degradación del almidón, la papilla se esteriliza por calentamiento a 130-133°C durante 45-50 minutos y se ajusta el pH a 5,6-5,8. La papilla se inocula entonces con 1-5 % en volumen del inóculo producido anteriormente y se efectúa la fermentación a 36,7 - 38,9°C con agitación y flujo de aire a través de la misma durante 100-140 horas. Durante la fermentación se añade un agente antiespumante para reducir el espumado en los fermentadores y se añade 1,3 % en peso de sulfato amónico como una solución acuosa al 25 %. Más preferiblemente, dicha solución de sulfato amónico se añade en función del ajuste de un nivel adecuado de viscosidad.

La papilla se separa del fermentador y se filtra en vacío para separar los restos de células del líquido y el filtrado se somete luego a ultrafiltración a través de una membrana semipermeable para obtener un extracto concentrado que contiene enzima. El extracto se concentra para obtener la concentración deseada de enzima en el líquido y se ajusta el pH a 4 aproximadamente. La mezcla se calienta entonces a 60°C aproximadamente durante un tiempo suficiente para inactivar lipasa y esterasa sin afectar de modo adverso al enzima.

Se prepara un queso sustituyendo el preparado de cuajo normal utilizado en la etapa de solidificación por una cantidad equivalente de renina microbial producida anteriormente. En este procedimiento, se ajusta leche pasteurizada a una temperatura de 30-31,1°C y se añade 1 % en peso de una solución iniciadora comercial de ácido láctico. La renina microbial se añade entonces a la leche en una proporción de 0,085 kg, ajustada a un equivalente de potencia de un solo extracto de resistencia por 454 kg de leche. La mezcla se agita hasta obtener una cuajada de la firmeza satisfactoria. La cuajada se corta en cubos y se cocinan a 37,7°C durante varias horas. La cuajada se separa del suero y se distribuye en capas para formar placas. La cuajada molturada se salifica entonces con 3 % en peso de sal de queso. La cuajada salificada se transfiere a moldes para queso, se prensa y se coloca entonces en una cámara de curado. El queso producido a partir de la renina microbial de este ejemplo se muestrea periódicamente después de varios días de curado y se encuentra que posee excelentes cualidades y que está esencialmente libre de malos sabores.

Otros métodos convencionales de producción de queso Cheddar, por ejemplo los descritos generalmente por Prescott y Dunn, "Industrial Microbiology", capítulo 21 (3ª ed. 1959), McGraw-Hill Book Co., Inc. New York, y referencias allí citadas, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención sustituyendo los preparados de cuajo ordinariamente empleados en dicha producción de queso por una cantidad equivalente de la renina microbial de *Mucor miehei* del ejemplo 1 de esta invención, para producir un queso de buena calidad.

EJEMPLO 2

Usando el procedimiento del ejemplo 1, se efectua

una comparación utilizando Mucor miehei de la técnica anterior designado por M-67 y Mucor miehei NRRL 12268 y en la siguiente Tabla I se ofrecen los resultados obtenidos.

TABLA I

Cepa	% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	Rendimiento en SRA/g	Tiempo de fermentación (horas)
M-67	1,0	21,7	68
NRRL 12268	1,0	33,4	52
M-67	1,3	26,0	50-54
NRRL 12268	1,3	42,0	41-46
	1,3	54,2	38-45
	1,3	54,5	38-42
	1,3	69,7	33-39

Los resultados de la Tabla 1 demuestran la clara superioridad del nuevo Mucor miehei NRRL 12268 para la producción de renina microbial en comparación con el hongo de la técnica anterior.

La cepa M-67 es un descendiente de la cepa principal NRRL A-13042 obtenida mediante procedimientos normales de cultivo y selección.

EJEMPLO 3

Usando el procedimiento del ejemplo 1, se lleva a cabo una comparación empleando Mucor miehei de la técnica anterior designado por M-67 y Mucor miehei NRRL 12268 y en la siguiente Tabla II se ofrecen los resultados obtenidos.

La viscosidad de la papilla fermentada se ofrece en segundos Pascal (Pa.s.).

TABLA II

TIEMPO DE FERMENTACION	Cepa M-67	NRRL 12268
40 h	0,300 Pa.s	0,025 Pa.s
70 h	0,800 Pa.s	0,180 Pa.s

Resulta evidente que la nueva cepa proporcione una papilla fermentada con menor viscosidad y de este modo con las consecuencias bien conocidas para los expertos en esta materia: inferior potencia para el mezclado, mejor transferencia y más fácil recuperación.

EJEMPLO 4

Usando el procedimiento del ejemplo 2, se lleva a cabo una comparación empleando la nueva cepa NRRL 12268 para demostrar la influencia de la adición de solución de sulfato amónico sobre la viscosidad de la papilla en comparación con la misma cantidad de agua.

TABLA III

TIEMPO DE FERMENTACION	Adición de agua a las 66 horas	Adición de NH ₄ (30) 1,3% a las 66 horas.
42 horas	0,012 Pa.s	0,021 Pa.s
49 horas	0,026 Pa.s	0,034 Pa.s
66 horas	0,215 Pa.s	0,092 Pa.s
66 horas, después de la adición	0,182 Pa.s	0,074 Pa.s
94 horas	0,400 Pa.s	0,084 Pa.s
114 horas	0,504 Pa.s	0,126 Pa.s

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.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento mejorado para la fabricación de queso, caracterizado porque comprende sustituir al menos en parte el cuajo normalmente usado para preparar cuajadas de leche en la fabricación de queso, por un enzima procedente del cultivo del hongo *Mucor miehei* NRRL 12268 o sus variantes o mutantes.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha enzima es renina microbial libre de lipasa.

10 3.- Procedimiento mejorado para la fabricación de queso, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 12 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 3 AGO. 1982
GIST-BROCADES, N.V.

J. M. GONZÁLEZ ARZOB & PONS
a. n. Firmador J. Suarez Blaz

