

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 872**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/96** (2006.01)

**A23C 19/032** (2006.01)

**C12N 9/52** (2006.01)

**C12N 9/58** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007 E 11156545 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2333056**

54 Título: **Composición líquida que comprende una proteasa aspártica**

30 Prioridad:

**13.04.2006 EP 06112649**

**13.04.2006 US 791447 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.07.2014**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**DE HAAN, ANDRÉ;**

**CAUSSETTE, MYLENE y**

**SCHOONEVELD-BERGMANS, MARGOT**

**ELISABETH FRANCOISE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 478 872 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición líquida que comprende una proteasa aspártica.

La presente invención se refiere a una composición líquida que comprende una proteasa aspártica.

5 Se sabe que la preparación de queso implica el uso de una proteasa aspártica. La proteasa aspártica hace que la leche coagule, dando como resultado una cuajada sólida que se transforma además en queso.

Se pueden recuperar proteasas aspárticas de animales, por ej., del estómago de ternera, camello y foca. También pueden ser producidas por micro-organismos, por ejemplo *Rhizomucor*, *Cryphonectria* o cepas hospedadoras tales como *Aspergillus* o *Kluyveromyces*.

10 En la industria de fabricación del queso, con frecuencia se usan composiciones líquidas que comprenden la proteasa aspártica. Dichas composiciones líquidas contienen típicamente ciertos aditivos para obtener una estabilidad deseada. Se puede distinguir entre estabilidad enzimática y estabilidad microbiana. La estabilidad enzimática es una medida de la velocidad a que disminuye la actividad de la enzima. La estabilidad microbiana es una medida de la velocidad a que los microorganismos pueden proliferar y crecer en la composición.

15 Las propiedades microbianas de una composición se pueden expresar por el clásico recuento en placa, número de levaduras y número de mohos usando procedimientos clásicos definidos. Por ejemplo, el recuento en placa clásico puede ser  $\leq 100$  en 1 ml, el recuento de levaduras puede ser  $\leq 10$  en 1 ml y el recuento de mohos puede ser  $\leq 10$  en 1 ml. Como las composiciones con frecuencia se almacenan previamente a su uso, es deseable que el recuento en placa, número de levaduras y número de mohos permanezcan por debajo de ciertos valores límite, por ejemplo los valores mencionados anteriormente, durante un periodo prologado, por ejemplo durante un periodo de al menos 3 meses.

Se sabe usar sorbato o benzoato como conservante para obtener una estabilidad microbiana deseada. También se pueden usar parabenos (ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato).

25 Por ejemplo, la patente de EE.UU. A-3763010 describe una composición que comprende una proteasa aspártica y sorbato de potasio y benzoato de sodio. Las patentes internacionales WO-A-9015865 y WO-A-9529999 describen que se usa benzoato de sodio en composiciones que contienen una proteasa aspártica. Se conocen composiciones comerciales que comprenden una proteasa aspártica y entre 3 y 5 g/l (entre 0,02 y 0,035 moles/l) de benzoato de sodio.

Sin embargo, hay un deseo de productos que no contienen o que contienen menores cantidades de sorbatos, benzoatos y parabenos.

30 El objetivo de la invención es proporcionar una composición que presente una buena estabilidad microbiana en ausencia de sorbatos, benzoatos y parabenos.

La patente de EE.UU. A-3 763 010 describe un cuajo microbiano estabilizado de *Mucor miehei* por mezcla de un producto enzimático sólido recuperado de caldo de fermentación con 2-3 por ciento de monoésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán.

35 La patente internacional WO 95/29999 describe un procedimiento para separar enzimas coagulantes de la leche de extractos de tejido de estómago de animales. La patente internacional WO 95/29999 describe además una composición de quimosina líquida que comprende un agente estabilizante de quimosina.

40 Cabo et al. (Journal of food protection, des Moines, IO, US, vol 65, nº 8, 2.002, páginas 1.309-1.316) describen que la actividad antifúngica de diversas bacterias de ácido láctico contra *Penicillium discolor* se debe a ácido acético en el medio usado.

45 La invención proporciona composiciones que pueden presentar una estabilidad microbiana sorprendentemente alta, incluso en ausencia de estos compuestos o en presencia de estos compuestos en cantidades menores que las conocidas en la técnica anterior. Además, las composiciones pueden presentar una estabilidad enzimática sorprendentemente alta. Las composiciones según la invención pueden presentar una vida útil más prolongada que la esperada.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición líquida que comprende:

(i) una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y

(ii) una sal inorgánica y

(iii) un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato

50 composición en que:

la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato es menor que 0,010 moles/l;

el recuento en placa clásico  $\leq 100$  en 1 ml;

recuento de levaduras  $\leq 10$  en 1 ml y

recuento de mohos  $\leq 10$  en 1 ml

5 y en la que el pH está entre 4,8 y 5,5 y

en que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,1 moles/l.

Se entenderá que el ácido sórbico así como sales de ácido sórbico contribuyen a la concentración de sorbato. El ácido benzoico así como sales de ácido benzoico contribuyen a la concentración de benzoato. Los ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato pueden o pueden no estar en la forma de una sal. De acuerdo con esto, como se usa en la presente memoria, la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato se refiere a la concentración total de ácido sórbico, sales de ácido sórbico, ácido benzoico, sales de ácido benzoico, ésteres alquílicos de parahidroxibenzoato y sales de ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato en la composición. Ejemplos de sales de ácido sórbico son: sorbato de sodio, sorbato de potasio y sorbato de calcio. Ejemplos de sales de ácido benzoico son: benzoato de sodio, benzoato de potasio y benzoato de calcio. Ejemplos de ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoatos son metil-p-hidroxibenzoato, etil-p-hidroxibenzoato y propil-p-hidroxibenzoato. Ejemplos de sales de ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoatos son sal de sodio de metil-p-hidroxibenzoato, la sal sódica de etil-p-hidroxibenzoato y la sal sódica de propil-p-hidroxibenzoato.

Como se usa en la presente memoria, el recuento en placa clásico se determina según ISO 4833: 1991 (E) (Microbiología – Guía general para la enumeración de micro-organismos – Técnica de recuento de colonias a 30°C).

El recuento en levaduras se determina según ISO 7954: 1987 (E) (Microbiología – Guía general para la enumeración de levaduras y mohos – Técnica de recuento de colonias a 25°C).

El recuento de mohos se determina según ISO 7954: 1987 (E) (Microbiología – Guía general para la enumeración de levaduras y mohos – Técnica de recuento de colonias a 25°C).

25 La invención proporciona una composición líquida que comprende una proteasa aspártica y un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato. Estos compuestos pueden contribuir a la estabilidad microbiana. Se entenderá que estos compuestos son los aniones de los correspondientes ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido málico y ácido fumárico) y que estos compuestos pueden complementar la composición como el ácido orgánico o la sal de los mismos. La sal puede ser, por ejemplo, una sal de potasio, una sal de sodio o una sal de calcio.

El ácido orgánico y/o sal del mismo se puede emplear en cualquier concentración adecuada. En una realización preferida, la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos en la composición es al menos 0,1 moles/l, por ejemplo al menos 0,2 moles/l. Se entenderá que es posible que al menos uno de estos compuestos esté presente en una concentración preferida como se define en la presente memoria. También es posible que una combinación de dos o más de estos compuestos esté presente en una concentración preferida como se define en la presente memoria. Si se emplea una combinación, la concentración se refiere a la concentración total de estos compuestos. No hay límite superior específico para la concentración. La concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos puede ser menor que 2 moles/l, por ejemplo menor que 1 mol/l.

40 En una realización preferida, la composición comprende acetato. Preferiblemente, la composición comprende al menos 0,1 moles/l, por ejemplo al menos 0,2 moles/l de acetato. No hay límite superior específico para la concentración de acetato. La composición puede comprender, por ejemplo, menos de 2 moles/l, por ejemplo menos de 1 mol/l de acetato.

Según un aspecto de la invención, se proporciona composición líquida que comprende:

45 (i) una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y

(ii) una sal inorgánica y

(iii) un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato

composición en que:

la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato es menor que 0,010 moles/l;

50 el recuento en placa clásico  $\leq 100$  en 1 ml;

recuento de levaduras  $\leq 10$  en 1 ml y

recuento de mohos  $\leq 10$  en 1 ml,

y en la que el pH está entre 4,8 y 5,5 y

5 en que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,1 moles/l,

composición en que la concentración de sal inorgánica es menor que 180 g/l, preferiblemente menor que 170 g/l, más preferiblemente menor que 160 g/l. Se entenderá que la composición puede contener una o más sales inorgánicas. Los valores para los límites superiores preferidos de la concentración de sal inorgánica se refieren a la concentración total de las sales inorgánicas en la composición.

10 Según un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una composición líquida que comprende una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un caldo de fermentación, conteniendo dicho caldo de fermentación (i) microorganismos que han producido la proteasa y (ii) sobrenadante que contiene la proteasa;

(b) separar, por separación sólido líquido, sobrenadante del caldo de fermentación;

15 (c) purificar el sobrenadante separado, para obtener una disolución purificada;

(d) opcionalmente, añadir uno o más aditivos a la disolución purificada, en la que al menos uno de dicho uno o más aditivos es una sal inorgánica, un polialcohol o un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato y

20 (e) filtrar la disolución purificada, que contiene dicho uno o más aditivos y en el que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,1 moles/l, también se describe una composición que se puede obtener por el procedimiento descrito.

Se describirán realizaciones preferidas de ahora en adelante y se pueden aplicar a la invención en todos sus aspectos. Se apreciará además que la presente invención incluye además cualquier combinación de los diversos aspectos de la invención y/o características preferidas.

25 Según la invención no es necesario el uso de benzoato, sorbato o para-hidroxibenzoato o se puede usar benzoato, sorbato o para-hidroxibenzoato en menores cantidades. En una realización preferida, la composición según la invención comprende menos de 0,010 mol/l de benzoato, preferiblemente menos de 0,005 moles/l, preferiblemente menos de 0,002 moles/l, preferiblemente menos de 0,001 moles/l, preferiblemente menos de 0,0005 moles/l, preferiblemente menos de 0,0001 moles/l, preferiblemente menos de 0,00005 moles/l, preferiblemente menos de 0,00001 moles/l, preferiblemente una cantidad no detectable. En una realización preferida más, la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de parahidroxibenzoatos en la composición según la invención es menor que 0,010 moles/l, preferiblemente menor que 0,005 moles/l, preferiblemente menor que 0,002 moles/l, preferiblemente menor que 0,001 moles/l, preferiblemente menor que 0,0005 moles/l, preferiblemente menor que 0,0001 moles/l, preferiblemente menor que 0,00005 moles/l, preferiblemente menor que 0,00001 moles/l, preferiblemente una cantidad no detectable. Se sabe que el benzoato, sorbato y parahidroxibenzoato se puede usar para matar los micro-organismos después de una fermentación. De acuerdo con esto, pueden estar presentes pequeñas cantidades de estos compuestos en la composición que resulta de dicha etapa de destrucción.

40 En otra realización de la invención, la concentración total de conservantes en la composición según la invención es menor que 0,010 moles/l, preferiblemente menor que 0,005 moles/l, preferiblemente menor que 0,002 moles/l, preferiblemente menor que 0,001 moles/l, preferiblemente menor que 0,0005 moles/l, preferiblemente menor que 0,0001 moles/l, preferiblemente menor que 0,00005 moles/l, preferiblemente menor que 0,00001 moles/l, preferiblemente una cantidad no detectable. El término conservante es conocido por el experto en la materia y como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que inhibe el crecimiento de microorganismos y/o evita la germinación de esporas y/o destruye células vegetativas y/o esporas. En el contexto de la presente invención, esta definición de conservante no incluye polialcoholes o sales inorgánicas.

45 Preferiblemente, la composición líquida es una composición acuosa, por ejemplo una disolución acuosa. Como se usa en la presente memoria una composición acuosa o disolución acuosa incluye cualquier composición o disolución que comprende agua, por ejemplo al menos 20% en peso de agua, por ejemplo al menos 40% en peso de agua.

50 La composición según la invención tiene una actividad en agua de por debajo de 0,95, por ejemplo por debajo de 0,92, por ejemplo por debajo de 0,9, por ejemplo por debajo de 0,85, por ejemplo por debajo de 0,8. Como se usa en la presente memoria la actividad en agua se refiere al valor medido a 25°C. Una actividad en agua relativamente baja puede contribuir a conseguir una estabilidad microbiana deseada. La actividad en agua puede estar influida por la adición de sal inorgánica y/o polialcoholes. La actividad en agua puede estar por encima de 0,7, por ejemplo por

encima de 0,8, por ejemplo por encima de 0,83 o por encima de 0,85 o por encima de 0,86. Se encontró sorprendentemente que una composición con una actividad en agua por encima de estos valores puede presentar una estabilidad microbiana mayor de lo esperado. La actividad en agua está preferiblemente entre 0,85 y 0,95.

- 5 La composición según la invención comprende una sal inorgánica. La sal inorgánica puede actuar disminuyendo la actividad en agua de la composición. Se puede usar cualquier sal inorgánica adecuada. La sal inorgánica puede ser, por ejemplo, una sal que comprende un catión seleccionado del grupo que consiste en:  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  y un anión seleccionado del grupo que consiste en:  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  y  $\text{SCN}^-$ . Son sales inorgánicas preferidas  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La composición puede contener una o más sales inorgánicas.
- 10 En una realización preferida, la composición comprende al menos 80 g/l de una sal inorgánica o de una combinación de sales inorgánicas, preferiblemente al menos 100 g/l, más preferiblemente al menos 120 g/l, más preferiblemente al menos 140 g/l. Una concentración de sal aumentada tiene el efecto de que aumenta la actividad en agua de la composición, que puede ayudar a conseguir una estabilidad microbiana deseada. Se entenderá que es posible que al menos una sal inorgánica esté presente en una concentración preferida como se define en la presente memoria.
- 15 También es posible que una combinación de sales inorgánicas esté presente en una concentración como se define en la presente memoria. Si se emplea una combinación de sales inorgánicas, la concentración se refiere a la concentración total de sales inorgánicas. En una realización preferida, la composición comprende al menos 80 g/l de  $\text{NaCl}$ , preferiblemente al menos 100 g/l, más preferiblemente al menos 120 g/l, más preferiblemente al menos 140 g/l.
- 20 En una realización preferida, la concentración de sal inorgánica en la composición es menor que 200 g/l, preferiblemente menor que 190 g/l, preferiblemente menor que 180 g/l, preferiblemente menor que 170 g/l, por ejemplo menor que 160 g/l. En una realización preferida, la composición comprende menos de 200 g/l, preferiblemente menos de 190 g/l, preferiblemente menos de 180 g/l, preferiblemente menos de 170 g/l, por ejemplo menos de 160 g/l de  $\text{NaCl}$ . Disminuir la concentración de sal inorgánica puede contribuir a la estabilidad enzimática.
- 25 La invención permite el uso de concentraciones relativamente bajas de sales inorgánicas, que puede ayudar a conseguir una combinación de una estabilidad microbiana alta y una enzimática alta. Se entenderá que la composición puede contener una o más sales inorgánicas. Los valores para los límites superiores preferidos de la concentración de sal inorgánica se refieren a la concentración total de las sales inorgánicas en la composición.
- 30 La composición puede comprender un polialcohol. El polialcohol puede actuar disminuyendo la actividad en agua de la composición. Disminuir la actividad en agua puede ayudar a conseguir una estabilidad microbiana deseada. Se puede usar cualquier polialcohol adecuado. El polialcohol puede ser, por ejemplo, etilenglicol (etanodiol), propilenglicol (propanodiol), glicerol, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, galactitol. Preferiblemente, el polialcohol es glicerol, sorbitol o propanodiol, más preferiblemente glicerol o propanodiol. La composición puede comprender uno o más polialcoholes.
- 35 La composición puede comprender al menos 40 g/l de un polialcohol o de una combinación de polialcoholes, preferiblemente al menos 80 g/l. Se entenderá que es posible que al menos un polialcohol esté presente en una concentración preferida como se define en la presente memoria. También es posible que una combinación de polialcoholes esté presente en una concentración como se define en la presente memoria. Si se emplea una combinación de polialcoholes, la concentración se refiere a la concentración total de sales inorgánicas.
- 40 La concentración de polialcohol en la composición puede ser menor que 300 g/l, por ejemplo menor que 200 g/l, por ejemplo menor que 150 g/l. Sin embargo, también se pueden usar menores concentraciones, por ejemplo concentraciones menores que 100 g/l, por ejemplo menores que 50 g/l, por ejemplo menores que 10 g/l o incluso 0 g/l. Los límites superiores se refieren a la concentración total de polialcoholes en la composición.
- 45 La composición puede comprender entre 90 y 120 g/l de un polialcohol o de una combinación de polialcoholes y, preferiblemente, entre 140 y 180 g/l de  $\text{NaCl}$ .
- El pH está entre 4,8 y 5,5.
- En una realización preferida, la composición comprende un agente reductor, preferiblemente metionina. Preferiblemente, la composición comprende al menos 1 g/l de metionina, preferiblemente al menos 2 g/l, más preferiblemente al menos 5 g/l, por ejemplo menos de 100 g/l, por ejemplo menos de 30 g/l.
- 50 La actividad enzimática es al menos 100 IMCU por ml de composición, preferiblemente al menos 200 IMCU por ml de composición, preferiblemente al menos 500 IMCU por ml de composición. No hay límite superior específico para la actividad enzimática. La actividad enzimática puede estar por debajo de 5.000 IMCU por ml de composición, por ejemplo menor que 2.000 IMCU por ml, por ejemplo menor que 1.000 IMCU por ml de composición. IMCU se refiere a Unidad de Coagulación de Leche Internacional, definida por la Federación Internacional Lechera (IDF), protocolo 176; 1.996.
- 55 La composición según la invención presenta un recuento en placa clásico  $\leq 100$  en 1 ml. Preferiblemente, el recuento de levaduras  $\leq 10$  en 1 ml. Preferiblemente, el recuento de mohos es  $\leq 10$  en 1 ml.

5 La composición según la invención presenta una estabilidad microbiana mayor de lo esperado. En una realización de la invención, el recuento en placa clásico queda  $\leq 100$  en 1 ml, el recuento de levaduras queda  $\leq 10$  en 1 ml y el recuento de mohos queda  $\leq 10$  en 1 ml durante un periodo de al menos 4 meses, preferiblemente al menos 6 meses, preferiblemente al menos 9 meses, preferiblemente al menos 12 meses, preferiblemente al menos 18 meses, preferiblemente al menos 24 meses, cuando la composición se almacena en un envase cerrado a una temperatura de 4°C en la oscuridad.

10 En una realización de la invención, el recuento en placa clásico queda  $\leq 100$  en 1 ml, el recuento de levaduras queda  $\leq 10$  en 1 ml y el recuento de mohos queda  $\leq 10$  en 1 ml durante un periodo de al menos 4 meses, preferiblemente al menos 6 meses, preferiblemente al menos 9 meses, preferiblemente al menos 12 meses, preferiblemente al menos 18 meses, preferiblemente al menos 24 meses, cuando la composición se almacena en un envase cerrado a una temperatura de 30°C en la oscuridad.

15 En una realización de la invención, la actividad enzimática disminuye a lo sumo 5% durante un periodo de al menos 4 meses, preferiblemente al menos 6 meses, preferiblemente al menos 9 meses, preferiblemente al menos 12 meses, preferiblemente al menos 18 meses, preferiblemente al menos 24 meses, cuando la composición se almacena en un envase cerrado a una temperatura de 4°C en la oscuridad.

20 En una realización de la invención, la actividad enzimática disminuye a lo sumo 5% durante un periodo de al menos 4 meses, preferiblemente al menos 6 meses, preferiblemente al menos 9 meses, preferiblemente al menos 12 meses, preferiblemente al menos 18 meses, preferiblemente al menos 24 meses, cuando la composición se almacena en un envase cerrado a una temperatura de 30°C en la oscuridad.

Como envase cerrado para estos ensayos se puede usar un frasco, que se esteriliza previamente al llenado y que se cierra con una rosca de tornillo. Se pueden usar frascos con un volumen de 50 ml que se llenan con 20 ml de la composición que se tiene que ensayar.

25 La composición comprende una proteasa aspártica. Preferiblemente, la proteasa aspártica es una enzima coagulante de la leche. Las enzimas coagulantes de la leche se pueden caracterizar por tener especificidad para el enlace peptídico entre el resto 105 fenilalanina y el resto 106 metionina o un enlace adyacente al que está en kappa-caseína.

La proteasa aspártica puede ser de origen animal. Preferiblemente, la proteasa aspártica es producida por un microorganismo (una proteasa aspártica producida de manera microbiana).

30 El microorganismo puede ser, por ejemplo, *Rhizomucor*, por ejemplo *Rhizomucor miehei* o *Rhizomucor pussilus* o *Cryphonectria*, por ejemplo *Cryphonectria parasitica*. El microorganismo también puede ser seleccionado del género de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* o *Kluyveromyces*. Estos microorganismos se pueden usar, por ejemplo, como cepa hospedadora. En una realización preferida, el microorganismo es *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* o *Escherichia coli*.

35 En la composición reivindicada, la proteasa aspártica es una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*. El término "proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*" incluye la proteasa aspártica producida de manera homóloga en *Rhizomucor miehei*. Un procedimiento para la preparación de la enzima vía fermentación se describe en la patente de EE.UU. A-3.988.207. El término "proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*" también incluye una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* recombinante, por ejemplo una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* producida en un organismo hospedador (por ej., distinto de *Rhizomucor miehei*) transformado con ADN codificador para la proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*. Un método para la producción de una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* recombinante en un organismo hospedador se describe en la patente europea EP-A-700253.

45 Otra proteasa aspártica es quimosina. La quimosina se puede extraer, por ejemplo, del estómago de una ternera, un camello o una foca. En una realización preferida de la invención, la quimosina es producida por un microorganismo, por ej., vía tecnología de ADN recombinante en bacterias, por ej., *Escherichia coli*, levadura, por ej., *Kluyveromyces lactis* u hongos filamentosos, por ej., en *Aspergillus niger*.

La composición según la invención se puede envasar en cualquier envase cerrado adecuado. De acuerdo con esto, la invención proporciona además un envase cerrado y/o sellado que contiene la composición según la invención.

La composición según la invención se puede preparar usando un procedimiento para preparar una composición líquida que comprende una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, comprendiendo dicho procedimiento:

50 (a) proporcionar un caldo de fermentación, conteniendo dicho caldo de fermentación (i) microorganismos que han producido la proteasa y (ii) sobrenadante que contiene la proteasa;

(b) separar, por separación sólido líquido, sobrenadante del caldo de fermentación:

(c) purificar el sobrenadante separado, para obtener una disolución purificada;

(d) opcionalmente, añadir uno o más aditivos a la disolución purificada, en la que al menos uno de dichos uno o más aditivos es una sal inorgánica, un polialcohol o un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato y

5 (e) filtrar la disolución purificada, que contiene dichos uno o más aditivos y en el que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,1 moles/l.

La etapa (a) se puede realizar de cualquier manera adecuada y puede implicar cultivar un micro-organismo en condiciones adecuadas para producir la proteasa, dando como resultado un caldo de fermentación que contiene el micro-organismo y sobrenadante que contiene la proteasa. Un procedimiento adecuado se describe, por ejemplo, en la patente europea EP-A-1365019.

10 La etapa (b) se puede realizar de cualquier manera adecuada y preferiblemente implica centrifugación y/o filtración. La etapa (b) puede implicar filtrar usando un filtro prensa de membrana o un filtro de pulido.

15 Las funciones de la etapa (c) pueden implicar cualquier etapa que resulte en un aumento de la concentración de la enzima respecto a los otros componentes. Preferiblemente, la etapa (c) implica cromatografía o ultrafiltración. Los procedimientos preferidos para realizar cromatografía se describen en las patentes internacionales WO-A-03100048 y WO-A-0250253.

La etapa (d) implica añadir uno o más aditivos a la disolución purificada, en la que al menos uno de dichos uno o más aditivos es una sal inorgánica, un polialcohol o un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato. También se pueden añadir otros aditivos. Preferiblemente, no se añade compuesto seleccionado de benzoato, sorbato o éster alquílico de para-hidroxibenzoato a la disolución purificada.

20 La etapa (e) implica preferiblemente filtración de pulido o filtración estéril. La filtración de pulido es conocida de por sí. La filtración de pulido en la etapa (e) actúa retirando cantidades traza de partículas no disueltas, por ejemplo partículas celulares y/o micro-organismos contaminantes. Los filtros de pulido presentan típicamente un radio relativamente pequeño de los poros del filtro (rango de micrómetros) y poca profundidad de la capa de filtro activa (rango de milímetro a centímetro).

25 Preferiblemente, la disolución filtrada que resulta de (e) presenta las siguientes propiedades: recuento en placa clásico  $\leq 100$  en 1 ml; recuento de levaduras  $\leq 10$  en 1 ml y recuento de mohos  $\leq 10$  en 1 ml.

Preferiblemente, el equipo que se pone en contacto con la disolución filtrada que resulta de (e) se pone en contacto con vapor previamente a poner en contacto el equipo con la disolución filtrada. Esto evita la contaminación.

30 Una o más de las etapas (a), (b), (c), (d) o (e) se pueden llevar a cabo a una temperatura menor que 10°C, preferiblemente menor que 5°C.

35 En una realización preferida, la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato en la disolución filtrada que resulta de (e) es menor que 0,010 moles/l, preferiblemente menor que 0,005 moles/l, preferiblemente menor que 0,002 moles/l, preferiblemente menor que 0,001 moles/l, preferiblemente menor que 0,0005 moles/l, preferiblemente menor que 0,0001 moles/l, preferiblemente menor que 0,00005 moles/l, preferiblemente menor que 0,00001 moles/l, preferiblemente una cantidad no detectable.

La invención proporciona además la composición de uso según la invención como un coagulante en la producción de queso.

40 La invención proporciona además un procedimiento para preparar queso, que comprende, (i) complementar la leche con una composición según la invención, para efectuar la coagulación de la leche, en el que se obtiene una cuajada y (ii) transformar la cuajada en queso.

La invención se aclarará ahora con referencia a los siguientes ejemplos, sin, sin embargo, estar limitada a los mismos.

### Ejemplos

#### Ejemplos 1-5

45 Se cultivó un cultivo de *Rhizomucor miehei* como se describe en la patente europea EP-A-1365019. Al final de la fermentación se enfrió el caldo, se destruyeron los hongos y se separaron del líquido usando un filtro prensa de membrana y filtración de pulido. La proteasa coaguladora de la leche se purificó con posterioridad usando cromatografía como se describe en la patente internacional WO 03/100048. El eluido de la columna, que contenía la proteasa coaguladora de la leche se formuló por adición de NaCl, Acetato de Sodio, Metionina (10 g/l) y  
50 opcionalmente benzoato de sodio y por ajuste del pH (véase la tabla 1). Las condiciones se seleccionaron específicamente se manera que se evitara la contaminación, que incluyó exposición al vapor de cubas y sistema de tuberías.

Tabla 1. Formulaciones de proteasa coaguladora de la leche de *Rhizomucor miehei*.

ej.	pH	NaCl (g/l)	Acetato de Sodio (g/l)	Actividad en agua	Actividad enzimática inicial (IMCU)	Benzoato de sodio (g/l)
1	5,0	150	30	0,88	616	4,5
2	5,0	150	30	0,88	624	-
3	5,3	165	30	0,86	688	-
4	4,8	165	30	0,86	714	-
5	4,2	165	30	0,86	724	-

La actividad en agua se determinó usando un Thermoconstanter TH-200 (Novasina, Axair Ltd, Suiza) a 25°C y se calibró con 6 sales de calibración de 11, 33, 53, 75, 90 y 98% de humedad relativa, como fue suministrado por el fabricante.

#### Ensayo de estabilidad

Se almacenaron muestras (20 ml) en una incubadora prefijada a 30°C en frascos cerrados con una parte superior roscada. A diversos intervalos de tiempo (0, 1, 2, 4 semanas, 2, 8 meses) se determinó el recuento en placa clásico, según ISO 4833:1991 (E) (Microbiología - Guía general para la enumeración de micro-organismos - Técnica de recuento de colonias a 30°C), así como recuento de levaduras y recuento de mohos, según ISO 7954: 1987 (E) (Microbiología - Guía general para enumeración de levaduras y mohos - Técnica de recuento de colonias a 25°C). Además de estas determinaciones - que se realizaron usando un medio de cultivo sin NaCl - también se realizaron determinaciones de la misma manera, pero con la diferencia de que se usó un medio de cultivo con NaCl al 5%.

En todas las muestras, los recuentos de colonias fueron < 10 por ml para bacterias, levaduras y mohos, se realizaron los recuentos de células en placas sin o con NaCl.

Este ensayo de estabilidad muestra que en todas las formulaciones sin benzoato el recuento en placa clásico queda ≤ 100 en 1 ml; las levaduras quedan ≤ 10 en 1 ml y los mohos quedan ≤ 10 en 1 ml, cuando se almacena una muestra a 30°C durante un periodo de al menos 8 meses. El recuento en placa clásico queda ≤ 100 en 1 ml; las levaduras quedan ≤ 10 en 1 ml y los mohos quedan ≤ 10 en 1 ml, cuando se almacena una muestra a 4°C durante un periodo de al menos 12 meses.

#### Ensayo de estimulación

Las 5 formulaciones de la proteasa coaguladora de la leche de *Rhizomucor miehei* se sometieron a ensayos de estimulación, en que se inocularon los microorganismos seleccionados de bacterias, levaduras y mohos xerotolerantes. Se encontró que todas las formulaciones presentaban una buena resistencia a los microorganismos.

Durante este periodo de almacenaje la actividad enzimática de la proteasa coaguladora de la leche, como se determina en IMCU (Unidad de Coagulación Lechera Internacional, definida por la Federación Lechera Internacional (IDF), protocolo 176: 1.996) disminuyó menos de 0,5% al mes en las formulaciones 1, 2 y 3. En las formulaciones 4 y 5 la disminución fue mayor.

#### Ejemplos 6-9

Se produjo una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* como se describe en los Ejemplos 1-5. El producto se formuló como se proporciona en la Tabla 2. La actividad enzimática inicial fue 760 IMCU/ml.

Tabla 2. Formulaciones de proteasa coaguladora de la leche de *Rhizomucor miehei*.

Ej.	pH	NaCl (g/l)	Acetato de sodio (g/l)	Benzoato de sodio (g/l)
6	5,4	140	30	4,5
7	5,4	140	30	-
8	5,4	140	-	-
9	5,1	200	-	-



## Ensayo de estabilidad

Se almacenaron muestras (50 ml) en una incubadora fijada a 20°C en frascos cerrados con una parte superior roscada. A diversos intervalos de tiempo (0, 1, 2, 4 y desde entonces cada 4 semanas hasta 8 meses) se determinó el recuento en placa clásico como se describe en los Ejemplos 1-5. Además de estas determinaciones - que se realizaron usando un medio de cultivo sin NaCl - se realizaron también determinaciones de la misma manera, pero con la diferencia de que se usó un medio de cultivo con NaCl al 10%. El recuento en placa clásico sin NaCl al 10% en el medio mostró < 10 unidades formadoras de colonias por ml desde el principio por el periodo de almacenaje completo, mientras que para las formulaciones 8 y 9 sin acetato ni benzoato este nivel se alcanzó después de 2 semanas de almacenaje y después permaneció constante durante el periodo de almacenaje total. El recuento en placa clásico con NaCl al 10% en el medio mostró para todas las formulaciones desde el principio hasta el final del periodo de almacenaje < 10 unidades formadoras de colonias por ml.

Este ensayo de estabilidad muestra que el acetato proporciona buena estabilidad microbiana, incluso en ausencia de benzoato.

## Ensayos de estimulación

Las 4 formulaciones de la proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, como se proporciona en la Tabla 2, se inocularon con una mezcla de microorganismos xerotolerantes (un *Micrococcus*, *Torulopsis candida* y *Hansenula anomala* halofílicos) a aproximadamente 2E+3 unidades formadoras de colonia por ml. Se almacenaron las muestras en una incubadora fijada a 20°C, en frascos cerrados con una parte superior roscada. Se encontró que las formulaciones de los ejemplos 6 y 7 (que contenían benzoato o acetato) presentan una resistencia mejorada a los microorganismos comparado con el ejemplo 8 que no contiene benzoato o acetato. Aunque se encontró que la formulación del ejemplo 9 presentaba una buena resistencia contra los microorganismos, se encontró que el uso de acetato permitía el uso de concentraciones menores de sal lo que puede mejorar la estabilidad enzimática.

En total, tanto el ensayo de estabilidad como de estimulación demuestran el efecto conservante eficaz del acetato, incluso en ausencia de benzoato.

## Ejemplos 10-11

Se produjo una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* como se describe en los Ejemplos 1-5. El producto se formuló como se proporciona en la Tabla 3, incluyendo 10 g/l de metionina. Después de corrección del pH y adición de los diversos compuestos, se sometió de nuevo el producto formulado a una filtración de pulido. Previamente a la filtración de pulido se expusieron al vapor las cubas y el sistema de tuberías, poniendo en contacto el producto filtrado. Se envasó después el producto filtrado en bidones sellados de 20 litros.

Tabla 3. Formulaciones de proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

Ej	pH	NaCl (g/l)	Acetato de sodio (g/l)	Benzoato de sodio (g/l)	Actividad enzimática inicial (IMCU/ml)
10	5,25	149	31	-	762
11	5,20	149	31	-	228

## Ensayo de estabilidad

Se almacenaron las muestras en bidones cerrados de 20 l en incubadoras fijadas a 5°C o 20°C. Se usó un bidón de formulación 10 y tres bidones de formulación 11 en este ensayo de estabilidad. Se comprobó la estabilidad microbiana de estas muestras a intervalos de tiempo regulares hasta 8 meses por el recuento en placa clásico. En todos los envases, tanto a 5 como a 20°C no se pudo detectar crecimiento de bacterias, levaduras o mohos, cuando se determina por los métodos para recuento en placas clásico de levaduras y recuento de mohos, como se describe en los Ejemplos 1-5.

La estabilidad microbiana de estas formulaciones sin benzoato fue buena durante todo el periodo de almacenaje de 8 meses.

## Ensayo de estimulación

De cada formulación se inoculó una muestra (50 ml) con una mezcla de microorganismos xerotolerantes (un *Micrococcus*, *Torulopsis Candida* y *Hansenula anomala* halofílicos) a aproximadamente 2E+3 unidades formadoras de colonia por ml. Estas muestras se almacenaron en un frasco con parte superior roscada en una incubadora fijada a 20°C. Las dos formulaciones mostraron una buena resistencia contra los microorganismos.

Tanto el ensayo de estabilidad como de estimulación demostró que las formulaciones sin benzoato, que contenían acetato, presentaban un efecto conservante eficaz.

## REIVINDICACIONES

1. Composición líquida que comprende:
- (i) una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y
- 5 (ii) una sal inorgánica y
- (iii) un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato
- composición en que:
- la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato es menor que 0,010 moles/l;
- el recuento en placa clásico  $\leq 100$  en 1 ml;
- 10 recuento de levaduras  $\leq 10$  en 1 ml y
- recuento de mohos  $\leq 10$  en 1 ml
- y en la que el pH está entre 4,8 y 5,5 y
- en que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,1 moles/l.
- 15 2. Composición según la reivindicación 1, en que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,2 moles/l.
3. Composición según la reivindicación 1, que comprende acetato.
4. Composición líquida según cualquier reivindicación precedente, que se puede obtener por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
- 20 5. Composición según cualquier reivindicación precedente, en que la concentración de benzoato es menor que 0,010 moles/l.
6. Composición según cualquier reivindicación precedente, en que la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato es menor que 0,010 moles/l.
- 25 7. Composición según cualquier reivindicación precedente, en la que dicha sal inorgánica es NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
8. Composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende al menos 80 g/l de una sal inorgánica o de una combinación de sales inorgánicas.
9. Composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende al menos 80 g/l de NaCl.
- 30 10. Composición según cualquier reivindicación precedente, en que la concentración de sal inorgánica es menor que 180 g/l.
11. Composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende menos de 180 g/l de NaCl.
12. Composición según cualquier reivindicación precedente, en la que la composición comprende además metionina.
- 35 13. Composición según cualquier reivindicación precedente, en la que el recuento en placa clásico queda  $\leq 100$  en 1 ml, el recuento de levaduras queda  $\leq 10$  en 1 ml y el recuento de mohos queda  $\leq 10$  en 1 ml durante un periodo de al menos 6 meses, cuando la composición se almacena en un envase cerrado a una temperatura de 4°C en la oscuridad.
- 40 14. Composición según cualquier reivindicación precedente, en la que la actividad enzimática disminuye a lo sumo 5% durante un periodo de al menos 6 meses, cuando la composición se almacena en un envase cerrado a una temperatura de 4°C en la oscuridad.
15. Envase cerrado que comprende la composición según cualquier reivindicación precedente.
16. Procedimiento para preparar una composición líquida que comprende una proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un caldo de fermentación, conteniendo dicho caldo de fermentación (i) micro-organismos que han producido la proteasa y (ii) sobrenadante que contiene la proteasa;

(b) separar, por separación sólido líquido, sobrenadante del caldo de fermentación;

(c) purificar el sobrenadante separado, para obtener una disolución purificada;

5 (d) añadir uno o más aditivos a la disolución purificada, en el que al menos uno de dichos uno o más aditivos es una sal inorgánica, un polialcohol o un compuesto seleccionado de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato y

(e) filtrar la disolución purificada que contiene dichos uno o más aditivos y

10 en el que la concentración de formiato, acetato, lactato, propionato, malato o fumarato o combinación de los mismos es al menos 0,1 moles/l.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que no se añade compuesto seleccionado de benzoato, sorbato o éster alquílico de para-hidroxibenzoato a la disolución purificada.

15 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, en el que la concentración total de sorbato, benzoato y ésteres alquílicos de para-hidroxibenzoato en la disolución filtrada que resulta de (e) es menor que 0,010 moles/l.

19. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, como un coagulante en la producción de queso.

20 20. Procedimiento para preparar queso, que comprende, (i) complementar la leche con una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para efectuar la coagulación de la leche, en la que se obtiene una cuajada y (ii) transformar la cuajada en queso.