

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 858 527**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/38 (2006.01)
A23J 1/18 (2006.01)
A23J 3/20 (2006.01)
A23C 9/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2002 E 10176987 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 2280065**

(54) Título: **Lactasa purificada**

(30) Prioridad:

04.04.2001 EP 01000102

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

30.09.2021

(73) Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

(72) Inventor/es:

**BECKHOVEN, VAN,RUDOLF FRANCISCUS
WILHELMUSCORNELIS y
PARIDON, VAN, PETRUS ANDREAS**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 858 527 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

Lactasa purificada

Campo del invento

El presente invento se refiere a un procedimiento para la producción de una solución de lactasa.

5 Antecedentes del invento

La lactasa o beta-galactosidasa (EC: 3.2.1.23) es una enzima que puede convertir a la lactosa (con disacáridos) en los monosacáridos glucosa y galactosa. La lactosa está presente en los productos lácteos y más particularmente en la leche, la leche desnatada, la nata y otros productos lácteos. La descomposición de la lactosa se realiza en la pared intestinal del cuerpo humano (y en otros mamíferos) por medio de la presencia natural de la lactasa.

10 Muchos seres humanos (y otros mamíferos) padecen de una intolerancia a la lactosa, cuando la lactasa está ausente o parcialmente ausente en su sistema digestivo. En el caso de que la lactosa sea una parte constituyente del alimento o de la alimentación, una digestión disminuida de lactosa puede conducir a un trastorno intestinal.

Hoy en día, la lactasa es añadida a la leche con el fin de descomponer a la lactosa que está presente. La lactasa puede ser añadida a la leche o bien antes o bien después de una pasterización o esterilización. En general la lactasa será desactivada durante un tratamiento de pasterización o esterilización. Cuando la lactasa es añadida antes de la esterilización, se puede requerir una gran cantidad de lactasa con el fin de reducir el período de tiempo de almacenamiento que transcurre entre la adición y la pasterización o esterilización. Aunque la lactasa es una enzima activa, ha de tenerse en cuenta que la leche es tratada y almacenada generalmente a unas temperaturas comprendidas entre 0 y 8 °C.

20 La otra posibilidad es la adición de la enzima después de una pasterización o esterilización de la leche y antes de envasarla. En este caso, la lactasa puede ser añadida en una cantidad menor, igual a como lo puede ser por lo menos 10 a 24 horas antes de que la leche sea consumida. La enzima puede digerir a la lactosa, que puede estar presente durante el transporte y el almacenamiento en la factoría, en la tienda de venta y en el frigorífico del consumidor.

25 Hay varias maneras de esterilizar a la lactasa, por ejemplo por medio de un tratamiento químico y/o térmico. Sin embargo, a causa de su aplicación en los alimentos o en la alimentación, la filtración en condiciones estériles es una opción preferida.

30 En la revista Voedingsmiddelentechnologie 13 (1980), 23, se ilustra adicionalmente un método que ha sido descrito también en la memoria de patente británica 1477087. La lactasa, que usualmente es usada por la industria de tratamiento de productos lácteos en forma de una solución acuosa, a la que se le pueden añadir uno o más agentes estabilizadores tales como el glicerol, es filtrada antes de su uso. La solución de enzima filtrada es bombeada a través de un filtro estéril y luego inyectada, por intermedio de un dispositivo de dosificación, dentro de una instalación de producción de una leche previamente esterilizada o pasterizada, y luego mezclada con la leche, que subsiguientemente es envasada en condiciones asépticas dentro de unos envases uniformes.

35 Sin embargo, en la práctica, el filtro estéril se bloquea con frecuencia debido a la proteína degradada, quedando unos poli- y oligosacáridos en la solución de enzima a pesar de haber filtrado. De acuerdo con el documento de patente europea EP 145092, dicha degradación aumenta generalmente cuanto más largo sea el tiempo durante el cual la enzima es almacenada antes del uso y puede ser activada por el considerable período de tiempo que transcurre entre la producción de la enzima y su uso en la industria de tratamiento de productos lácteos. La limpieza o el reemplazo de manera repetida de los filtros estériles no es una opción, puesto que el hecho de detener todo el proceso requiere una esterilización antes de comenzar de nuevo.

40 El documento EP 145092 describe un procedimiento para la filtración de lactasa en condiciones estériles dentro del período de tiempo de 14 días desde que ella había sido producida. El documento EP 145092 describe que la lactasa debería ser filtrada en condiciones estériles después de la recuperación y purificación de la lactasa producida por fermentación, pero antes de la formación de unos productos de degradación que son suficientes para obstruir el filtro estéril. No obstante, el planteamiento de filtrar en condiciones estériles una solución de lactasa recientemente producida no satisface la necesidad de una solución de lactasa que pueda ser filtrada en línea y que pueda ser añadida a la leche esterilizada o pasterizada. La lactasa que se ha descrito en el documento EP 145092 se deriva de la levadura *Kluyveromyces* que se usa ampliamente en la industria de productos lácteos. Los polisacáridos son probablemente unas partes constituyentes de las paredes celulares de la anfitriona, que se forman durante el proceso de recuperación.

Mbuyi-Kalala *et al.* Eur. J. Biochem. 178, 437-443 (1988) describen la separación y caracterización de cuatro formas enzimáticas de la forma beta-galactosidasa de *Saccharomyces lactis*. Becerra *et al.* Biotechnology Techniques, vol 12, N.º 3, 1998, 253-256 describen que la purificación a microescala de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* revela que las formas diméricas y tetraméricas son activas. Mahoney *et al.*, Journal of Food Science, vol 43 (1978), 584-591 describen la purificación y propiedades físicocuímicas de la beta-galactosidasa.

Sumario del invento

La presente invención proporciona un proceso para la producción de una solución de lactasa que comprende menos de 10 g/kg de poli y oligosacáridos y que comprende además de 30 a 70 % p/p de un disolvente que es sorbitol o glicerol, y donde dicho proceso comprende producir lactasa en una cepa de *Kluyveromyces*, y donde dicha solución de lactasa es para su uso en un método de producción de leche, comprendiendo el método de producción de leche esterilización por filtración de la solución de lactasa en línea, y donde dicho proceso comprende separar los poli y oligosacáridos presentes en una solución no tratada de lactasa de la solución de lactasa y donde los poli y oligosacáridos se retiran de una solución no tratada de lactasa mediante un proceso cromatográfico donde se utiliza una resina de intercambio aniónico o una resina de intercambio catiónico o un medio de interacción hidrofóbico.

15 La presente invención también proporciona un proceso para producir leche que contiene lactasa que comprende realizar el proceso anterior para la producción de una solución de lactasa, y que comprende además utilizar la solución de lactasa en un método de producción de leche en el que la lactasa se esteriliza por filtración en línea.

Descripción detallada del invento

20 El presente invento se refiere a una lactasa purificada y en particular a unos nuevos procedimientos para la producción de una lactasa libre de poli- y oligosacáridos. La retirada de los poli- y oligosacáridos permite una más fácil esterilización en filtros de la solución de lactasa, puesto que el filtro no resulta bloqueado con poli- y oligosacáridos. Como resultado de ello, una lactasa purificada puede ser esterilizada en filtros "en línea" con un procedimiento de producción de leche, anulando de esta manera la necesidad de que dicho filtro tenga que ser repetidamente desbloqueado.

25 El presente invento proporciona un procedimiento para la producción de una solución de lactasa, que se puede almacenar y que, después del almacenamiento, todavía está libre de compuestos obstrutores tales como poli- y/o oligosacáridos. Preferiblemente, esta solución puede ser almacenada después de una recuperación y una purificación a partir del proceso de fermentación durante por lo menos 15 días, de manera preferible durante más de 30 días, y de manera todavía más preferible durante más de 120 días.

30 El concepto de libre de poli- y oligosacáridos significa que están presentes en la solución de lactasa menos que 10 g/kg de poli- y oligosacáridos. Preferiblemente, están presentes en la solución de lactasa menos que 5 g/kg, más preferiblemente menos que 2 g/kg y de manera sumamente preferible menos que 1 g/kg de poli- y oligosacáridos.

35 La solución de lactasa producida por el presente invento es de manera muy apropiada de filtración en condiciones estériles, puesto que la baja concentración de unos compuestos tales como poli- y oligosacáridos, permite que la solución de lactasa sea filtrada en condiciones estériles con menos posibilidad de obstruir al filtro. El filtro se puede usar durante un largo período de tiempo, preferiblemente por lo menos durante uno que es cuatro veces más largo que en el caso del uso de una solución de lactasa que no está sustancialmente libre de polisacáridos.

40 La solución de lactasa es preferiblemente una solución acuosa de lactasa. La solución de lactasa contendrá en general de 10 a 100.000 ULN/g, de manera preferible de 100 a 10.000 ULN/g (ULN es el acrónimo de Unidades de Lactasa Normales).

45 La solución de lactasa puede comprender uno o más disolventes u otros aditivos, que llevan a la actividad de la enzima hasta el nivel deseado y que además pueden estabilizar a la enzima. Unos disolventes apropiados son sorbitol y glicerol. Estos disolventes pueden ser añadidos en una concentración de 30 a 70 % p/p, de la solución de lactasa. Unos aditivos apropiados, que estabilizan a la enzima, son por ejemplo una lactosa hidrolizada, glucosa, manitol y unos tampones salinos. De acuerdo con una realización del presente invento, la solución de lactasa, que está generalmente libre de compuestos obstrutores, tales como unos polisacáridos, se puede obtener purificando a una solución de lactasa sin tratar en un proceso de cromatografía, en el cual todos los compuestos responsables de la obstrucción de un filtro son separados a partir de la solución de lactasa.

50 Incluso en los casos en los que la solución de lactasa sin tratar es almacenada durante por lo menos 15 días o incluso durante más de 30 días antes de realizar el proceso de cromatografía, la solución de lactasa purificada puede todavía ser filtrada en condiciones estériles sin que el filtro resulte obstruido.

Inesperadamente, el uso de una cromatografía hace posible retirar todos los compuestos (poli- y oligosacáridos, proteínas, péptidos, etc.) que pueden obstruir al filtro estéril. Sorprendentemente se encontró que se requería solamente una etapa de cromatografía para retirar todos los polisacáridos y todos los otros compuestos no proteínicos desconocidos, que son responsables de obstruir al filtro estéril. Se ha de tener en cuenta que la solución de lactasa,

5 aunque haya sido recuperada y purificada a partir del caldo de fermentación, contendrá por lo menos unos polisacáridos, que son convertidos, por lo menos parcialmente, en unos productos de degradación. Una concentración típica de polisacáridos en unas soluciones de lactasa sin tratar es la de 10 a 100 g/kg.

Las preparaciones comerciales de lactasa pueden contener de 40 a 60 % p/p (peso/peso) de glicerol. Se espera, por lo tanto, que la viscosidad de la preparación de lactasa esté relacionada con la cantidad de glicerol que esté presente.

10 Sin embargo, los autores del invento hemos encontrado que la viscosidad de una preparación de lactasa puede ser reducida de una manera significativa por medio de la retirada de polisacáridos a partir de la preparación de lactasa. Esta reducción de la viscosidad hace posible hacer pasar a la preparación de lactasa a través del filtro estéril con una reducida diferencia de presiones o con una similar diferencia de presiones en el filtro, con el fin de permitir que pase a través del filtro más cantidad de la solución de lactasa, en comparación con una solución de lactasa que no haya sido purificada de acuerdo con el presente procedimiento. El invento proporciona un procedimiento para la producción de soluciones de lactasa que comprenden de 30 a 70 % p/p y más preferiblemente de 40 a 70 % p/p de glicerol que tiene una viscosidad de menos que 100 mPa, preferiblemente de menos que 80 mPa e incluso más preferiblemente de menos que 60 mPa.

15 Una separación de los compuestos obstrutores a partir de la solución de lactasa se puede conseguir fijando a la lactasa en una resina cromatográfica apropiada. Unas resinas apropiadas, que se pueden usar para separar los compuestos obstrutores a partir de una solución de lactasa, son, por ejemplo, unas resinas intercambiadoras de aniones y de cationes. Los intercambiadores de aniones, por ejemplo el Q-sepharose, se pueden usar cuando una solución de lactasa, a un pH situado por encima del punto isoeléctrico, es aplicada a un intercambiador de iones equilibrado en el mismo pH. La lactasa, pero no los componentes obstrutores, está fijada a la resina. La lactasa fijada puede ser eluida (desorbida), liberada de compuestos obstrutores, a partir de la resina aumentando la fuerza iónica y/o cambiando el pH de la resina intercambiadora de aniones. El cambio en la fuerza iónica y/o en el pH durante una desorción o elución puede tener lugar bajo un gradiente escalonado o continuo.

20 La misma separación se puede conseguir con un intercambiador de cationes, por ejemplo el SP-sepharose, según la cual la preparación de lactasa es aplicada a la resina por debajo de su punto isoeléctrico. Los autores del invento hemos encontrado que una cromatografía con HAP (hidroxiapatito) no proporciona ninguna separación de los poli- y oligosacáridos a partir de la lactasa. Una posible explicación de esto puede consistir en que los poli- y oligosacáridos están también fijados a la matriz de HAP,

25 Unas resinas preferidas son unos medios de interacción hidrofóbica (HIC, acrónimo de Hydrophobic Interaction Chromatography). En un medio de HIC, la separación se puede obtener basándose en las diferencias en cuanto a hidrofobicidad. Están disponibles diferentes resinas de HIC que contienen diferentes ligandos, por ejemplo etilo, propilo, butilo, fenilo y octilo. Por aplicación de una solución acuosa de lactasa en unas condiciones que permiten la fijación de lactasa a la resina, es posible separar a la lactasa con respecto de los compuestos obstrutores.

30 Un protocolo típico para favorecer la fijación o absorción a una resina de HIC consiste en aplicar una solución acuosa de lactasa bajo un pH no desnaturalizante y con una fuerza iónica relativamente alta a la resina. La alta fuerza iónica se puede obtener añadiendo ciertas sales a la solución de lactasa. Unas apropiadas sales son, por ejemplo, el sulfato de amonio, el cloruro de sodio y el sulfato de sodio.

35 Despues de la etapa de fijación o absorción, la lactasa puede ser eluida o desorbida disminuyendo la fuerza iónica. El cambio en fuerza iónica y/o en pH durante la elución o desorción puede tener lugar bajo un gradiente escalonado o continuo. Otras resinas apropiadas son, por ejemplo, unos medios de filtración a través de un gel y unos medios hidrofóbicos de inducción de cargas eléctricas (por una combinación de una HIC y una cromatografía con intercambio de iones).

40 La lactasa usada en el presente invento se produce mediante una cepa de *Kluyveromyces*, más preferiblemente *K. lactis* o *K. fragilis*. Dicha lactasa se purifica de acuerdo con el invento dando como resultado una solución de lactasa que es fácil de esterilizar. La retirada de todos los compuestos que son responsables de obstruir al filtro estéril es muy sorprendente, puesto que, después del proceso de fermentación, la lactasa, que está siendo recuperada y purificada, puede contener unos polisacáridos, que son convertidos por lo menos parcialmente en unos productos de degradación. Por lo tanto, se cree que la proteasa y otras proteínas contaminantes también presentes en una solución de lactasa se retiran en la etapa de cromatografía. El filtro estéril, usado para esterilizar a la solución de lactasa, está presente por lo general en el procedimiento de producción en línea de leche. El tratamiento de filtración en condiciones estériles se lleva a cabo preferiblemente en línea con respecto al procedimiento de producción de leche, según el cual se usan uno o más filtros de membranas. Un apropiado filtro estéril es, por ejemplo, un filtro de membranas que tiene un tamaño de poros de 0,22 µm.

La solución de lactasa producida de acuerdo con el invento se usa ventajosamente en la preparación de una leche pasterizada o higienizada.

Ejemplo 1

5 El ejemplo describe un típico proceso cromatográfico de purificación de lactasa usando la fenil sepharose LS como resina cromatográfica.

El producto comercial Maxilact® 5000 LX (obtenible DSM, Países Bajos) que contiene 5.000 ULN/g se diluyó en 5 veces con agua desmineralizada, se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 1 M después de lo cual el pH fue corregido a 7,5.

10 Una muestra de 20 ml fue aplicada a una columna HiPrep phenyl 16/10 con una capacidad de 20 ml que tenía un diámetro de 16 mm y una longitud de 10 cm, con un caudal lineal de 150 cm/h. La columna se equilibró con sulfato de amonio 1 M en un Tris 100 mM de pH 7,5. Después de haberla cargado, la columna se lavó con un tampón de equilibración con un caudal de 150 cm/h hasta que se alcanzó la línea de base. Una elución de lactasa se realizó bajo un gradiente escalonado de 150 cm/h (en un Tris 100 mM de pH 7,5). Después de una elución de la lactasa, la solución de lactasa fue desalinizada y concentrada hasta una llegar a una actividad final de aproximadamente 10.000 ULN/g. Despues de un proceso de concentración, la solución de lactasa se formuló con glicerol a una concentración final de 50 % p/p, la actividad final de lactasa después de un proceso de formulación era de aproximadamente 5.000 ULN/g.

15

20 La actividad de lactasa se determinó mediante la hidrólisis del substrato o-nitrofenil- β -galactopiranósido (ONPG) para dar o-nitrofenilo y galactosa. La reacción se terminó mediante la adición de carbonato de sodio. La absorbancia del o-nitrofenilo formado, que era de color amarillo en un medio alcalino, se usó para medir la actividad de la enzima (que se expresa como ULN/g). El proceso ha sido publicado en la obra *FCC, cuarta edición, 1 de Julio de 1996, páginas 801 hasta 802 /Actividad de lactasa (neutra) (β -galactosidasa)*. Los resultados se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1

Muestra	Actividad ULN/g	g/kg de azúcares		Poli- y oligosacáridos g/kg
		antes de la inversión	después de la inversión	
Maxilact LX 5000	5.000	1	57,6	56,6
Lactasa purificada	5.000	< 1	2,21	< 2

25 El contenido de poli- y oligosacáridos se determinó midiendo la cantidad de azúcar libre y la cantidad de azúcar que estaba presente después de la inversión con un ácido de los polisacáridos.

30 Los contenidos de polisacáridos se determinaron por medio de una cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (HPLC acrónico de High Performance Liquid Chromatography). La detección se realizó usando un detector del RI (acrónico de Refraction Index = índice de refracción). La columna usada fue una de BioRad Aminex HPX 87N, con una longitud de 30 cm y un diámetro interno de 7,8 mm, regulada termostáticamente a 85 °C. La fase móvil era una solución de 0,71 g de sulfato de sodio en 1 litro de agua con un caudal de 0,68 ml por minuto.

Se realizaron unos tratamientos previos de dos diferentes muestras, con y sin inversión mediante un ácido. El tratamiento previo de una muestra sin ninguna inversión se realizó pesando inicialmente una muestra de 5 g dentro de un matraz volumétrico con una capacidad de 50 ml, disolviéndola en una fase móvil e inyectando 5 μ l de ella sobre la columna.

35 El tratamiento previo de una muestra con inversión se realizó pesando inicialmente 2 g de una muestra dentro de un tubo de centrífuga, añadiendo 3,00 ml de agua y 2,50 ml de ácido clorhídrico de 2,58 mol/l, calentándola durante 75 minutos a 100 °C y añadiendo 2,50 ml de hidróxido de sodio de 2,58 mol/l. Se inyectaron 5 μ l de la resultante solución sobre la columna.

40 El contenido de glucosa se calculó usando una solución patrón que tenía una concentración de 400 mg de glucosa en 50 ml de una fase móvil. Las concentraciones de trisacáridos, disacáridos y fructosa se calcularon usando un factor de respuesta, en relación con la glucosa.

Ejemplo 2

El ejemplo describe la filtración en condiciones estériles de unas soluciones de lactasa.

Se llenó una jeringa con 1 ml de Maxilact LX 5000, y se colocó un filtro estéril de Millex GV 0.22 µm procedente de Millipore con un área de superficie de 4,91 cm², sobre la parte superior de la jeringa. Después de haber aplicado una presión manual, no era posible filtrar el producto a través del filtro, el hecho de aumentar la presión dio lugar a que el filtro se rompiera.

Otra jeringa se llenó con 1 ml de lactasa purificada formulada con 50 % p/p de glicerol (concentración final), preparada tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, y se colocó un filtro estéril de Millex GV 0.22 µm procedente de Millipore con un área de superficie de 4,91 cm², sobre la parte superior de la jeringa. Después de haber aplicado una presión manual, era sorprendentemente fácil filtrar en condiciones estériles por lo menos 1 ml de la solución de lactasa a través del filtro.

Por lo tanto, el uso de una cromatografía permitió que se retiraran todos los compuestos que pudieran haber obstruido al filtro estéril, y no era problemática una filtración en condiciones estériles del resultado.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe unas mediciones de la viscosidad de unas soluciones de lactasa formuladas.

Se midió la viscosidad tanto del Maxilact LX 5000 comercialmente disponible como de la lactasa purificada que se había formulado con 50 % p/p de glicerol (concentración final), tal como se describe en el Ejemplo 1. El Maxilact comercialmente disponible también contiene 50 % p/p de glicerol.

La viscosidad se midió con un Physica UDS 200 a 25 °C, usando una sonda cónica de MK 21.

La Tabla 2 muestra que la viscosidad de la lactasa purificada que se había formulado a razón de 5.000 ULN/g con 50 % de glicerol (concentración final) disminuye significativamente como resultado de la purificación en la que se retiran todos los compuestos obstrutores.

25

Tabla 2: Resultados de las mediciones de la viscosidad

Producto	Viscosidad mPa velocidad de cizalladura = 100 (s ⁻¹)
Maxilact LX 5000 comercial	170
Lactasa purificada formulada con 50 % de glicerol	40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la producción de una solución de lactasa que comprende menos de 10 g/kg de poli y oligosacáridos y que comprende además de 30 a 70 % p/p de un disolvente que es sorbitol o glicerol, y donde dicho proceso comprende producir lactasa en una cepa de *Kluyveromyces*, y donde dicha solución de lactasa es para su uso en un método de producción de leche, comprendiendo el método de producción de leche esterilización por filtración de la solución de lactasa en línea, y donde dicho proceso comprende separar los poli y oligosacáridos presentes en una solución no tratada de lactasa de la solución de lactasa y donde los poli y oligosacáridos se retiran de una solución no tratada de lactasa mediante un proceso cromatográfico donde se utiliza una resina de intercambio aniónico o una resina de intercambio catiónico o un medio de interacción hidrofóbico.
- 10 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha solución de lactasa es una solución acuosa.
- 15 3. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha solución de lactasa comprende además al menos un aditivo estabilizante.
- 15 4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el aditivo se selecciona entre lactosa hidrolizada, glucosa, manitol y tampones salinos.
- 20 5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la lactasa está contenida en dicha solución de lactasa en una cantidad de 10 a 100.000 ULN/g.
- 20 6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha solución de lactasa comprende de 10 a 70 % p/p de glicerol y tiene una viscosidad de menos que 100 mPa, preferiblemente de menos que 80 mPa.
- 20 7. Un proceso para producir leche que contiene lactasa que comprende realizar un proceso para la producción de una solución de lactasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y que comprende además utilizar la solución de lactasa en un método de producción de leche en el que la lactasa se esteriliza por filtración en línea.