



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 939**

51 Int. Cl.:

C12N 9/58 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 9/58 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12R 1/785 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02100543 .4**

86 Fecha de presentación : **21.05.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1365019**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54

Título: **Producción fermentativa de proteasa microbiana coagulante de la leche.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73

Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72

Inventor/es: **Hensing, Marcus Clemens Marie**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 267 939 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

Producción fermentativa de proteasa microbiana coagulante de la leche.

5 La presente invención se relaciona con un proceso para la producción fermentativa mediante hongos de proteasa coagulante de la leche y con el uso de dicha proteasa en la fabricación de queso.

10 Los métodos tradicionales para fabricar queso incluían el uso de cuajo de ternero para coagular la leche. Debido a una escasez mundial de cuajo de ternero en las últimas décadas, se han investigado fuentes alternativas que provean de enzimas que coagulen la leche. Actualmente, los cuajos microbianos se usan como sustitutos de los cuajos de ternero. Tres importantes fuentes fúngicas ampliamente utilizadas son *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *Endothia parasitica* (a la que se dio el nuevo nombre de *Cryphonectria parasitica*). En general se ha preferido el cuajo de *M. miehei* como sustituto del cuajo verdadero de ternero debido a sus propiedades específicas similares a las del cuajo de ternero [Escobar *et al* Enzyme Microb. Technol. 1993 vol. 15 1009-1013]. *M. miehei* es un zigomiceto termófilo y produce una proteasa ácida con un peso molecular de 34.000-39.000. Esta proteasa ácida manifiesta una actividad coagulante de la leche relativamente alta y una actividad proteolítica específica relativamente baja.

15 Recientemente, se ha divulgado un proceso de fermentación que describe la producción de renina microbiana de *Mucor miehei* en un fermentador alimentado continuamente. En ese documento se explicaron en detalle los efectos del pH del medio, de las velocidades de mezcla y dilución y de la alimentación de la fuente de carbono sobre la actividad coagulante de la leche, y se determinaron los parámetros óptimos para el proceso de fermentación a pequeña escala donde se introduce glucosa continuamente [S. Seker *et al.* 1999, J. Chem. Technol. Biotechnol. 74: 527-532]. Sin embargo, aunque se ha utilizado la proteasa ácida de *Mucor miehei* por más de 20 años en la fabricación industrial de queso, todavía subsisten algunos problemas asociados al proceso de producción industrial (fermentación).

20 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

25 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

30 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

35 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

40 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

45 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

50 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

55 En la bibliografía, se han estudiado en profundidad los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción a pequeña escala (hasta 5 l). Se concluyó a partir de varios estudios que *M. miehei* necesita una fuente compleja de nitrógeno, y que esta fuente de nitrógeno en combinación con caseína, afecta positivamente a la producción de la proteasa coagulante de la leche, puesto que se ha descrito que la caseína induce la producción de proteína. Además, se demostró que entre las diferentes fuentes de nitrógeno, el nitrato de amonio únicamente sostuvo una moderada formación de enzima [S. Thakur *et al* 1990]. Por otra parte, la peptona como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo sobre la producción de enzima coagulante de la leche. En general, se prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico a las fuentes de nitrógeno inorgánico como el amoníaco [Mashaly *et al* 1983. Egyptian J. Dairy Sci. 11:255-265]. También se demostró que la presencia de amoníaco en el medio reprimía la actividad de la enzima en ausencia de caseína [Lasure, L.L., *et al.* 1980, Mycologia 72: 83-86]. Estos estudios publicados proponen el uso de una fuente de nitrógeno diferente del amoníaco al desarrollar un proceso de fermentación óptimo para la producción de enzima coagulante de la leche en la producción a pequeña escala.

ES 2 267 939 T3

ción del inóculo, se puede cultivar un inóculo de dicho hongo en un medio nutriente adecuado, indicado como medio de siembra, que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable, una fuente de fosfato asimilable y minerales. A fin de lograr un gran volumen de inóculo, suficiente para comenzar la fermentación semicontinua en el fermentador principal a gran escala o a escala industrial (más de 1 m³), son necesarios varios pasos de propagación del inóculo, cada uno llevado a cabo en un volumen mayor que el del paso anterior, y posteriormente la introducción del inóculo en un fermentador donde se lleva a cabo la fermentación principal.

El medio nutriente del fermentador principal (medio discontinuo) comprende una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y minerales esenciales. La fuente de carbono puede ser la misma o diferente de la utilizada en el medio de siembra. Las fuentes de carbono asimilables pueden ser mono, di o polisacáridos como glucosa, sacarosa, lactosa, o suero de la leche, almidón (de maíz), salvado de trigo, extracto de fécula de malta o formas hidrolizadas de éstos o combinaciones de éstos. Preferentemente, se puede usar glucosa. La concentración presente en el medio discontinuo al comienzo de la fermentación puede ser mayor que 5 g/l. Preferentemente está presente entre 50 y 100 g/l. La introducción de la fuente de carbono asimilable en el fermentador es tal que la concentración en el caldo se mantiene preferentemente menor que 5 g/l durante la producción. Más preferentemente entre 1 y 2 g/l. En una materialización muy preferida de la presente invención, dependiendo del microorganismo utilizado, la fuente de carbono metabolizable se puede mantener en una concentración limitante (p. ej. la concentración de glucosa entre 0 y 1 g/l) para obtener mejores rendimientos.

Las fuentes adecuadas de nitrógeno pueden comprender hidrolizados de levaduras, levadura primaria, harina de soja, harina de semilla de algodón, caseína o hidrolizado de ésta, agua o sólidos de macerado del maíz, peptona, extracto de carne, salvado de arroz, harina de soja y/o proteína de soja. Alternativamente, se pueden usar fuentes de nitrógeno inorgánico como amoníaco o sales de éste, o fuentes de nitrógeno orgánico, como urea y/o aminoácidos. En una materialización preferida de la invención, la fuente de nitrógeno puede ser una combinación de cualquiera de las fuentes de nitrógeno mencionadas anteriormente con amoníaco (agregado por ejemplo como hidróxido o sulfato de amonio) que se mantiene a una concentración de 0,2 a 2 g/l en el caldo de fermentación durante la producción de proteasa coagulante de la leche. Preferentemente la concentración de amoníaco se encuentra entre 0,5 y 1,5 g/l. En la materialización que más se prefiere, el amoníaco se puede usar en combinación con harina de soja, donde la concentración de harina de soja se encuentra entre 2 y 10 g/L.

Aparte de las fuentes de carbono y de nitrógeno asimilables, el medio discontinuo se puede proporcionar con una diversidad de compuestos orgánicos o inorgánicos que suministran azufre, fósforo, hierro, magnesio y otros elementos esenciales para el crecimiento celular, la viabilidad y producción de proteasa coagulante de la leche. Las formulaciones típicas de los medios nutrientes se ilustran en los ejemplos.

Durante la fermentación, la presión del oxígeno disuelto se mantiene a una tasa tal que el oxígeno no es limitante. La aireación del medio de cultivo durante la fermentación se puede lograr haciendo burbujear aire a través del cultivo. La sobrepresión es preferentemente entre 0,5 y 2,0 bar, más preferentemente entre 1,2 y 1,4 bar. Alternativamente o además de la aireación, se puede agitar el caldo. Esto se puede lograr de diversas maneras, aunque a menudo se prefiere la agitación por movimiento. Preferentemente la agitación y/o la aireación deben mantener la presión del oxígeno disuelto por encima del 20% del nivel de saturación del aire. La temperatura del proceso de fermentación puede variar dependiendo el hongo utilizado. Preferentemente, se puede usar una temperatura entre 25 y 47°C. Más preferentemente la temperatura puede ser entre 35 y 42°C.

Preferentemente el pH se debe mantener constante durante todo el proceso de fermentación. Esto se puede lograr utilizando un medio de cultivo amortiguado, o utilizando un equilibrio entre ácido y álcali. Se puede aplicar una alimentación de solución de ácido fosfórico o de NH₄OH. Preferentemente el pH es entre 3,0 y 8,0 preferentemente el pH se mantiene entre 4,5 y 5,5.

De conformidad con la invención la fermentación principal se lleva a cabo usando un método semicontinuo, preferentemente se puede usar un método semicontinuo ampliado. A los efectos de la presente invención el término semicontinuo implica la fermentación en la cual uno o más de los nutrientes se introducen en el medio de cultivo no sólo inicialmente sino también durante la fermentación y el caldo se extrae del tanque de fermentación sólo al final del proceso de fermentación. El término semicontinuo ampliado implica un proceso de fermentación similar al semicontinuo con la diferencia de que el caldo no se retira del tanque de fermentación sólo al final de la fermentación sino que parte del caldo se retira periódicamente del fermentador, preferentemente en un volumen de 5 a 60% del volumen del caldo. La alimentación, para mantener la concentración en un valor preferido se puede producir una o varias veces a intervalos, o continuamente a una tasa constante, descendente o ascendente. Preferentemente, la alimentación se puede aumentar durante el primer período, en tanto que se mantiene constante hasta el final de la fermentación. Puede ser claro para un técnico con experiencia en el tema que la alimentación de nutriente(s) en el fermentador se puede ajustar continuamente dependiendo de la concentración monitoreada de dicho nutriente en el caldo de fermentación, para mantener la concentración deseada.

Después de la fermentación, dicha proteasa coagulante de la leche se recupera del caldo de fermentación y se purifica de acuerdo con los métodos conocidos por los técnicos con experiencia en el tema. La actividad de proteasa se puede medir según el procedimiento de la Federación Internacional de Lechería (IDF-FIL).

ES 2 267 939 T3

La proteasa microbiana coagulante de la leche, preparada según el proceso de la presente invención, se puede usar en la fabricación de quesos madurados como los quesos tipo Cheddar, el queso suizo y otros llamados quesos duros y blandos, y para otros tipos de quesos donde se usa una preparación coagulante de la leche.

5 Ejemplo 1

Producción fermentativa de proteasa microbiana coagulante de la leche

10 Para la preparación del inóculo, se diluyó un mililitro de un cultivo sobrecongelado de *Rhizomucor miehei* NRRL-A13042 en 9 mililitros de una solución fisiológica de sal (0,8% de NaCl en agua desmineralizada). Se sembró 1 ml de esta suspensión sobre un agar inclinado de PDA preparado en un matraz en agitación (preparación del PDA 39 g/l de agar papa dextrosa).

Componentes	Fermentación 1 (comparativa)		Fermentación 2	
	Medio discontinuo	Medio de alimentación	Medio discontinuo	Medio de alimentación
Glucosa	50	100	50	100
Harina de soja	50	65	50	20
Almidón hidrolizado	40	-	-	-
NH ₄ OH	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	-	2	-
KH ₂ PO ₄	4	5	4	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1
Ácido cítrico	1	1	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	1	1	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1
MnSO ₄ .1H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,01
Antiespumante	0,2	0,2	0,2	0,2

50 Los agares inclinados se incubaron durante 4 días a 39°C. Las esporas formadas se cosecharon agregando 100 ml de agua que contenía 1 g/l de Tween 80 y perlas de vidrio, seguido de agitación suave del matraz. Se agregaron 20 ml de la suspensión de esporas a un matraz de 1 litro en agitación que contenía 200 ml del medio de siembra siguiente (glucosa.1 H₂O 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, harina de soja 15 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l con un pH de 6,2). El matraz en agitación se incubó durante 30 horas en un agitador rotatorio a 39°C a 250 rpm. Se realizaron varias rondas de aumento de la escala para sembrar el fermentador principal (3.000 l).

55 La fermentación principal para la producción de proteasa coagulante de la leche se realizó en una fermentación semicontinua ampliada en un fermentador de una planta piloto de 3.000 litros. El medio discontinuo para la fermentación principal y el medio de alimentación contenían los componentes siguientes (g/kg) para los procesos posteriores de fermentación comparativa (Fermentación 1) y de la presente invención (Fermentación 2). En la Fermentación 2, próxima a la alimentación se introdujo por separado una alimentación de hidróxido de amonio puro (14 N) en el fermentador, a una tasa tal que la concentración de amoníaco en el caldo se mantuvo a 1,5 g/l.

60 Se emprendieron las alimentaciones (tanto del medio de alimentación como la alimentación de hidróxido de amonio) cuando la concentración de glucosa en el caldo estuvo por debajo de 5 g/l. Se controló la tasa de alimentación de manera que la concentración de glucosa se mantuviera a 1 g/l. En un ejemplo comparativo no se emprendió ninguna alimentación de hidróxido de amonio por separado, en tanto que en el ejemplo que muestra la presente invención se controló una alimentación de hidróxido de amonio separada de manera que la concentración de amoníaco se mantu-

ES 2 267 939 T3

viera aproximadamente a 1,5 g/l. Se hicieron retiros por lotes después de 48 horas cada 12 horas de modo que el peso del fermentador se llevó a 1.800 kg. La fermentación principal se llevó a cabo durante 140 horas. Se tomaron muestras para detectar enzima coagulante de la leche aproximadamente cada 20 horas hasta el final de la fermentación.

5 El pH se controló a 5,25 +/- 0,25. La temperatura se mantuvo a 39°C. Se fijaron la aireación y la agitación para mantener una fermentación aeróbica. La actividad coagulante de la leche se midió según el procedimiento de la Federación Internacional de Lechería. El rendimiento relativo de proteasa coagulante de la leche en la fermentación comparativa se fijó en 100%. Se observó un mejoramiento en el rendimiento cuando se aplicó el proceso de fermentación de la invención actual, puesto que se determinó que el rendimiento relativo variaba desde 2,25 veces el rendimiento medido
10 en la fermentación comparativa durante las primeras 40 horas hasta 1,50-1,75 veces durante el período desde 60 a 140 horas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 267 939 T3

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una proteasa coagulante de la leche, que comprende:

- 5 a) fermentar un hongo en un medio nutriente que comprenda una fuente de nitrógeno asimilable usando un método semicontinuo, y
- b) mantener la concentración de amonio entre 0,2 y 2 g/l, y
- 10 c) recuperar dicha proteasa coagulante de la leche.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho hongo es una cepa seleccionada del grupo compuesto de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica*.

15 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el proceso semicontinuo es un proceso semicontinuo ampliado, con retiros por lotes de parte del caldo de fermentación.

20 4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se lleva a cabo en un fermentador de más de 1 m³.

25 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde se introduce hidróxido de amonio para mantener la concentración de amonio.

30

35

40

45

50

55

60

65