

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 794

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20

(21) PV 5306-88.N
(22) Přihlášeno 26 07 88

(40) Zveřejněno 11 04 89
(45) Vydáno 29 06 90

(75)
Autor vynálezu

CIKÁNEK DANIEL ing., BENEŠOV,
BŘEZINA PAVEL doc. ing. CSc.,
PLOCKOVÁ MILADA ing. CSc., PRAHA,
KOPEČNÝ JAN ing. CSc., ŘÍČANY,
POKORNÁ LIBUŠE RNDr., KLDNO

(54)

Mutantní kmen pro výrobu tvarohových
sýrů *Brevibacterium linens*

(57)

Mutantní kmen *Brevibacterium linens*,
sb.č. Laktoflora 201 se zvýšenou aminopep-
tidasovou aktivitou je určen pro výrobu
tvarohových sýrů a sýrů zrajících pod ma-
zem.

Vynález se týká mutantního kmene *Brevibacterium linens*, používaného v mlékárenské výrobě v technologii tvarohových sýrů a sýrů zrajících pod mazem s cílem zlepšení jejich organoleptických vlastností a urychlení zrání.

Brevibacterium linens Breed (syn. *Bacterium linens* Weig - mann) se běžně vyskytuje v přírodě a byl izolován z různých přírodních materiálů. Zvýšeného výskytu *Brevibacterium linens* v určitých oblastech, například Olomoucko, se již od 15. století využívalo k výrobě tvarohových sýrů zrajících od povrchu dovnitř pod vrstvou oranžového mazu tvořeného oxidační a proteolytickou mikroflorou, jejíž důležitou složkou je *Brevibacterium linens*. K přenosu zrační mikroflory na nové sýry docházelo vzdušnou cestou, přenosem z výrobního zařízení a v neposlední řadě i samotnými pracovníky ve výrobě. Od 50. let našeho století, kdy dochází k postupně změně výrobních podmínek, centralizace výroby, zavádění strojů se v odborné literatuře (Olšanský Č.: Všeobecná a mlékařská mikrobiologie, SNP, Praha 1958) hovoří o nutnosti ošetřování sýrů čistými mlékařskými kulturami.

V důsledku zhoršené kvality mléka a z toho vyplývající snížené kvality průmyslového tvarohu - hlavní suroviny pro výrobu Olomouckých tvarůžků - je nezbytné použít pro zrání sýrů kultury s nejvhodnějšími vlastnostmi, aby se neprodlužoval zrační proces. *Brevibacterium linens* působí především v sekundární fázi zrání a svojí intenzivní proteolytickou činností štěpí mléčnou bílkovinu kasein na kratší bílkovinné štěpy - peptidy, z nichž dále pomocí exogenních proteinas odštěpuje jednotlivé aminokyseliny, které se podle Pala a kol. (Další výsledky štúdia chutnosti Olomouckých tvarůžkov V; Zborník III. symposia o aromatických látkách v poživatinách, Banská Bystrica 1977), mimo těkavých mastných kyselin a těkavých sírných sloučenin, hlavní měrou podílejí na typickém aromatu sýrů.

Ve sbírce mikrobiologických kultur Vývojového závodu mlékárenského průmyslu v Praze - Vokovicích jsou v současné době uloženy tři kmeny *Brevibacterium linens* sb. č. Laktoflora 200, sb. č. Laktoflora 980 a sb. č. Laktoflora 1010. Kmen 200 se donedávna dodával jako součást tzv. mazové kultury téměř do všech mlékárenských závodů s výrobou sýrů zrajících pod mazem. Svými proteolytickými vlastnostmi však již zcela neodpovídal současným potřebám mlékárenských závodů. Z deseti hodnocených kmenů *Brevibacterium linens* se jako nejvhodnější z hlediska produkce proteolytických enzymů jevil kmen sb. č. Laktoflora 980. Přesto však jeho produkce proteolytických enzymů nebyla na žádané úrovni.

Uvedené nevýhody odstraňuje mutantní kmen *Brevibacterium linens*, Laktoflora 201 se zvýšenou aminopeptidasovou aktivitou, uložený ve Sběrce mikrobiologických kultur Vývojového závodu mlékárenského průmyslu Laktoflora, Praha-Vokovice, Ke dvoru 12.

Mutantní kmen *Brevibacterium linens*, Laktoflora 201 podle vynálezu byl získán z kmene *Brevibacterium linens*, sb. č. Laktoflora 980 pomocí UV záření. Mutagenní účinek UV záření spočívá v tvorbě kovalentních vazeb mezi sousedními thyminy v molekule DNA za vzniku pyrimidinových dimerů (Cudlín J.: Vybrané metody v mikrobiologii, Academia, Praha 1981). K mutaci byla použita baktericidní lampa, výkon 15 W, firmy Philips, Nizozemí. Odstředěné a promyté buňky *Brevibacterium linens*, sb. č. Laktoflora 980 byly suspendovány v 50 mmol.l⁻¹ sterilního fosfátového pufru o pH 7,0 a ozářeny UV světlem ze vzdálenosti 30 cm. Buňky byly ozařovány na Petriho miskách po dobu 30, 60 a 90 sekund, za nepřetržitého třepání suspenze. Po ozáření byly jednotlivé suspenze naředěny do fyziologického roztoku a naočkovány na Petriho misky s kompletním agarem. K zamezení fotoreparace probíhala kultivace prvních 24 hodin za tmy. Ze 135 mutantních štěpů bylo vybráno a dále sledováno 8 mutantních kmenů. Nejlepší proteolytické vlastnosti vykazoval mutantní kmen M2 (ozáření 60 s). Mutace byla provedena v lednu 1986. 14 dní po mutaci vykazoval

266794

kmen M2 160% extracelulární aminopeptidasové aktivity původního rodičovského kmene. Po 8,5 měsících to bylo 185%, po 11,5 měsících 160%, po 27 měsících 135% aminopeptidasové aktivity původního kmene, tj. $2,1 \text{ nkat.} \cdot \text{mg}^{-1}$ (vyjádřeno v aminopeptidasové aktivitě vztažené na obsah bílkovin produkovaných do media). Pro určení aminopeptidasové aktivity byla použita metoda založená na spektrofotometrickém stanovení žlutého 4-nitroanilinu při 425 nm, který aminopeptidasy uvolňují z L-leucyl-4-nitroanilidu (Lorand L.: *Methods of Enzymology*, vol. XIX, Proteolytic enzymes. Academic Press, New York 1976). Proteinasová aktivita mutantního kmene je srovnatelná s aktivitou původního kmene 980. Morfologie buněk a ostatní biochemické znaky kultury jsou shodné s rodičovským kmenem 980. Mutantní kmen byl dne 8. 6. 1988 uložen ve Sběrce mikrobiologických kultur Vývojového závodu mlékárenského průmyslu Laktoflora, Praha-Vokovice, pod názvem *Brevibacterium linens*, sb. č. Laktoflora 201.

Způsob využití získaného kmene *Brevibacterium linens*, sb. č. Laktoflora 201 lze blíže ukázat na několika příkladech.

Příklad 1

Aplikace na Olomoucké tvarůžky

Do hnětače bylo spolu s 500 kg tvarohu nadávkováno příslušné množství zracích solí, dle titrační kyselosti, chloridu sodného a pitné vody dle sušiny tvarohu, do níž bylo přidáno 10 ml suspenze kvasinky *Candida valida*, obsahující 10^{10} až 10^{11} buněk v 1 ml. První fáze zrání probíhala v sušárně při teplotě 23°C až 24°C . Třetí den po formování byly tvarůžky vykoupány v pitné vodě a na odkapním páse postříkány pneumatickou pistolí 120 ml zředěné suspenze *Brev. linens*, sb. č. Laktoflora 201 obsahující 10^6 až 10^9 buněk v 1 ml. Ředění bylo provedeno 0,9% solným roztokem v poměru 1:5. Dále zrály tvarůžky ve zracích místnostech v bednách při 21°C a po 7 dnech od formování byly zabaleny. Současně s těmito tvarůžky byly naprosto stejným způsobem vyrobeny tvarůžky s použitím původního kmene *Brev. linens*, sb. č. Laktoflora 980. Senzoricky byl prokázán výrazný rozdíl mezi těmito druhy Olomouckých tvarůžků. Tvarůžky vyrobené s pokusným kmenem *Brev. linens*, sb. č. Laktoflora 201 byly při preferenčním testu hodnoceny jako prokazatelně chutnější než tvarůžky vyrobené s kmenem *Brev. linens*, sb. č. Laktoflora 980.

Příklad 2

Aplikace na desertní sýry

Jihočeský sýr měkký zrající byl vyroben podle směrného technologického postupu (Směrné technologické postupy, Mlékárenský průmysl koncern Praha, 1987). Po vysolení byly sýry ošetřeny suspenzí kvasinky *Candida valida* a zrály 2 dny při teplotě 19 až 20°C a relativní vlhkosti vzduchu 90%. Třetí den po vysolení byly sýry ošetřeny mlhovým postříkem solným roztokem, koncentrace 9% hmot. NaCl s přídatkem suspenze kultury *Brev. linens*, sb. č. Laktoflora 201 v množství 10 ml koncentrátu obsahujícího 10^{10} až 10^{11} buněk v 1 ml na 100 l solného roztoku. Takto ošetřené sýry zrály při teplotě 14 až 16°C a relativní vlhkosti 95% 12 dnů. Během této doby byly ještě 2krát ošetřeny kulturou *Brev. linens*. V případě ručního ošetřování sýrů se suspenze *Brev. linens* ředí v poměru 1:200, tj. 50 ml suspenze na 10 litrů solného roztoku. Senzorickou analýzou byl zjištěn vysoký stupeň prozrání pokusných sýrů. Preferenčním testem byly hodnoceny pokusné sýry jako chuťově lepší oproti desertním sýrům vyrobeným s kmenem *Brev. linens*, sb. č. Laktoflora 980.

266794

PŘ E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Mutantní kmen pro výrobu tvarohových sýrů *Brevibacterium linens*, Laktoflora 201 se zvýšenou aminopeptidasovou aktivitou.