

URZĄD
PATENTOWY
PRLPatent dodatkowy
do patentu

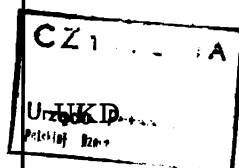
Kl. 6 a, 22/04

Zgłoszono: 23.XI.1966 (P 117 534)

Pierwszeństwo: 2.XII.1965 dla zastrz. 1
i 2
Wielka
Brytania

MKP C 12 d 13/10

Opublikowano: 31.X.1969 r.



Twórca wynalazku: inż. Knud Aunstrup

Właściciel patentu: Novo Terapeutisk Laboratorium A/S, Kopenhaga
(Dania)

Sposób otrzymywania enzymu ścinającego mleko

1

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania enzymu ścinającego mleko.

Przy produkcji sera konieczne jest ścinanie mleka w celu oddzielenia kazeiny od serwatki. Dotychczas używa się do tego enzym zwany podpuszczką, który wydziela się z żołądków cielęcych.

Ze względu na proces dojrzewania sera szczególne znaczenie dla uzyskania dobrych wydajności sera ma fakt niskiej aktywności proteolitycznej podpuszczki, która powoduje znikome rozpuszczanie się kazeiny w procesie otrzymywania i dojrzewania sera.

Podpuszczka cielęca nadaje się dobrze do ścinania mleka. Należy jednak przewidywać, że zapotrzebowanie na ten enzym rychło przekroczy możliwości produkcji podpuszczki z żołądków cielęcych. Dlatego też podejmowane są wysiłki w kierunku znalezienia enzymów odznaczających się zdolnością ścinania mleka, a równocześnie niską zdolnością rozkładania białka.

Istnieje cały szereg mikroorganizmów, które wytwarzają proteiny ścinające mleko, jednak większość ich rozkłada również w wysokim stopniu białko. Wpływa to nader ujemnie na wydajność sera, a równocześnie prowadzi do powstawania w czasie dojrzewania sera produktów rozkładu kazeiny (peptydy), które odznaczają się gorzkim smakiem. Dotyczy to na przykład proteinaz wydzielonych z *Bacillus subtilis* i *Aspergillus saitoi*.

2

Enzym wyodrębniony z grzybka *Mucor pusillus* odznacza się korzystniejszym stosunkiem zdolności ścinania mleka i rozkładu białka, jednakże ten mikroorganizm nadaje się raczej do hodowli w warunkach powierzchniowych, gdyż w wyniku hodowli głębinowej otrzymuje się go z niską wydajnością.

Według wynalazku, ścinający mleko enzym można otrzymać tanio i z dużą wydajnością przez hodowlę grzybka *Mucor miehei* Cooney et Emerson względnie jego naturalnych lub sztucznych odmian lub mutantów na odpowiednio dobranym podłożu.

Wprawdzie według wynalazku można stosować zarówno hodowlę głębinową jak i powierzchniową, ale korzystniejsze wyniki uzyskuje się na ogół w warunkach głębinowych.

Wspomniany wyżej nowy szczep *Mucor* wyizolowano z kompostu pobranego w Kopenhadze we wrześniu 1965 r. W wyniku badań przeprowadzonych w Centraalbureau voor Schimmelculturen, Baarn, Holandia, określono przynależność szczepu do grupy *Mucor miehei* Cooney et Emerson. Szczep zdeponowano we wspomnianej instytucji pod podanym wyżej numerem CBS.

Morfologiczna charakterystyka nowego szczepu *Mucor* CBS 370,65 przedstawia się następująco:

Strzępki: krótkie, wysokie na 2—3 mm, początkowo białe, następnie mysio-

- szare do barwy ciemnej mysioszarej;
- Sporangiofory: średnica 6—10 mikronów, rozgałęzione sympodialnie;
- Sporangia: kuliste o średnicy 25—60 mikronów, ścianki porośnię krótkowłosą szczecinką;
- Kolumelle: od prawie kulistych do owalnych o średnicy 20—40 mikronów;
- Sporangiospory: bezbarwne, prawie kuliste do eliptycznych, 3—5 × 4—6 mikronów;
- Zygospory: liczne, prawie kuliste, brodawkowate, we wczesnych stadiach rozwoju żółtawe do czerwono-brązowych, czarnawe w stanie dojrzałym, o średnicy 30—45 mikronów, wytwarzane przez grzybnie homotaliczną;
- Azygospory: obecne;
- Pączki: nie stwierdzono;
- wzrost: zachodzi w temperaturze 30—55°C, a bardzo szybko w temperaturze 40°C.

Niżej podane przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku, przy czym przykłady I—IV dotyczą hodowli szczepu *Mucor miehei* CBS 370,65 w warunkach głębinowych, przykład V dotyczy hodowli tego szczepu w warunkach powierzchniowych, a przykład VI omawia zdolność wytwarzania enzymu ścinającego mleko przez inne szczepy grzybka *Mucor miehei* w porównaniu z odpowiednią zdolnością szczepu M.m. CBS 370,65.

Przykład I. Doświadczenie w kolbach wstrząsanych.

Zastosowano następujące podłoże:

skrobia ziemniaczana	40 g/litr
mąka sojowa	30 g/litr
jęczmień mielony	100 g/litr
węglan wapnia (CaCO ₃)	5 g/litr
olej sojowy	0,5 ml/litr

Do 3 kolb Erlenmeyera o pojemności po 500 ml wiano po 100 ml podłoża o powyższym składzie, po czym zaszczipiono je zawiesziną sporów *Mucor miehei* Cooney et Emerson CBS 370,65. Następnie kolby umieszczono na wstrząsarce i wytrząsano je w ciągu 7 dni w temperaturze 30°C. Następnie odsączono grzybnie i oznaczono aktywność przesączu metodą Kunitza (J. Gen. Physiol. 18 (1935) 459). Uzyskano następujące wyniki:

Kolba I: 15800 jednostek podpuszczki Kunitza/litr
Kolba II: 17700 jednostek podpuszczki Kunitza/litr
Kolba III: 15700 jednostek podpuszczki Kunitza/litr

Przykład II. Doświadczenie w skali półtechnicznej.

W zbiorniku zaszczepowym przygotowano podłoże o składzie:

skrobia ziemniaczana	2 kg
mąka sojowa	1,5 kg
mąka jęczmienna	5 kg
amylaza bakteryjna Novo 5000 SKB	5 g
węglan wapnia (CaCO ₃)	500 g
woda	około 40 litrów

Mieszaninę podgrzano do temperatury około 70°C i utrzymywano w tej temperaturze w ciągu około 30 minut. Następnie ogrzano mieszaninę do

wrzenia i utrzymywano w ciągu 90 minut w temperaturze 120°C przez wprowadzenie żywej pary, aż do uzyskania objętości około 50 litrów po schłodzeniu. Po ochłodzeniu do temperatury 34°C podłoże zaszczipiono sporami pobranymi z kolby Fernbacha zawierającej agar YPPSS (Thermophilic Fungi Cooney and Emerson, Londyn, 1964) o następującym składzie:

ekstrakt drożdżowy	4 g
kwaśny fosforan potasu (K ₂ HPO ₄)	1 g
siarczan magnezu (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0,5 g
skrobia rozpuszczalna	15 g
agar	20 g
woda	1000 ml

Zawartość kolby Fernbacha zaszczipiono liofilizowaną kulturą *Mucor miehei* Cooney et Emerson CBS 370,65 i inkubowano w temperaturze 40°C w celu wytworzenia sporów. Po zaszczipieniu rozpoczęto mieszanie (240 obr./min) i napowietrzanie (60 litrów/min.). Fermentację prowadzono w ciągu 48 godzin aż do zaobserwowania dobrego wzrostu. Następnie przeniesiono zawartość zbiornika do głównego zbiornika fermentacyjnego, który zawierał podłoże o składzie:

skrobia ziemniaczana	8 kg
mąka sojowa	6 kg
jęczmień mielony	20 kg
amylaza bakteryjna Novo 5000 SKB	25 g
węglan wapnia (CaCO ₃)	2 kg

Podłoże podgrzano do wrzenia i wysterylizowano żywą parą tak jak poprzednio podłoże w zbiorniku zaszczepowym, z tym, że końcowa objętość wynosiła tutaj około 200 litrów.

Po zaszczipieniu rozpoczęto mieszanie (400 obr./min.) i napowietrzanie (0,2 m³/min.) dodając w razie potrzeby olej sojowy jako środek przeciwpianujący. W czasie fermentacji wartość pH roztworu była stała i wynosiła 6,5. Po 129 godzinach fermentacji ciecz kulturowa zawierała ścinający mleko enzym w ilości 2580 jednostek podpuszczki Kunitza na liter.

Przykład III. Dodatkowe doświadczenia w kolbach wstrząsanych.

Do doświadczeń posłużono się kolbami Erlenmeyera o pojemności po 500 ml, z których każda zawierała 100 ml podłoża o składzie podanym w tablicy. Kolby zaszczipiono w temperaturze 30°C i wstrząsano na wstrząsarce obrotowej (240 obr./min.) w okresach czasu podanych w tablicy.

Materiałem szczepiącym była zawieszina sporów uzyskana przez hodowlę szczepu *Mucor miehei* Cooney et Emerson CBS 370,65 na agarze YPPSS w temperaturze 40°C w ciągu 2—3 dni i wyługowanie sporów sterylizowaną wodą. Użyty do tego celu agar YPPSS miał ten sam skład co powyżej.

Aktywność enzymu ścinającego mleko oznaczono metodą Kunitza i wyrażono w jednostkach podpuszczki Kunitza.

Składniki podłoża podano w tablicy w gramach/litr. W każdym podłożu skrobię rozkładano przed sterylizacją przy użyciu amylazy bakteryjnej.

W doświadczeniach prowadzonych na skalę półtechniczną uzyskuje się wydajności tego samego rzędu co w powyższych doświadczeniach w kolbach wstrząsanych.

Tablica

Podłoże nr	95	97	05	25	26	55	62	63	64
Mąka ziemniaczana	40	40		40	40	40	40	40	40
Mąka sojowa	30	30	30	30	30	30	20	20	20
Jęczmień mielony	100		100	100	50	100	100	100	100
Kukurydza mielona		100			50				
Kielki kukurydziane mielone							10		
Mąka żółtego groszku								10	
Mąka ryżowa			40						
Soludry									10
Na ₂ SO ₄	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CaCO ₃	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KH ₂ PO ₄	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Aktywność enzymu (jedn. podpuszczki Kunitza/ml)									
Po 6 dniach inkub.	13,5	9,7	11,5	13,6	13,6	12,0	2,6	7,1	4,9
po 7 „ „	15,4	10,7	11,9	19,2	17,8	13,2	13,3	14,8	14,0
po 8 „ „	17,2	14,6	13,8	21,2	18,2	14,6	12,9	16,7	15,4
pH po									
6 dniach inkub.	6,1	6,1	7,0	6,1	6,0	6,2	6,1	6,2	5,9
7 „ „	6,9	7,1	6,8	6,5	6,7	6,8	6,0	6,4	6,3
8 „ „	7,0	7,2	7,5	6,9	6,8	6,9	6,7	6,2	6,3

5

Przykład IV. W celu dalszego zilustrowania wynalazku otrzymano enzym ścinający mleko raz przy użyciu *Mucor pusillus* (dostarczanego przez Centraalbureau voor Schimmelculturen, Baarn, Holandia), a następnie przy użyciu szczepu *Mucor miehei* CBS 370,65. W pierwszym wypadku otrzymano enzym w ilości 300 jednostek podpuszczki Kunitza/litr (podłoże nr 95 podane w tablicy w przykładzie III), w drugim natomiast w ilości około 10000 jednostek podpuszczki Kunitza/litr lub nawet znacznie więcej. Przy użyciu podłoża zawierającego 10% mleka chudego, 1% glukozy, 0,1% ekstraktu drożdżowego i 0,005 M NaCl uzyskano następujące wyniki:

Mucor pusillus: 900 jednostek podpuszczki K./litr
Mucor miehei CBS 370,65: 5500 jednostek podpuszczki K./litr

Przykład V. Hodowla w warunkach powierzchniowych.

W Kolbie Erlenmeyera o pojemności 500 ml umieszczono 25 g mieszaniny otrąb pszenicznych z wodą (1:1) i poddano sterylizacji. Sterylizację kolby z zawartością wykonano przez ogrzewanie

6

w temperaturze 120°C w ciągu 45 minut. Następnie ochłodzono kolby do temperatury 40°C i zaszczipiono sporami *Mucor miehei* Cooney et Emerson, szczep CBS 370,65 w sposób opisany wyżej. Kolby inkubowano w ciągu 3 dni w temperaturze 40°C. Następnie otręby ekstrahowano 200 ml wody i w otrzymanym ekstrakcie oznaczono aktywność enzymu ścinającego mleko. Aktywność ta wynosiła 4500 jednostek podpuszczki Kunitza/litr.

Przykład VI. W jednakowych warunkach i na takiej samej pożywce prowadzono hodowlę następujących 4 szczepów *Mucor miehei* Cooney et Emerson: CBS 370,65, CBS 182,67, A 21 i ATCC 16457. Po wyhodowaniu w kolbach na wstrząsarce oznaczono w poszczególnych próbach aktywność podpuszczki w jednostkach NOVO-Soxhlet i ogólną aktywność proteolityczną w jednostkach Ansona na liter. Oznaczono również stosunek pomiędzy aktywnością podpuszczki i ogólną aktywnością proteolityczną dla 4 różnych wartości pH środowiska. Wyniki prób podano w poniższym zestawieniu.

Wartość pH	Mucor miehei CBS 370,65			Mucor miehei CBS 182,67			Mucor miehei A 21			Mucor miehei ATCC 16457		
	NOVO Soxhlet	An-son	Sto-sunek	NOVO Soxhlet	An-son	Sto-sunek	NOVO Soxhlet	An-son	Sto-sunek	NOVO Soxhlet	An-son	Sto-sunek
4,5	1913	2,2	870	1875	2,9	660	1050	1,5	700	1630	1,9	850
5,0	1913	6,0	319	1875	6,5	280	1050	2,9	362	1630	5,3	308
5,5	2020	7,4	273	1875	7,5	250	1050	4,4	239	1320	5,5	240
6,0	2020	5,5	367	1875	4,2	446	1050	3,2	328	1320	3,9	338

Z zestawienia tego wynika, że nie tylko szczep CBS 370,65 ale i inne szczepy *Mucor miehei* Cooney et Emerson wytwarzają enzym o podobnie korzystnym stosunku pomiędzy aktywnością podpuszczki i ogólną aktywnością proteolityczną.

W celu porównania właściwości ścinania mleka przez enzym otrzymywany sposobem według wynalazku z odpowiednimi właściwościami podpuszczki cielęcej, oznaczono aktywność enzymu i podpuszczki względem kazeinianu sodu w środowisku o wartości $\text{pH} = 6,3$ i o temperaturze 37°C . Sporządzono roztwory obu badanych substancji, zawierające takie same ilości jednostek podpuszczki Kunitza/litr i po strąceniu kwasem trójchlo-roctowym, zmierzono ich gęstość optyczną przy długości fali 280 milimikronów. Gęstość optyczna kazeinianu wynosząca 0,136 nie ulega zmianie, gdyż po traktowaniu go podpuszczką w ciągu 3 godzin wynosi 0,137 podczas gdy gęstość optyczna kazeinianu potraktowanego enzymem wytworzonym sposobem według wynalazku wzrasta w tym czasie do 0,265, a więc o wielkość, która nie ma

praktycznego znaczenia w technice przy wytwarzaniu sera.

Enzym ścinający mleko, otrzymany według wynalazku, zastosowano do produkcji sera i uzyskano z dużą wydajnością produkt o dobrym smaku.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania enzymu ścinającego mleko, **znamienny tym**, że na pożywce prowadzi się w warunkach głębinowych hodowlę szczepu grzybka *Mucor miehei* Cooney et Emerson lub jego naturalnych albo sztucznych odmian lub mutantów.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że na pożywce prowadzi się w warunkach głębinowych hodowlę szczepu *Mucor miehei* Cooney et Emerson CBS 370,65 albo jego naturalnych lub sztucznych odmian lub mutantów.
3. Odmiana sposobu według zastrz. 1 i 2, **znamienna tym**, że hodowlę prowadzi się w warunkach powierzchniowych.