(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **158328 B**

(21) Patentansøgning nr.: **2964/82**

(22) Indleveringsdag: **01 jul 1982**

(41) Alm. tilgængelig: **21 jan 1983**

(44) Fremlagt: **07 maj 1990**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **20 jul 1981 US 284421**

(51) Int.Cl.[5] **A 23 C 21/02**
C 12 N 1/20

(71) Ansøger: ***STAUFFER CHEMICAL COMPANY; Westport; Connecticut 06881, US**

(72) Opfinder: **Robert David *Schwartz; US, Elizabeth Ann *Bodie; US**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et funktionaliseret mejerivalleprodukt og biologisk ren kultur af organisme til anvendelse ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

---

(57) Sammendrag:

2964-82

Mejerivalle, som er et spildprodukt fra osteproduktionen, kan funktionaliseres ved en forgæringsteknik til fremstilling af en funktionaliseret valle, der tjener både som fortykkelsesmiddel og en metode til udnyttelse af vallespildproduktet. Valle funktionaliseres ved dannelse af en forgæringssuppe af vallen, glucose og eventuelt vandopløseligt phosphat som pH-stødpude og gærekstrakt og derefter forgæring af denne vallesuppe med en stamme af organismen Xanthomonas campestris. Den funktionaliserede valle kan så anvendes som fortykkelsesmiddel i fødevareindustrien.

DK 158328 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et funktionaliseret mejerivalleprodukt ved anvendelse af den hidtil ukendte organisme Xanthomonas campestris-stammen BB-1 (ATCC 31922), som er deponeret hos American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

Mejerivalle, et næringsstof, kan være en økonomisk kilde til et forgærbart substrat og anvendes i vidt omfang som en accepteret af mælk afledt bestanddel ved fremstilling af fødevarer. Hvis valle kan funktionaliseres ved forgæring med en organisme, som producerer en fortykkende polymer, når den dyrkes på vallesubstratet, er det muligt at få valleprodukter, der kan fungere som stabiliseringsmiddel, fortykkelsesmiddel, emulgeringsmiddel eller aromafremmende middel.

Valle er det flydende medium indeholdende en meget lav koncentration af faste mælkestoffer og en høj koncentration af lactose. At komme af med dette spildbiprodukt ved tørring er en energiintensitiv kostbar fremgangsmåde, der resulterer i et kostbart biprodukt. Udledning af vallen til kloakken er prohibitiv dyrt som følge af det høje biologiske oxygenbehov, som det kommunale kloaksystem får.

Den mest ønskelige metode til at håndtere en strøm af vallespildprodukt er at producere en foderbestanddel af høj kvalitet af vallespildproduktet. Ifølge opfindelsen er opdaget en ny fremgangsmåde til fremstilling af et funktionaliseret valleprodukt til brug som foderbestanddel eller som fortykkelsesmiddel og/eller stabiliseringsmiddel til nydelsesmidler og foderstoffer.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved

a) dannelse af en forgæringssuppe af valle og glucose,

b) forgæring af suppen med organismen Xanthomonas campestris ATCC 31922 til produktion af et funktionaliseret mejerivalle-

produkt indeholdende en fortykkende polymer frembragt af organismen og

c) eventuelt tørring af det funktionaliserede valleprodukt til dannelse af et tørt funktionaliseret valleprodukt.

Fig. I viser en kurve over en forgæring af Xanthomonas campestris ATCC 31922 i et medium indeholdende 2% Teklac (valle), 1,5% glucose og 0,025% gærekstrakt.

Fig. II viser en kurve over viskositeten som funktion af skærehastigheden for en typisk tørret funktionaliseret valle fremstillet ved forgæringsteknikken ifølge opfindelsen.

Fig. III viser en kurve over viskositeten som funktion af skæringshastigheden efter 128 timers forgæring med X. campestris ATCC 31922 i følgende medier: 2% Teklac, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 1% Teklac, 1% glucose, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 0,5% Teklac, 1,5% glucose, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 2% glucose, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 1,5% glucose, 0,5% K_2HPO_4, 0,2% NH_4Cl, 0,1% NaCl, 0,01% $MgSO_4$, 0,1% gærekstrakt. Der er også vist en kurve for en rekonstitueret suppe (ikke forgæret) indeholdende 2% Teklac, 0,4% Keltrol® (fødevarekvalitet af xanthangummi forhandlet af Kelco, Inc., San Diego, Californien).

Et funktionaliseret mejerivalleprodukt med en viskositet større end 200 cps (0,2 Pa.s) ved en $12s^{-1}$ skæringshastighed, der kan tjene som et stabiliseringsmiddel, fortykkelsesmiddel eller emulgeringsmiddel, kan fremstilles ved at forgære en blanding omfattende valle, glucose, eventuelt gærekstrakt og en pH-stødpude med organismen Xanthomonas campestris ATCC 31922 til fremstilling af et funktionaliseret valleprodukt indeholdende en fortykkende polymer frembragt af den hidtil ukendte organisme Xanthomonas campestris ATCC 31922.

X. campestris ATCC 31922 blev isoleret for sin evne til at vokse i valle. Den blev afledt af X. campestris NRRL B-1459

efter flere rækkepassager i Teklac (valle) medium indeholdende 2% Teklac, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt. I dette medium ved ca. 28°C har BB-1 en gerenerationstid på ca. 2 timer, der nås levedygtige celletitere på ca. 10^9/,1 eller større, lactosen i mediet metaboliseres ikke, og suppen bliver ikke viskos. Organismen er tilgængelig for offentligheden fra februar 1984 i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

Opfindelsen angår endvidere en biologisk ren kultur af organismen Xanthomonas campestris ATCC 31922 til anvendelse ved fremgangsmåden.

Selv om det er kendt, at et ultrafiltreret og hydrolyseret vallemedium forgæret med Xanthomonas campestris resulterer i udmærket polymerdannelse, har al vækst til dato på uhydrolyseret valle ikke kunnet resultere i polymer produktion: Se K.R. Stauffer og J.G. Leeder, 1978, J. Food Sci., 43, 756-758, "Extracellular Microbial Polysaccharide Production by Fermentation on Whey or Hydrolyzed Whey", og M. Charles og M.K. Radjai, 1977 "Xanthan Gum From Acid Whey" i Extracellular Microbial Polysaccharids, redaktører P.A. Sandford og A.I. Laskin. ACS Symp. Ser. nr. 45, side 27-39. Forgæring af en vallesuppe omfattende uhydrolyseret valle (sur eller sød), glucose og eventuelt gærekstrakt og phosphat resulterer i polymerdannelse og funktionalisering af vallen, således at valleproduktet kan anvendes som en foderbestanddel. Denne aerobe forgæring kan udføres fortrinsvis i et pH-interval fra 6-8, fortrinsvis med pH-værdien opretholdt i et interval fra ca. 6,5 til ca, 7,5. Forgæringen kan udføres ved en temperatur fra ca. 20-35°C, fortrinsvis ved en temperatur fra ca. 25 til ca. 30°C. Typisk sammensætning af Teklac (sød mejerivalle) er som følger:

Kemiske og fysiske specifikationer

Bestanddel	
Valle	

Typisk tilnærmet analyse

Protein (N x 6,38)%	12,7
Fedt %	1,1 (1,25% maksimum)
Fugtighed %	4,5 (5,0% maksimum)
Aske %	8,0
Lactose %	71,3
Kalorier, Cal/100 g	350,0

Typisk vitamin- og mineralanalyse

Vitamin A I.U./100 g	Intet
Vitamin C mg/100 g	Intet
Thiamin mg/100 g	0,40
Riboflavin mg/100 g	1,76
Niacin mg/100 g	1,00
Calcium %	0,71
Jern %	Intet
Vitamin B_{12} ug/100 g	2,12
Phosphor %	0,69
Pantothensyre mg/100 g	4,09

Mikrobiologiske standard

Standard pladetal	10,000/g (maksimum)
Coliforme	9/g (maksimum)
E. coli	Negativ
Salmonella	Negativ

Næringsværdierne, der er anført ovenfor, ligger inden for 80% af den værdi, der deklareres i overensstemmelse med Federal Nutritional Regulations 21 CFR § 1,71 (4)(ii).

	Typisk interval	Grænse
Opløselighedsindeks	0,1-0,5 ml	1,25 ml maks.
Surhed	0,10-0,14%	0,16 maks.
Alkalinitet af aske	175-200 ml	225 ml maks.
Svedne partikler	7,5 mg	15,0 mg maks.
Partikelstørrelse (gennem 40 mesh)	99-100%	98% min.

Koncentrationen af valle kan ligge fra 0,5% til 12,0%, fortrinsvis fra 1% til 3%, og koncentrationen af tilsat glucose kan ligge fra 0,5% til 12,0%, fortrinsvis 1% til 3%. Yderligere gærekstrakt i forgæringssuppen kan ligge fra 0 til 0,5%, fortrinsvis fra 0,01% til 0,025%. Koncentrationen af eventuel phosphat kan ligge fra 0 til 0,25% K_2HPO_4 efter ønske. Tilstrækkelige viskositeter af forgæringssuppen (>0,2 Pa.s og fortrinsvis >0,8 Pa.s ved en skærehastighed på $12s^{-1}$) nås i reglen på 30 til 50 timer. Alle de ovennævnte vægtprocenter er i vægt per rumfang.

Eksempel 1

Fig. I viser en typisk forgæring af et valle-glucose-suppemedium indeholdende 2% Teklac, 1,5% glucose og 0,025% gærekstrakt, som er blevet forgæret med Xanthomonas campestris ATCC 31922. Mediet blev steriliseret i autoklav i 20 min. Forgæringen blev udført i en forgæringsbeholder, hvortil der blev pumpet luft med en hastighed af 1 liter/liter/min., omrøringen var med en hastighed af 800 omdrejninger/min., den opløste oxygenkoncentration blev holdt på 70-90% mætning, og temperaturen var 28°C. Der blev anvendt en Bio-Flow® forgæringsbeholder (New Brunswick Scientific Co., New Jersey). Begyndelses-pH-værdien var 7, og den blev ikke kontrolleret. Figuren viser den almene forøgelse i viskositet med tiden, et 86-87% fald i glucosekoncentration, vækst af organismen og den første stigning i pH-værdi efterfulgt af et fald i pH-værdi, som er typisk for denne forgæring.

Eksempel 2

Den funktionaliserede valle blev produceret af Xanthomonas campestris ATCC 31922 i en New Brunswick Scientific Co., 141 Microferm forgæringsbeholder indeholdende ca. 10 liter medium på et forgæringsmedium omfattende 2% Teklac, 3% glucose, 0,25% K_2HPO_4 og 0,1 gærekstrakt. Hovedmaterialet blev dyrket ca. 20 timer i samme medium uden glucose. Titeren

for levedygtige celler på brugstidspunktet var 9 x 10^8/ml. Forgæringsbetingelserne var som følger: Temperatur 28°C; omrøring 500 omdrejninger/min.; luftning 1 liter/liter/min.; pH-værdi 6,8 fra begyndelsen og ikke kontrolleret, ca. 2 ml antiskummemiddel P 2000 (Dow Chemical Company) blev tilsat ved begyndelsen af forgæringen.

Tabel I viser forgæringstid, mængden af glucose i g/liter og viskositeten af i rækkefølge udtagne prøver af forgæringssuppen taget på de viste tidspunkter. Forgæringssuppen blev så autoklaveret ved 15 psi i 20 min.

TABEL I

Tid, H	Glucose G/L	Viskositet @ $12S^{-1}$ 1:5 fortynding
0	31,9	ND
44	13,5	134 (675)
71	ND	ND
115	12,9	149 (745)
Efter autoklavering	12,7	216 (1080)

ND, ikke bestemt
( ) Tilbageberegnet viskositet, dvs.: 5(134) = 675.

Lactosen i forgæringssuppen udnyttes ikke til hverken vækst af organismen Xanthomonas campestris ATCC 31922 eller produktion af polymer.

Eksempel 3

Forgæringsbetingelserne ved forgæringen i eksempel 1 blev modificeret som følger: Mediet i forgæringsbeholderen blev forenklet til at indeholde 2% Teklac, 2% glucose, 0,025% gærekstrakt (dvs. intet K_2HPO_4, reduceret glucose og gærekstrakt), og pH-værdien blev reguleret, så den ikke steg over 7,5 ved anvendelse af tilsætning af phosphorsyre. Forgæringen blev udført i 94 timer. Tabel II viser resul-

tater af fire sådanne forgæringer, og de fremkomne egenskaber af den samlede prøve fra forgæringerne 1, 2, 3 og 4 efter autoklavering. Som vist blev 77-97% af glucosen forbrugt, lactosen blev ikke metaboliseret, og viskositeten steg efter autoklavering.

TABEL II

Funktionaliseret valleproduktion med X. campestris ATCC 31922 i 141 forgæringsbeholdere.

	Forgæringsbeholder			
	1	2	3	4
Før autoklavering				
viskositet, cps @ 12 s^{-1}	440	502	564	536
pH	5,35	5,61	5,12	5,30
glucose, g/l	0,57	4,68	3,23	3,41
lactose, g/l	12,59	15,17	14,09	15,55
farve	gul-hvid	gul-hvid	gul-hvid	gul-hvid
Efter autoklavering				
forenet prøve				
viskositet, cps @ 12 s^{-1}	766			
pH	5,36			
glucose, g/l	2,71			
lactose, g/l	15,01			
farve	gul-hvid			
tør vægt, g/l	28,7			

Supperne med høj viskositet produceret ved forgæringsteknikken ifølge opfindelsen kan tørres og/eller steriliseres med autoklav og lyofilisering, sprøjtetørring eller anden teknik.

Eksempel 4

En kurve over viskositet og skærehastighed for en typisk tørret funktionaliseret valle fremstillet på denne måde er vist på fig. II. Prøven blev undersøgt på en 2,5 XLVT Wells-Brookfield-mikroviskometer med en 3° kegle ved 25°C. Prøvestørrelsen var 2,0 ml. Prøven bestod af en 1% opløs-

ning (vægt/rumfang) af funktionaliseret valle i afioniseret vand. pH-værdien var 5,8, glucosekoncentrationen var 0,9 g/l, og lactosekoncentrationen var 4,3 g/l. Stigningen i viskositet med fald i skærehastighed er typisk for pseudoplastiske polymere.

Eksempel 5

Fig. III viser en kurve over viskositet som funktion af skærehastighed efter 128 timers forgæring med X. campestris ATCC 31922 i følgende medier: 2% Teklac, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 1% Teklac, 1% glucose, 0,25% K_2HPO_4 og 0,01% gærekstrakt; 0,5% Teklac, 1,5% glucose, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 2% glucose, 0,25% K_2HPO_4, 0,01% gærekstrakt; 1,5% glucose, 0,5% K_2HPO_4, 0,2% NH_4Cl, 0,1% NaCl, 0,01% $MgSO_4$, 0,1% gærekstrakt. Der er også vist en kurve for en rekonstitueret suppe (ikke forgæret) indeholdende 2% Teklac, 0,5% Keltrol ® (fødevarekvalitet af xanthangummi forhandlet af Kelco, Inc., San Diego, Californien).

Ved de laveste skærehastigheder er viskositeten iagttaget i forgærede supper indeholdende både Teklac og glucose mindst 10 gange større end den, der iagttages i nærværelse af Teklac eller glucose alene. De forgærede supper med høj viskositet opfører sig endvidere på samme måde som en rekonstitueret suppe indeholdende xanthangummi i en koncentration, som gør den egnet til brug i iscreme.

P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et funktionaliseret mejerivalleprodukt, k e n d e t e g n e t ved

a) dannelse af en forgæringssuppe af valle og glucose,

b) forgæring af suppen med organismen Xanthomonas campestris ATCC 31922 til produktion af et funktionaliseret mejerivalle-

produkt indeholdende en fortykkende polymer frembragt af organismen og

c) eventuelt tørring af det funktionaliserede valleprodukt til dannelse af et tørt funktionaliseret valleprodukt.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at koncentrationen af vallen er fra 0,5% til 12 vægt% pr. rumfang, og glucosen er fra 0,5 til 12 vægt% pr. rumfang.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en yderligere bestanddel i forgæringssuppen er gærekstrakt.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en yderligere bestanddel af forgæringssuppen er fra 0-0,5 vægt% pr. rumfang gærekstrakt.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en yderligere bestanddel af forgæringssuppen er K_2HPO_4.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en yderligere bestanddel af forgæringssuppen er fra 0-0,25 vægt% pr. rumfang K_2HPO_4.

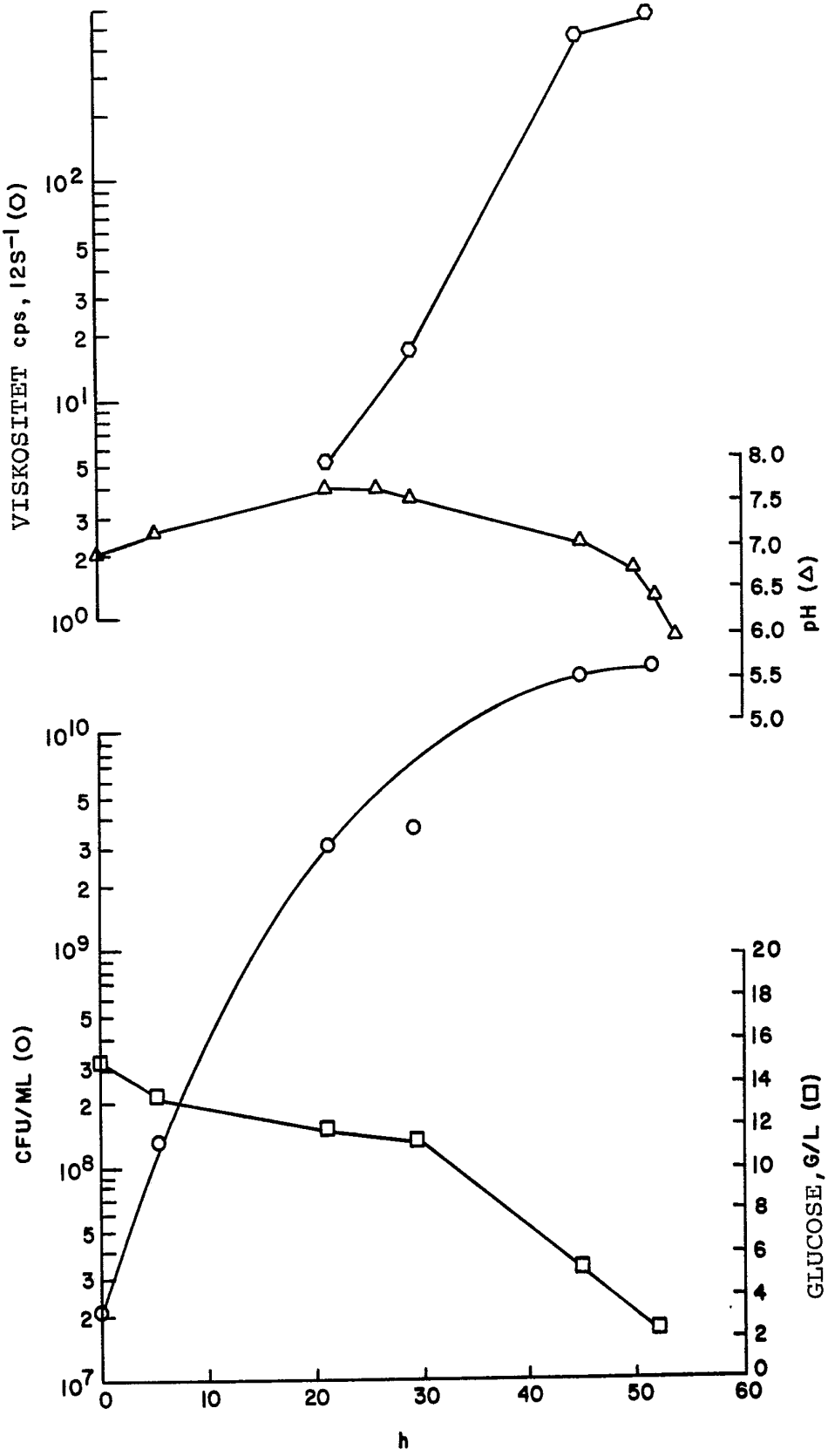
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at forgæringen udføres ved en temperatur fra 20 til 35°C.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at forgæringen udføres ved en temperatur fra 20 til 35°C, og pH-værdien holdes i et interval fra 6 til 8.

9. Biologisk ren kultur af organismen Xanthomonas campestris ATCC 31922 til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1.

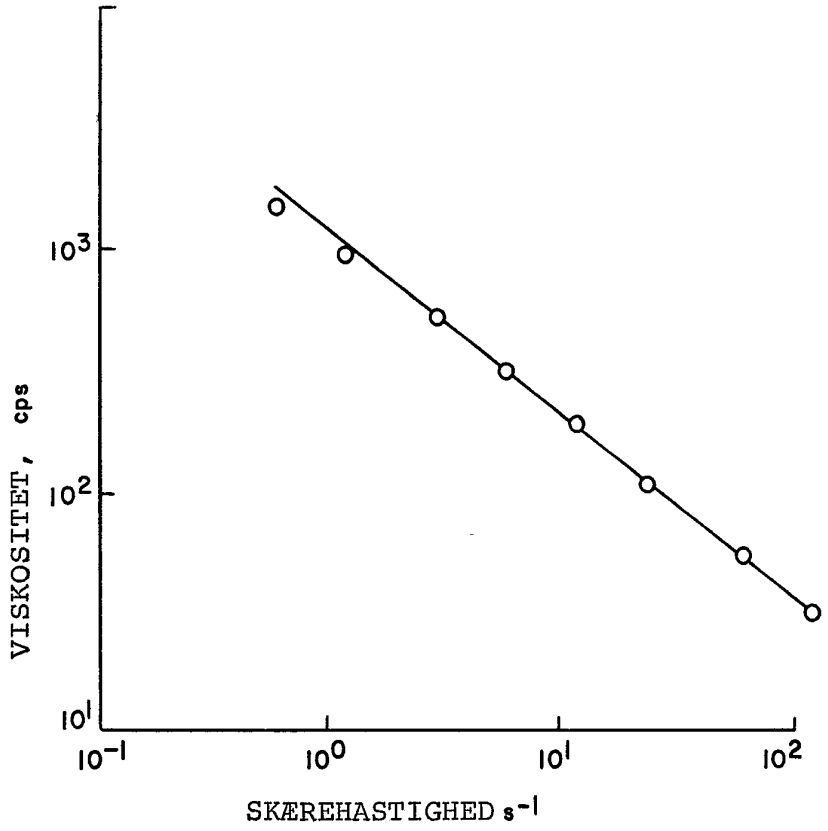
FIGUR I

X. CAMPESTRIS ATCC-31922 FORGÆRING I VALLE-GLUCOSE-MEDIUM



FIGUR II

KURVE OVER VISKOSITET VERSUS SKÆREHASTIGHED FOR TØRRET FUNKTIONALISERET VALLE



FIGUR III

VISKOSITET VERSUS SKÆREHASTIGHED AF FUNKTIONALISERET VALLE

