

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 130796

Patent dodatkowy
do patentu —

Zgłoszono: 81 04 24 /P. 230 856/

Pierwszeństwo: —

Zgłoszenie ogłoszono: 82 10 25

Opis patentowy opublikowano: 1985 12 30



Int. Cl.³ C12N 1/20

Twórcy wynalazku: Anna Krankowska, Kazimierz Kornaicki, Marianna Wolars,
Elżbieta Szpendowska, Wojciech Kalata

Uprawniony z patentu: Centralny Związek Spółdzielni Mleczarskich
Zakład Produkcji Biopreparatów Mleczarskich,
Olsztyn /Polska/

POŻYWKA DO PRODUKCJI KONCENTRATÓW MEZOFILNYCH BAKTERII MLEKOWYCH

Przedmiotem wynalazku jest pożywka do produkcji koncentratów mezofilnych bakterii mlekowych, znajdujących zastosowanie przy produkcji serów dojrzewających, masła i twarogów w zakładach mleczarskich.

Znany sposób wytwarzania koncentratów mezofilnych bakterii mlekowych prowadzi się przez namnażanie komórek na specjalnie dobranych podłożach. Następnym etapem jest zagęszczanie masy bakteryjnej i jej utrwalanie. Skład znanego podłoża, na którym prowadzi się namnażanie komórek bakteryjnych jest następujący: mleko hydrolizowane pepsyną 50 gram/litr, namok kukurydziany 30 gram/litr, glukoza 5,0 gram/litr, cytrynian sodu 5,0 gram/litr, siarozan manganawy 0,12 gram/litr, siarozan magnezowy 0,12 gram/litr, siarozan cynkowy 0,12 gram/litr, woda - uzupełnienie do objętości 1 litra.

Hodowlę komórek bakteryjnych prowadzi się przy stałym pH 6,4 pożywki. W tym celu prowadzi się w czasie hodowli neutralizację wytwarzanego kwasu mlekowego za pomocą 27%-towej wody amoniakalnej. Po zakończeniu hodowli komórki odwirowuje się na wirówce. Oddzielone komórki zawieszają się w substancji ochronnej i poddaje utrwaleniu poprzez zamrożenie, suszenie rozpyłowe lub liofilizację. Próby liofilizowania komórek na tym podłożu hodowlanym bez odwirowania masy bakteryjnej nie dały pozytywnych rezultatów. Zastosowanie niewielkiej próżni nawet w bardzo niskiej temperaturze doprowadzało do gwałtownego wrzenia.

Z niemieckiego opisu patentowego nr 2 539 629 znana jest pożywka, która stosowana jest w produkcji mleczarskiej, ale dla innego celu, a mianowicie służy do przygotowania zakwasów roboczych czyli namnożenia bakterii mlekowych ze szczepionki, którą może być również "koncentrat mezofilnych bakterii mlekowych". Pożywka ta na 100 części wagowych w przeliczeniu na suchą masę zawiera:

- od 20 do 95 części produktu mlecznego zawierającego zdecydowanie większą część słodkiej serwatki a mniejszą część mleka,

- od 0,1 do 30 części, najkorzystniej 0,2-10 części źródła azotu,
- od małej ilości do 30 części cytrynianu, najkorzystniej 5-20 części, który jest ważny dla osiągnięcia fagorezystencji,
- od małej ilości do 20 części fosforanu, najkorzystniej od 1-7 części, który jest ważny dla osiągnięcia fagorezystencji.

Pożywka ta, ze względu na swój skład wykazuje właściwości fagorezystentne za co odpowiedzialne są zawarte w niej cytryniany i fosforany. Na etapie produkcji zakwasów roboczych jest to istotna właściwość. Dodatek soli buforujących oraz wiążących jony wapnia /cytryniany, fosforany/ w ilościach wskazanych według opisu patentowego RFN jest zbędny podczas produkcji koncentratów mezofilnych bakterii mlekowych i pożywka ta nie nadaje się do ich wytwarzania.

Celem wynalazku jest opracowanie składu pożywki hodowlanej do produkcji liofilizowanych koncentratów mezofilnych bakterii mlekowych o zwiększonej aktywności, aby można było utrzymywać namnożoną biomasę na drodze suszenia liofilizacyjnego bez uprzedniego odwirowywania masy bakteryjnej.

Skład pożywki hodowlanej powinien zapewniać osiągnięcie maksymalnej ilości drobnoustrojów podczas namnażania komórek w optymalnej temperaturze rozwoju przy stałym pH. Jednocześnie sucha masa pożywki powinna być możliwie jak najniższa, aby po wysuszeniu otrzymać jak największą ilość komórek w 1 gramie.

Za właściwe namnożenie komórek zarówno pod względem ilościowym jak też jakościowym tj. jej aktywności odpowiedzialny jest cały skład pożywki, a nie pojedyncze komponenty. O przydatności pożywki do konkretnego celu decyduje nawet dodatek jednego składnika o odpowiedniej kompozycji.

W pracy nad wynalazkiem okazało się nieoczekiwanie, że postawione zadanie spełnia poniższa pożywka do namnażania mezofilnych bakterii mlekowych o składzie: mleko odtłuszczone w proszku 70,0-80,0 gram/litr, ekstrakt drożdżowy 1,0-2,0 gram/litr, glukoza 3,0-5,0 gram/litr, cytrynian sodu 2,0-3,0 gram/litr, siarczan manganawy 0,10-0,15 gram/litr, siarczan magnezowy 0,10-0,15 gram/litr, siarczan cynkowy 0,10-0,15 gram/litr, woda - uzupełnienie do objętości 1 litra.

Pożywkę o powyższym składzie zaszczepla się uprzednio przygotowanym inoculum i prowadzi hodowlę w stałej temperaturze 27°C do momentu osiągnięcia pH 5,0. Następnie włącza się układ neutralizacji i prowadzi dalej hodowlę na stałym poziomie pH 6,4-6,6. Neutralizację prowadzi się za pomocą 20%-wego roztworu NaOH. Po ukończeniu hodowli dodaje się jałowy 18%-tawy roztwór laktozy. Następnie schłodzoną, namnożoną biomasę rozlewa się do butelek, zamraża i suszy sublimacyjnie.

W pożywce do produkcji koncentratów bakteryjnych według wynalazku cytryniany spełniają inną rolę. Ich obecność zresztą w ilości znacznie niższej, aniżeli według opisu patentowego RFN jest niezbędna do uzyskania komórek bakteryjnych o właściwej aktywności aromatotwórczej.

Pożywka według wynalazku pozwala na utrwalenie namnożonej biomasy mezofilnych bakterii mlekowych przez suszenie liofilizacyjne bez uprzedniego odwirowywania masy bakteryjnej. Stosowanie dotychczasowej pożywki wymagało odwirowania komórek, a następnie zawieszenia ich w substancji ochronnej przed liofilizacją. Komórki wyhodowane na nowej pożywce liofilizuje się wraz z pożywką po dodaniu substancji ochronnych.

Przy zastosowaniu nowej pożywki uzyskano koncentrację bakterii mezofilnych paciorkowców mlekowych $1 - 7 \times 10^{10}$ komórek/ml. Stosując znaną pożywkę uzyskuje się taką samą koncentrację komórek w ml, ale aktywność fizjologiczna kultur uzyskanych w hodowli na nowej pożywce jest 2-3 krotnie wyższa od kultur otrzymywanych na dotychczasowych pożywkach. Sprowadzając kultury do porównywalnej aktywności uzyskuje się 2-3 krotnie większą wydajność z tej samej ilości pożywki. Ponadto pożywka jest łatwa do przygotowania, gdyż nie wymaga hydrolizy pepsynowej mleka i znacznie prostsza technologia, bowiem została wyeliminowana jedna operacja, a mianowicie odwirowywanie komórek.

Przedmiot wynalazku zostanie bliżej objaśniony w przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d. Skład pożywki do hodowli koncentratów mezofilnych bakterii mlekowych jest następujący: 1,75 kg mleka odtłuszczonego w proszku "instant", 115 g glukozy, 57,5 g cytrynianu sodu, 23 g ekstraktu drożdżowego, 2,76 g $MgSO_4$, 2,76 g $MnSO_4$, 2,76 g $ZnSO_4$ oraz woda w ilości uzupełniającej do 23 litrów:

Pożywkę według wynalazku do produkcji koncentratów wykorzystuje się następująco. Powyższe składniki wsypuje się do fermentora i po wymieszaniu i rozpuszczeniu sprawdza się pH pożywki, które powinno wynosić 6,6-6,8, jeżeli jest za niskie neutralizuje się za pomocą 20%-wego wodorotlenku sodu. Sterylizację pożywki prowadzi się w fermentorze przy 115°C. Po ochłodzeniu do temperatury 27°C pożywkę w fermentorze zaszczenia się 3% inoculum, przygotowanym na jałowym mleku odtłuszczonego. Inkubację inoculum prowadzi się w temperaturze 23°C. Hodowlę biomasy prowadzi się w fermentorze w stałej temperaturze 27°C do momentu osiągnięcia pH 5,0. Po osiągnięciu pH 5,0 włącza się układ neutralizacji i prowadzi dalej hodowlę na stałym poziomie pH 6,4-6,6. Pożywkę neutralizuje się 20%-wym roztworem NaOH. Wskaźnikiem do przerywania hodowli jest zmniejszenie się zużycia neutralizatora w jednostce czasu. Po zakończeniu namnażania zawartość fermentora ochłodzi do temperatury około 11°C i dodaje 590 ml 18%-towego jałowego roztworu laktozy. Po wymieszaniu namnożoną biomasę rozlewa się do jałowych butelek po 150 ml, zamraża i suszy sublimacyjnie. Wysuszony koncentrat miele się i poddaje badaniom. Gotowy produkt pakuje się w woreczki z folii trójwarstwowej.

Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

Pożywka do produkcji koncentratów mezofilnych bakterii mlekowych, zawierająca glukozę, cytrynian sodu, siarczan manganawy, siarczan magnezowy, siarczan cynkowy, **s n a m i e n n a t y**, że składa się z: 70,0-80,0 g/l mleka odtłuszczonego w proszku, 1,0-2,0 g/l ekstraktu drożdżowego, 3,0-5,0 g/l glukozy, 2,0-3,0 g/l cytrynianu sodu, 0,10-0,15 g/l siarczanu manganawego, 0,10-0,15 g/l siarczanu magnezowego, 0,10-0,15 g/l siarczanu cynkowego oraz wody w ilości uzupełniającej do objętości 1 l.