

Patent dodatkowy  
do patentu \_\_\_\_\_

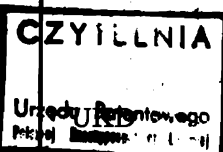
Kl. 6 a, 22/04

Zgłoszono: 10. II. 1968 (P 125 180)

Pierwszeństwo: 16. II. 1967 Niemiecka  
Republika  
Demokratyczna

Opublikowano: 10. VI. 1970

MKP 6-12-6



C12 d 13/10

Współtwórcy wynalazku: dr Karl Zickrick, dr Johann Huber, Rainer  
PippigWłaściciel patentu: Forschungsinstitut für die Gärungsindustrie, Enzy-  
mologie und technische Mikrobiologie, Berlin (Nie-  
miecka Republika Demokratyczna)**Sposób biotechnicznego wytwarzania preparatu enzymatycz-  
nego, mającego głównie zdolność wytrącania białka mleka lub  
działającego przede wszystkim proteolitycznie**

1

Przedmiotem wynalazku jest biotechniczny spo-  
sób wytwarzania preparatu enzymatycznego, wy-  
trącającego białko mleka albo wywierającego  
przede wszystkim działanie proteolityczne. En-  
zym ten może znaleźć zastosowanie przy pro-  
dukcji serów zamiast podpuszczki, w przemy-  
śle pralniczym i przemyśle skórzanym, jak rów-  
nież i w medycynie.

Istnieją wskazówki w literaturze, że każdy  
enzym mający zdolność ścinania białka w mleku  
przejawia równocześnie pewne działanie prote-  
olityczne. Nie stwierdzono jednak dotychczas, że  
stosunek obu tych komponentów enzymu może  
być zmieniany przez zmianę warunków hodowla-  
nych podczas wytwarzania enzymu, a zwięsz-  
cza przez zmianę składu pożywki hodowlanej.

Wynalazek ma na celu opracowanie sposobu  
wytwarzania preparatu enzymatycznego, który  
głównie ścina białko mleka lub wywiera przede  
wszystkim działanie proteolityczne. Cechą spo-  
sobu według wynalazku jest to, że przez odpo-  
wiednie przechowywanie mikroorganizmów wy-  
tworzących enzym i hodowanie inoculum w ta-  
kim samym środowisku, w jakim przechowuje  
się mikroorganizmy, w następnym środowisku  
produkcyjnym uzyskuje się zgodnie z wyna-  
lazkiem enzym z wysoką wydajnością. Zmienia-  
jąc skład środowiska produkcyjnego wytwarza  
się preparat silniej ścinający białko mleka  
i o słabszych właściwościach proteolitycznych

2

lub preparat o silnych właściwościach proteoli-  
tycznych i słabej zdolności ścinania białka mle-  
ka.

Zmieniając wartość pH środowiska, w którym  
stosuje się preparat, można dalej zwiększać lub  
zmniejszać proteolityczne działanie tego prepa-  
ratu. Mianowicie, preparat wytwarzany sposobem  
według wynalazku wykazuje najsilniejsze dzia-  
łanie proteolityczne przy stosowaniu go w środo-  
wisku o wartości pH 6,0—8,5, podczas gdy w śro-  
dowisku o wartości pH 4,0—6,0 działanie pro-  
teolityczne preparatu jest słabsze niż zdolność  
ścinania białka mleka.

Zgodnie z wynalazkiem jako środowisko do  
przechowywania bakterii grupy *Mesentericus sub-*  
*tilis*, wytwarzających preparat enzymatyczny  
i jako środowisko do przygotowywania szczepion-  
ki stosuje się odłuszczone świeże mleko. Dzięki  
przechowywaniu w mleku mikroorganizmów wy-  
tworzących enzym pobudza się bowiem dzia-  
łanie tych mikroorganizmów. W zależności od  
żądanej skuteczności enzymatycznej preparatu  
stosuje się różny skład środowiska produkcyj-  
nego. W celu wytwarzania preparatu, który głów-  
nie ścina białko mleka, stosuje się środowisko  
produkcyjne zawierające oprócz odłuszczonego  
świeżego mleka srućę owsianą lub jęczmienną,  
otręby pszenne i sole nieorganiczne. Natomiast  
przy wytwarzaniu enzymu o działaniu głównie  
proteolitycznym stosuje się środowisko produk-

cyjne zawierające surowe ziemniaki, śrutę jęczmienną, otręby pszenne, śrutę owsianą, wywar kukurydziany, krochmal ziemniaczany i sól mineralną.

Proces fermentacji prowadzi się jako hodowlę wgłębną z zastosowaniem napowietrzania, przy czym do tanków fermentacyjnych doprowadza się w ciągu 1 minuty 0,25—0,50, a korzystnie 0,3 litra powietrza na 1 litr roztworu hodowlanego, stosując mieszadło o 100—250, a korzystnie o 150 obrotach/minutę i mające średnicę, której stosunek do średnicy tanku wynosi 1:3. Roztwór zawierający enzym odwirowuje się i zagęszcza pod obniżonym ciśnieniem w stosunku 1:8 do 1:14, a korzystnie 1:10. Preparat według wynalazku stosuje się w postaci takiego koncentratu lub też wytrąca się enzym znanymi sposobami z roztworu pofermentacyjnego i suszy. Przy stosowaniu sposobu według wynalazku wydajność enzymu już po upływie 28 godzin fermentacji jest tak wysoka, że proces ten nadaje się na skalę przemysłową. Praktyka wykazała, że otrzymany sposobem według wynalazku preparat enzymowy do strącania białka mleka, zastosowany do wytwarzania twarogu do celów spożywczych, przewyższa znany preparat pepsynowy.

Wynalazek jest bliżej wyjaśniony w niżej podanych przykładach.

**Przykład I.** Przykład ten omawia wytwarzanie na skalę laboratoryjną preparatu enzymatycznego o działaniu głównie ścinającym białko mleka.

Aktywny szczep bakterii grupy *Mesentericus subtilis* posiewa się na odtłuszczone mleko i inkubuje jako hodowlę stojącą w temperaturze 30°C. Po 30 godzinach inkubacji przesiewa się do kolb na trzaskawce, zawierających również odtłuszczone mleko. Gdy przy zaczynającej się peptonizacji mleka w hodowli trzaskawkowej osiąga się liczbę bakterii 10<sup>8</sup>/ml, wówczas stosuje się ten materiał jako inoculum dla środowiska produkcyjnego o następującym składzie: 20% odtłuszczonego mleka, 1% śruty owsianej, 1% otrąb pszennych, 1% śruty jęczmiennej, 0,01% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% MgSO<sub>4</sub>, mającego wartość pH po wyjałowieniu około 6,8. Ilość materiału potrzebna do posiewu wynosi 1%. Jako naczynia do fermentacji stosuje się kuliste kolby stojące o pojemności po 500 ml, zawierające po 150 ml pożywki. Po posianiu inkubuje się hodowlę w ciągu 24 godzin na trzaskawce przy około 220 wstrząsach na minutę. Następnie pobiera się próbki i oznacza aktywność ścinania białka odtłuszczonego mleka w zależności od czasu.

**Przykład II.** Preparat enzymatyczny, mający przede wszystkim właściwości proteolityczne. W celu otrzymania enzymu o przeważającym działaniu proteolitycznym, postępuje się w sposób podobny do opisanego w przykładzie I, ale stosuje się pożywkę zawierającą 1% śruty jęczmiennej, 0,8% otrąb pszennych, 0,7% śruty owsianej, 1,2% utartych surowych ziemniaków i 0,01% CaCl<sub>2</sub>.

**Przykład III.** Preparat enzymatyczny, mający przede wszystkim zdolność wytrącania białka mlecznego, wytwarzany na skalę przemysłową. Jako naczynia fermentacyjne stosuje się 500 litrowe tanki ze stali V2-A, w których przygotowuje się pożywkę o podanym poniżej składzie i stale mieszając za pomocą mieszadła o 150 obrotach/minutę wyjaławia w temperaturze 120°C w ciągu około 45 minut. Skład pożywki: 1% śruty jęczmiennej, 1% śruty owsianej, 20% odtłuszczonego słodkiego mleka, 0,5% krochmalu ziemniaczanego, 0,02% CaCO<sub>3</sub>, 0,01% MgSO<sub>4</sub>, przy czym wartość pH po wyjałowieniu wynosi 6,5—7,0, a przeważnie 6,8.

Po posiewie hodowlą otrzymaną w sposób opisany w przykładzie I, w tanku znajduje się ogółem 250 litrów ciekłej hodowli, którą przewietrza się przy ciągłym mieszaniu za pomocą mieszadła o 120 obrotach/minutę. Ilość powietrza mierzona przy odlocie wynosi 90 litrów/minutę. Powstawaniu piany podczas procesu fermentacji zapobiega się za pomocą olejów lub tłuszczów roślinnych albo zwierzęcych lub odpieniaczy silikonowych. Największą zawartość enzymu osiąga się po 18—28, a przeważnie po 24 godzinach. Wówczas przesącza się hodowlę i przesącz zagęszcza dziesięciokrotnie lub bardziej, otrzymując odpowiedni dla przemysłu mleczarskiego koncentrat o aktywności 1:10000 do 1:20000, a przeważnie 1:12000, albo produkt strącony o mocy podpuszczkowej 1:100000.

**Przykład IV.** Preparat enzymatyczny, mający przede wszystkim działanie proteolityczne, wytwarzany na skalę przemysłową. Powtarza się postępowanie opisane w przykładzie III, lecz stosuje się pożywkę zawierającą 1% śruty jęczmiennej, 1% śruty owsianej, 1% otrąb pszennych, 1% utartych surowych ziemniaków, 0,05 namoku kukurydzianego o zawartości 50% suchej substancji, 0,2% glukozy i 0,01% CaCl<sub>2</sub>. Jako inoculum stosuje się 20-godzinna hodowlę trzaskawkową na odtłuszczonego mleku słodkim. Hodowla do posiewu posiada przed posianiem brązowe zabarwienie, a liczba bakterii wynosi 3 × 10<sup>8</sup>/ml. Korzystnie jest utrzymywać wartość pH środowiska 6,5. Ilość powietrza doprowadzanego w ciągu 1 minuty do tanku o pojemności 500 litrów, wykonanego ze stali V2-A, przy 300 obrotach/minutę mieszadła wynosi 0,3 litra na 1 litr roztworu hodowlanego.

Po osiągnięciu maksymalnej zawartości enzymu przerywa się fermentację i oddziela ciecz hodowlaną od bakterii, substancji zawieszonych i części stałych. Ciecz tę zagęszcza się w łagodnych warunkach, wytrąca acetonem w temperaturze 4°C, odsącza i suszy. Wytrącony produkt może znaleźć następnie zastosowanie w przemyśle pralniczym i paszowym. Do zastosowań medycznych preparatów enzymów proteolitycznych konieczne są dalsze stopnie oczyszczania.

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób biotechnicznego wytwarzania preparatu enzymatycznego, mającego głównie zdolność wytrącania białka mleka lub działającego prze-

de wszystkim proteolitycznie, na drodze hodowli bakterii z grupy *Mesentericus subtilis* w środowisku odżywczym, znamieny tym, że jako środowisko do przechowywania bakterii wytwarzających enzym i jako środowisko do przygotowywania inoculum stosuje się odtłuszczone świeże mleko, a enzym wytwarza się w środowisku produkcyjnym na drodze głębokiej hodowli napowietrznej, przy czym doprowadza się do tanku w ciągu 1 minuty korzystnie 30 litrów powietrza na 100 litrów roztworu hodowlanego i miesza za pomocą mieszadła o korzystnie 150 obrotach/minutę i mającego średnicę, której stosunek do średnicy tanku wynosi 1:3, po czym roztwór hodowlany zawierający enzym odwirowuje się i zatęża pod zmniejszonym ciśnieniem w stosunku 1:14, a korzystnie 1:10 lub wytrąca enzym z roztworu hodowlanego znaną metodą i suszy.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako środowisko produkcyjne do wytwarzania preparatu mającego głównie właściwości ściśniania białka mleka stosuje się mieszaninę zawierającą 20% odtłuszczonego świeżego mleka, 1% otrąb pszennych, 1% śruty jęczmiennej, 1% śruty owsianej, 0,01%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i 0,01%  $\text{MgSO}_4$ .
3. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako środowisko produkcyjne do wytwarzania preparatu mającego głównie właściwości proteolityczne stosuje się mieszaninę zawierającą 1,5% utartych surowych ziemniaków, 1% śruty jęczmiennej, 1% otrąb pszennych, 1% śruty owsianej, 0,03% namoku kukurydzianego, 0,05% krochmalu ziemniaczanego i 0,02%  $\text{CaCl}_2$ .