

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 129 783

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 80 10 02 /P. 227082/

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 82 04 13

Opis patentowy opublikowano: 1985 12 14

Int. Cl.³ C12N 9/58

Twórcy wynalazku: Maria Kołaczkowska, Antoni Polanowski

Uprawniony z patentu: Uniwersytet Wrocławski im. Bolesława Bieruta,
Wrocław /Polska/

SPOSÓB IZOLOWANIA NOWEGO ENZYMU POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO O WŁASNOŚCIACH KOAGULUJĄCYCH KAZEINĘ MLEKA

Wynalazek dotyczy sposobu izolowania nowego enzymu pochodzenia mikrobiologicznego o właściwościach koagulujących kazeinę mleka z przeznaczeniem dla przemysłu mleczarskiego do produkcji serów dojrzewających.

Zdolność do koagulacji mleka wykazuje wiele enzymów pochodzenia zwierzęcego, roślinnego i mikrobiologicznego. Stosowany od dawna preparat podpuszczki izolowany z żołądków cieląt, jest obecnie coraz trudniej dostępny. Wzrost produkcji serów twardych, jak i ograniczenie uboju cieląt stwarza potrzebę poszukiwania substytutów zwierzęcej renniny. Knight /Canad. J. Microbiol. 1966, 12, 420/ przebadł szereg grzybowych enzymów posiadających zdolność do ścinania mleka, a wśród nich takich rodzajów grzybów jak: *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium moniliforme* i *Byssoschlamys fulva*. Jednakże autor ten nie podał żadnych bliższych informacji dotyczących enzymu z *Fusarium moniliforme*, ani też składu płynu hodowlanego.

Natomiast grzyb *Byssoschlamys fulva* produkował enzym o najwyższej aktywności koagulującej mleko i stał się przedmiotem dalszych badań. Również *Endothia parasitica* jest odpowiednim grzybem produkującym w dużej ilości enzym, o właściwościach koagulujących kazeinę /J. L. Sardinas Appl. Microbiol. 1968, 16.248/. W Japonii w skali przemysłowej stosuje się preparat enzymu z pleśni *Mucor pusillus*. Zastępujący podpuszczkę preparat "Fromazy" produkowany jest we Francji z *Mucor miehei*. W USA firma Pfizer produkuje podobny enzym z *Endothia parasitica*.

Dotychczas znane sposoby postępowania prowadzące do wytworzenia enzymów koagulujących mleko są przedstawione w opisach patentowych USA nr 2 936 265; nr 3 151 039; nr 3 275 453. W opisanych w nich sposobach postępowania enzymy koagulujące kazeinę mleka otrzymywano

z grzybów rodzaju *Endothia parasitica* lub *Mucor pusillus* Lindt, a proces ich produkcji polega na hodowli tych grzybów w środowisku zawierającym źródło węglowodanów, azotu i nieorganicznych soli, w odpowiednim pH i temperaturze.

Znany jest jedynie sposób hodowania grzyba z *Fusarium moniliforme* Sheldon /M. Kołaczkowska, A. Polanowski, St. Czaplińska; Hod. Rośl. Akł. Nas. 1980, 24, 1/. Natomiast nie jest znany sposób wyodrębnienia enzymu z płynów pohodowlanych *Fusarium moniliforme* Sheldon. Wzrost grzyba *Fusarium moniliforme* prowadzono na płynnej pożywce mineralno-organicznej o składzie g/l: mąka sojowa - 2,0, KH_2PO_4 - 1,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, glukoza - 10,0, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 o pH 5,0, którą zakażano wodną zawiesiną zarodników w ilości 30×10^6 /l. Pożywkę wytrząsano w temp. 30°C, przez 4 dni, a następnie wirowano przez 20 minut przy 3 tys. obrotów/minutę. Otrzymany płyn chociaż koaguluje kazeinę mleka, nie nadaje się do wytwarzania serów, gdyż wykazuje niską aktywność /34 j/ml/.

Celem wynalazku jest otrzymanie enzymu pochodzenia mikrobiologicznego nadającego się do produkcji serów dojrzewających, a więc preparatu wysokoaktywnego i dającego właściwą konsystencję skrzepów kazeiny mleka nadających się do ich dalszej obróbki.

Istota wynalazku polega na wykorzystaniu płynów pohodowlanych z *Fusarium moniliforme* Sheldon i wyodrębnieniu z nich wytworzonego aktywnego enzymu. Sposobem według wynalazku płyn pohodowlany kontaktuje się z kationitem zwłaszcza takim jak CM-Sephadex C 50 lub C 25, Cm celulozą, SP-Sephadex C 50 lub 25, a następnie zaadsorbowany enzym eluuje się buforem octanowym 0,05 - 1,0 M o pH 4,4 - 4,6 zawierającym 0,2 - 0,4 M NaCl, korzystnie 0,1 M buforem octanowym o pH 4,4 zawierającym 0,3 M NaCl.

Enzym uzyskany z hodowli grzyba *Fusarium moniliforme* charakteryzuje się następującymi właściwościami fizyko-chemicznymi: ciężar cząsteczkowy jego wynosi 38.000, punkt izoelektryczny 4,9, zbudowany jest z 321 aminokwasów i należy do typu aspartylowych proteinaz. Izolowanie enzymu koagulującego kazeinę mleka według wynalazku, zostanie bliżej objaśnione w przykładach wykonania.

P r z y k ł a d I. 15 l odwirowanego płynu po 4-dniowej hodowli grzyba *Fusarium moniliforme* Sheldon doprowadzono do pH 4,4. Do płynu dodawano CM-Sephadex C 50 zrównoważony 0,1 M buforem octanowym o pH 4,4 w ilości 2 g/l. Adsorpcję przeprowadzono w zlewce w temperaturze pokojowej, przy ciągłym mieszaniu przez 1,5 godziny. Następnie płyn po przesączeniu na lejku Büchnera, przez pojedynczą warstwę fliseliny, przy użyciu pompy wodnej, odrzucano. Niezaadsorbowane białka, pozbawione aktywności koagulującej, wymywano z CM-Sephadex 0,1 M buforem octanowym o pH 4,4 aż do zaniku reakcji na białko. Obecność białka kontrolowano przez odczyty na spektrofotometrze przy 280 nm. Zaadsorbowany na kationicie enzym eluowano przez wzrost siły jonowej.

W tym celu zastosowano 0,1 M bufor octanowy o pH 4,4 z 0,4 M NaCl. Frakcje o ekstynkcji przy 280 nm powyżej 0,2 łączono i oznaczono aktywność koagulującą wg You, Tamura /Bioch. Bioph. Acta. 1969, 171, 138/. W tak przedstawionym postępowaniu uzyskano preparat o wysokiej aktywności koagulującej około 2000 j/ml, nadający się do produkcji serów dojrzewających. CM - Sephadex stosowany do adsorpcji enzymu po regeneracji polegającej na przemyciu 0,1 M NaOH, 1 M NaCl i zawieszaniu w buforze, nadaje się do wielokrotnego użycia. Z 15 l płynu pohodowlanego otrzymuje się taką ilość, która wystarcza do skoagulowania około 50 l mleka. Z takiej porcji mleka można wyprodukować 2-3 serów twardych o wadze około 2 kg każdy.

P r z y k ł a d II. Powtórzona jest procedura przykładu I. Różnica polega na zastosowaniu innego kationitu, a mianowicie SP-Sephadex C 50. Zaadsorbowany enzym eluuje się 0,05 M buforem octanowym o pH 4,6 zawierającym 0,2 M NaCl.

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

Sposób izolowania nowego enzymu pochodzenia mikrobiologicznego o właściwościach koagulujących kazeinę mleka, nadającego się do produkcji serów dojrzewających, z n a m i e n n y t y m, że: płyty pochodzące z *Fusarium moniliforme* Sheldon kontaktuje się z kationitem zwłaszcza takim jak CM-Sephadex C 50 lub C 25, Cm celuloza, SP-Sephadex C 50 lub C 25, a następnie zaadsorbowany enzym eluuje się buforem octanowym 0,05 - 0,1 M o pH 4,4 - 4,6, zawierającym 0,2 - 0,4 M NaCl, korzystnie 0,1 M buforem octanowym o pH 4,4 zawierającym 0,3 M NaCl.