

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 762114 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 762114

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
C12B

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 23.07.1976

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 23.07.1976

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 28.02.1977

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

27.08.1975 US 608094

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Leprino Cheese Co, 1830 West 38th Avenue, Denver Colorado 80211, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Reinbold, George Wilmer, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Reddy, Malireddy Srinivasulu, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Viljelyväliaine ja menetelmä mikrobiviljelmien valmistamiseksi italialaisen juuston valmistusta varten

Kulturmedium och förfarande för preparering av mikrobkulturer för framställning av italiensk ost

LEPRINO CHEESE CO., 1830 West 38th Avenue Denver, Colorado 80211, USA

Menetelmä italialaisen juuston valmistusta varten tarkoitetun sekaviljelmän valmistamiseksi - Förfarande för framställning av blandkultur för framställning av italiensk ost

Italialaista juustoa, kuten Mozzarellaa, valmistettaessa istutetaan juustosammiossa oleva maito noin 2-4 %:lla mikrobiviljelmää, joka aikaansaa happoa muodostavan organismin sekaviljelmän. Valmistettaessa Mozzarella- ja muita pasta filata-juustoja on käytännössä käytetty kantaa *Streptococcus thermophilus* yhdessä yhden tai useamman laktobasillin kanssa. Streptokokkia nimitetään tavallisesti lyhyesti kokiksi, kun taas laktobasillia nimitetään sauvabakteeriksi johtuen sen ulkonäöstä sitä mikroskooppisesti tarkasteltaessa. Edullisin kokkien ja sauvasolujen suhde italialaisen juuston valmistukseen käytetyssä mikrobiviljelmässä on noin 3:1 - 5:1. Juuston valmistajilla on vaikeuksia ylläpitää tätä suhdetta mikrobiviljelmissä, jotka on valmistettu valmistuslaitoksessa vaikkakin viljelmien valmistajat myyvät niiden väkevöitteitä sellaisissa suhteissa, jotka ovat lähellä tavallisesti haluttuja suhteita. Määrättyjä vaihteluja näissä opti-
misuhteissa voidaan sallia ja siitä huolimatta voidaan valmistaa hyvälaatuista juustoa, mutta juuston maku ja fysikaaliset ominaisuudet, kuten elastisuus, kuituisuus, aromi ja kosteus, voivat selvästi huonontua ellei sekä kokki^{ga} että sauvaorganismeja ole läsnä ja elleivät ne kasva aktiivisesti. Tämän seikan takaamiseksi tulee niissä mikro-

biviljelmissä, jotka lisätään juustosammioihin, kokkien ja sauvojen suhde olla alueella 2,5:1-5,5:1.

Aikaisemman käytännön mukaisesti, josta suurelta osalta on nykyisin luovuttu, käytettiin tuoretta heraa, joka saatiin italialaisen juuston valmistuksen aikaisempien panosten sammioista, viljelyväliaineena mikrobiviljelmän aikaansaamiseksi. Tällainen juustosammioista otettu nestemäinen hera on kuitenkin vaarallista käyttää. Inhibiittori-yhdisteitä, lämpöä kestäviä epäpuhtautena olevia bakteereja ja myös kuumuutta kestäviä bakteerikantoja voi esiintyä tällaisessa herassa. Näin ollen käsittää viljelyaine nykyisin, valmistettaessa italialaisen juuston mikrobiviljelmiä, pelkästään rekonstituoitua rasvatonta kuivamaitoa (RKM) tai tätä yhdessä erilaisten määrien kanssa makeata heraa. Rekonstituoitu RKM on kallis viljelyväliaine johtuen rasvattoman kuivamaidon korkeasta hinnasta. Se on kuitenkin eräs valintamahdollisuus, koska se on sellainen luotettava materiaali, jota voidaan ennakolta ^{testata} ~~testata~~. Olisi kuitenkin erittäin toivottavaa löytää halvempi viljelyväliaine italialaisen juuston mikrobiviljelmän aikaansaamiseksi, jossa olisi sopiva kokkien ja sauvojen suhde, joka väliaine olisi yhtä luotettavan turvallinen ja jota voitaisiin esitellä samoin kuin RKM-perusteista väliainetta.

On yritetty kehittää heraperusteinen väliaine sellaisten mikrobiviljelmien valmistamiseksi, jotka soveltuisivat juuston valmistukseen italialaiset juustot mukaanlukien. On käytetty sekä tuoretta heraa että rekonstituoitua, kuivattua, makeata heraa. US-patentissa n:o 2 805 950 kuvataan sellaisten bakteeriviljelmien valmistusta, jotka soveltuvat käytettäväksi sveitsiläisen juuston valmistuksessa. *Streptococcus thermophilus*, joko yksin tai yhdessä laktobasillin kanssa, viljellään herassa, kuten sveitsiläisen juuston aikaisemmasta valmistusvaiheesta saadussa tuoreessa herassa, ja viljelyn päättymisen jälkeen lisätään 5-15 % maitojauhetta ja haudutettu viljelmä syväjäädytetään ja varastoidaan myöhempää käyttöä varten. Kuten tässä patenttijulkaisussa (sarake 3, riviltä 61 eteenpäin) on esitetty, on pääprobleema sveitsiläisen juuston valmistuksessa ollut oikean kokkien ja sauvojen suhteen aikaansaaminen. Tämä patenttijulkaisu suosittaa kokkien (*S. thermophilus*) puhtaiden viljelmien valmistusta ja erillisiä puhtaita sauvojen (laktobasilli) viljelmiä, jotka sekoitetaan sitten oikeassa suhteessa keskenään käyttöä varten juustosammioissa. Näin ollen tässä patenttijulkaisussa esitetty menetelmä käsittää edullisesti oleellisesti laktobasillivapaan *Streptococcus thermophilus*-heraviljelmän viljelemisen.

US-patentissa n:o 3 852 158 on kuvattu sellainen mikrobiviljelmä, joka voidaan valmistaa kuivassa muodossa maitotuotteista tai johdannaisista, joihin sisältyvät makea hera, RKM, hapan herajauhe, kirnu-piimäjauhe, kokomaitojauhe ja näiden seokset. Eräs edullinen seos käsittää pääosana makeata heraa ja pienemmän määrän RKM:a. Viljelyväliaineelle on tunnusomaista se, että se sisältää sitraattia. Sitä on suositettu käytettäväksi valmistettaessa hyvin erilaisia juuston valmistuksessa käytettäviä mikrobiviljelmiä. RKM on kuitenkin suhteellisen kallis väliaine eikä happamalla eikä makealla heralla sellaisenaan ole saatu tyydyttäviä tuloksia.

Maalaisjuuston, sveitsiläisen juuston ja italialaisen juuston valmistuksessa käytettäviä mikrobiviljelmiä, joissa käytetään herapohjaista bakteerikannan inhibiittoriväliainetta ja pH-arvon säätöä, ovat kuvanneet W.L. Chen ja G.H. Richardson aikakausjulkaisussa J. Dairy Sc., Vol. 58, n:o 5, sivut 785-786 (toukokuu 1975). Sekä hapanta heraa että makeata heraa kokeiltiin, mutta ei yhdessä.

Kokeissa, jotka johtivat esillä olevaan keksintöön, todettiin etteivät rekonstituoitu kuivattu makea hera eikä rekonstituoitu kuivattu hapan hera olleet tyydyttäviä väliaineita italilaisen juuston mikrobiviljelmiä valmistettaessa. Hapan hera estää sekä kokkien että sauvabakteerien kasvun. Makeata heraa käytettäessä estyy laktobasillien kasvu sillä tuloksella, että kokkien ja sauvojen suhde on paljon suurempi kuin haluttu suhde. Makea hera, josta laktoosi on osittain poistettu, aikaansaa vielä suuremman epäsuhteen halutussa kokkien ja sauvojen suhteessa, sillä kokit kasvavat tällöin runsaasti, mutta sauvat huonosti. Mikään näistä heraväliaineista ei tämän johdosta ole verrattavissa rekonstituoituihin RKM:ään italialaisen juuston mikrobiviljelmien valmistamiseksi.

Esillä oleva keksintö perustuu osaksi toteamukseen, että käyttöä varten italialaisen juuston mikrobiviljelmä-väliaineena on rekonstituoitu makea hera, joko luonnosta saatu tai osittain laktoosista vapautettu, yhdistettävä kriittisen määrän kanssa happaman heran kiinteitä aineita. Välttämättömät määrät optimitulosten aikaansaamiseksi ovat alueella 10-30 paino-osaa happaman heran kiinteitä aineita 70-90 paino-osaa kohden makean heran kiinteitä aineita. Optimisuhteen ylläpitämiseksi kokkien ja sauvasolujen välillä mikrobiviljelmissä yhdistetään 15-25 paino-osaa happaman heran kiinteitä aineita 75-85 osan kanssa makean heran kiinteitä aineita. Edelleen makean heran

kiinteät aineet vapautetaan edullisesti osittain laktoosista. Käytettäessä tällä tavoin muodostettuja viljelyväliaineita aikaansaadaan yhtä hyvät tai paremmat tulokset kuin silloin, kun viljelyväliaineen muodostaa 100 % rekonstituoitua RKM:a. Vaikkakin pienempi määrä RKM:n kiinteitä aineita voidaan yhdistää happaman ja makean heran kiinteiden aineiden kanssa, eivät keksinnön mukaiset edullisimmat seokset sisällä RKM:a, ja ne sisältävät oleellisesti pelkästään happaman ja makean heran kiinteitä aineita määrättyissä suhteissa.

Sellaiset sekaviljelmät, jotka on valmistettu keksinnön mukaisesti, ovat erittäin edullisia valmistettaessa pasta filata-juustoja, kuten Mozzarella, Provolone'a, Caciocavallo'a ja muita vastaavia.

Hera on se osa, joka saadaan erotettaessa neste koaguloidusta maidosta, kermasta tai kuoritusta maidosta. Se on eräs juuston valmistuksen pääasiallisista sivutuotteista. Kuivaherää valmistetaan poistamalla kosteus luonnonherasta. Se sisältää laktoosia, proteiinia ja mineraaleja samoissa suhteellisissa määrissä kuin itse hera. Herää voidaan myös muunnella esim. poistamalla osaksi laktoosi. Kuten juuston ja heran valmistuksessa on yleisesti hyväksytty, on osittain laktoosista vapautetun heran laktoosipitoisuus sellainen, ettei se ylitä 60 % heran kiinteistä aineista.

Yleensä on olemassa kahta erilaista heralajia. Toinen niistä tunnetaan "makeana" herana ja toinen "happamana" herana. Makeata herää saadaan sivutuotteena valmistettaessa useimpia juustoja, kuten Cheddar'ia, sveitsiläistä juustoa ja Mozzarella. Hapanta herää saadaan pääasiallisesti maalaisjuuston valmistuksen sivutuotteena. Kuten yleensä on hyväksytty juuston ja heran valmistuksessa ja jota myös ymmärretään esillä olevassa ^{neutraalissa} patenttihakemuksessa, on hapan hera sellainen hera, joka on joko nesteen tai kuivassa muodossa, ja jonka titrattava happamuus ei ole pienempi kuin 0,30 %. Happamien herojen happamuus on tavallisesti alueella noin 0,35-0,44 %, kun taas makeiden herojen vastaava alue on noin 0,07-0,20 %. Makean heran titrattava happamuus ei ole suurempi kuin 0,16 %: Makea hera voi olla nestemäinen, kuiva tai modifioitu, kuten osittain laktoosista vapautettu hera. Edullisimmat aineosat keksinnön mukaista sekaviljelmiä valmistettaessa ovat kuivattu hapan hera ja kuivattu makea hera, erikoisesti kuivattu, osittain laktoosista vapautettu makea hera.

Esillä olevan keksinnön pääasialliset tunnusmerkit ilmenevät oheisesta patenttivaatimuksesta 1.

tuja heroja, sisältävät 15-25 % mineraaleja (tuhkaa) kiinteinä kuiva-
aineina laskettuna. Tavallisesti edullisin osittain delaktoitu,
kuiva, makea hera, jota käytetään keksinnön mukaisesti, sisältää
45-55 % laktoosia, 20-25 % hiivaproteiinia ja 15-25 % mineraaleja
(tuhkaa).

~~Hera pohjasta nylly alusta valmistetaan~~
~~Mikrobiviljelmän kuivaosasta~~ ^{RKM} ~~joka on valmistettu kuvatulla tavalla~~
~~käytetään samalla tavoin kuin NFDM-väliainetta.~~ ^{Sita muodostetaan} ~~Se on rekonstituoitu~~
~~vedellä sellaisen vesipitoisen käymisväliaineen muodostamiseksi,~~
sisältää kaikkiaan 9-15 % kiinteitä aineita. Edullisin kiinteäaine-
pitoisuus on 10-14 % optimin ollessa noin 11-12 %. Käymisväliaine
ympätään sitten mikrobiviljelmäseoksella, joka sisältää Streptococcus
thermophilus-kokki ^{keja} ja yhden tai useamman lämmönkestävän ^{laja} laktobasil-
lin (sauvat). Kokki- ja sauvasolujen suhteen tulee olla alueella
2,5-1:stä aina 5,5-1. Optimisuhteet Mozzarellan ja senkaltaisten
italialaisten juustojen valmistuksessa ovat noin 2:1-5:1 kokki- ja
sauvasolujen välillä. Nämä suhteet määrätään mikroskooppisen tutki-
muksen avulla ja laskemalla solut samalla tavoin kuin juustoja taval-
lisesti tutkitaan mikrobiologisesti.

Sellaiset lämmön kestävät laktobasillit, ^{on edullista} ~~jotka ovat toivottavia~~ käy-
^{Haa} ~~tettäväksi yhdessä Streptococcus thermophiluksen kanssa,~~ kuuluvat
ryhmän Lactobacillus alaryhmään Thermobacterium. Niihin kuuluvat
lajit L. caucasicus, L. lactis, L. helveticus, L. acidophilus ja
L. bulgaricus. Mozzarella-juuston valmistamiseksi ovat S. thermophi-
lus- ja L. bulgaricus-seokset erittäin toivottavia. Muita edullisia
laktobasiljeja ovat L. helveticus ja L. lactis.

Keksintöä toteutettaessa muodostaa erään erittäin edullisen seoksen
20 paino-% kuivaa, hapanta heraa, kuten kuivattua maalaisjuustoheraa,
joka on tasaisesti sekoitettu 80 %:n kanssa kuivattua, osittain ^{laktoosi-} ~~delak-~~
^{vapaata} ~~toitua~~ makeata heraa. Tällaisia tuotteita pitävät useat toiminimet
kaupan. Eräs sopiva osittain ^{laktoosivapaa} ~~delaktoitu~~ hera on sellainen, jota myy-
dään tavaramerkillä "Puritein 20" ja myyjä on ^{ly} ~~Purity~~ Cheese Company,
Mayville, Wisconsin. Tämä tuote on osittain ^{laktoosivapaa} ~~delaktoitua~~ heraa,
joka on valmistettu kiteyttämällä ja erottamalla laktoosi osittain
väkevöidystä herasta. Eräessä tyypillisessä tämän valmistajan tuot-
teessa ovat pitoisuudet seuraavat: laktoosia 50 %, proteiinia 22 % ^{laktoosivapaa}
ja tuhkaa 21 %. Muut modifioidut herat, jotka ovat osittain ~~delaktoi-~~
~~tuja~~, voivat olla myös osittain demineralisoituja. Esimerkiksi

"Puritein 25" (tuote, jota myy ^uPurity Cheese Company tavaramerkillä "Puritein 25") on modifioitu sekä laktoosi- että mineraalipitoisuuden suhteen. Eräs tyypillinen tämän valmistajan myymä tuote on ~~koko~~^{ostumuk} seltaan seuraava: laktoosia 52 %, tuhkaa 14 % ja proteiinia 25 %. Kuten aikaisemmin mainittiin, ovat suuremmat tuhkapitoisuudet toivotavia, esim. tuhkapitoisuudet 15-25 paino-%. Tuotetta "Puritein 25" voidaan kuitenkin käyttää joko yksin tai seoksena "Puritein 20" tai kuivatun makean heran kanssa.

Tunnetun käytännön mukaisesti voidaan laktobasillien, kuten *L. bulgaricus*, kasvua edistää lisäämällä mangaani-ioneja käymisväliaineeseen. Vesi, jota käytetään kuivaseoksen rekonstituomiseksi, voi sisältää edullisesti 1-10 ^{ppm} ~~no~~ Mn^{++} . Mangaani voidaan lisätä myrkyttömän suolan, kuten mangaanikloridin, muodossa. On kuitenkin ymmärrettävää, että keksinnön tarkoituksissa tällainen mangaanin lisääminen on vapaaehtoista samoin kuin muiden kasvua lisäävien aineiden, kuten hiivauutteen, maissiuutteen jne. lisääminen.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja väliaineita verrattiin muiden väliaineiden kanssa ~~mukaan~~^{luten} rekonstituoitu ~~makea~~^{dua RKM:n} hera ja ~~laktoosivapaa~~^{on Hain} ~~de laktoitu~~^{-m kanda} hera. Kaikki kuivat väliaineet rekonstituotiin 12 %:n kiinteäainepitoisuuteen tislattun veden avulla. (Tehtaassa käytetään ~~esitutkittua~~^{das kokeissa} ~~tutkittua~~^{tuin} vesijohtovettä, ~~estävien yhdisteiden puuttumisen takaamiseksi~~^{joka ei sisältänyt haitallisia yhdisteitä}). Käytettiin kolmea erilaista mikrobiviljelmää, kuten jäljempänä esitetään. Hautomislämpötilat olivat tavanomaiset, esim. 38-42°C, mikä edisti erikoisesti bakteerien kasvua. Käymisajat olivat 7-16 h lähtien väliaineen alku-pH-arvosta yli 6,0, esim. 6,3-6,5, ja lopullinen pH-arvo oli alle 4,8 ja tavallisesti alle 4,5.

Seuraavissa kokeissa materiaali, jolle on annettu merkintä "Pur-20" on "Puritein 20", ja käytettiin sellaista osittain ~~laktoosivapasta~~^{laktoosivapasta} ~~de laktoitua~~ heraa, jota myy Purity Cheese Company ja jonka tyypillinen analyysi on laktoosia 50 %, proteiinia 22 % ja tuhkaa 21 %. Tätä materiaalia myydään kuivan jauheen muodossa. Materiaali, jota nimitetään happamaksi heraksi, oli kuiva hera, jota saadaan maalaisjuuston valmistuksen sivutuotteena ja jonka titrattava happamuus-% oli noin 0,39 %. Se tuote, jota nimitetään makeaksi heraksi, oli kuivattua makeata heraa, joka sisälsi suunnilleen 70 % laktoosia, 13 % proteiinia ja 8 % tuhkaa.

Koe 1

Neljä väliainetta, jotka sisälsivät makean heran ja happaman heran seoksia ja jotka oli valmistettu keksinnön mukaisesti, verrattiin kolmeen muuhun väliaineeseen. Nestemäiset käymisväliaineet valmistettiin edellä kuvatulla tavalla kuivista aineosista ja käymisväliaine ympätettiin *S. thermophilus* ja *L. bulgaricus* viljelmäseoksella, jossa kokki- ja sauvasolujen suhde oli suunnilleen 4:1. ¹⁵Tämän viljelmä-
^{lisä}väliaineeseen ~~lisätty määrä~~ oli 1 paino-%. Hautomislämpötila jokaisessa kokeessa oli 41°C. Käymisen edistymistä seurattiin mittaamalla titrattava happamuus, bakteeriaktiivisuus ja kokkien ja sauvojen suhde. Arvot on esitetty jäljempänä taulukoissa 1-A, 1-B ja 1-C, jossa väliaineita on merkitty kirjaimilla A-G, jotka tarkoittavat seuraavia seoksia tai materiaaleja.

Väliaine	Kokoomus Kaostumus*
A	Pur-20 (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa)
B	Pur-20 (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa) + 0,1 % hiivauutetta + 0,2 % maissiuutetta
C	Pur-20 (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa) + 0,1 % hiivauutetta + 0,2 % maissiuutetta + 0,25 % dekstroosia
D	Makeata heraa (80 osaa) + hapanta heraa (20 %)
E	Rasvatonta kuivamaitoa
F	Makeata heraa
G	Pur-20

* (muodostettu 12 %:n kiinteäainepitoisuuteen)

Taulukko 1-A

Titrattava happamuus ja pH

Väliaine	Tuntia					
	7	9	12	14	16	20
A	0,780 [*] (4,80) ^{**}	0,850 (4,60)	1,070 (4,60)	1,200 (4,30)	1,410 (4,15)	1,410 (4,30)
B	1,050 (4,35)	1,190 (4,35)	1,320 (4,30)	1,400 (4,15)	1,470 (4,10)	1,510 (4,25)
C	1,010 (4,35)	1,220 (4,30)	1,320 (4,30)	1,400 (4,15)	1,470 (4,10)	1,520 (4,00)
D	0,700 (4,60)	0,810 (4,40)	0,910 (4,30)	0,990 (4,15)	1,050 (4,05)	1,160 (4,20)
E	1,160 (4,00)	1,330 (4,00)	1,450 (3,85)	1,500 (3,80)	1,570 (3,75)	1,650 (3,95)
F	0,290 (5,80)	0,360 (5,70)	0,470 (5,30)	0,570 (5,00)	0,640 (4,90)	0,730 (4,60)
G	0,550 (5,55)	0,720 (5,35)	0,820 (5,00)	0,910 (4,80)	0,910 (4,90)	1,030 (4,85)

^{*}Kehittynyt happamuus (titrattava happamuus-%)^{**}pHTaulukko 1-B

Aktiivisuuskoetulokset

Väliaine	Tuntia					
	7	9	12	14	16	20
A	0,840	0,870	0,840	0,800	0,700	0,670
B	0,890	0,890	0,830	0,790	0,689	0,530
C	0,930	0,860	0,815	0,755	0,690	0,530
D	0,930	0,885	0,825	0,780	0,625	0,510
E	1,000	0,920	0,840	0,525	0,470	0,460
F	0,530	0,580	0,630	0,650	0,560	0,500
G	0,620	0,610	0,630	0,610	0,560	0,480

Taulukko 1-C

Kokki: sauva-suhteet

(S. thermophilus: L. bulgaricus)

Väliaine	Tuntia					
	7	9	12	14	16	20
A	5:1	4:1	4:1	4:1	4:1	3:1
B	5:1	4:1	4:1	3:1	3:1	3:1
C	4:1	4:1	3:1	3:1	3:1	3:1
D	3:1	3:1	2:1	2:1	2:1	1:1
E	3:1	3:1	1:1	1:1	1:1	1:1
F	60:1	60:1	20:1	5:1	5:1	4:1
G	80:1	80:1	60:1	20:1	10:1	5:1

Koe 2

Seurattiin samaa menettelytapaa kuin esimerkissä 1 lukuunottamatta sitä, että ~~isotusaine~~^{ympp} sisälsi L. helveticusta L. bulgaricuksen sijasta. Hautomislämpötila oli 41°C. Suoritettiin samat mittaukset ja arvot on esitetty jäljempänä taulukoissa 2-A, 2-B ja 2-C, joissa väliaineet ~~on identifioitu seuraavasti:~~^{tarkoittavat} ~~seuraavasti:~~^{ia}

Väliaine	Kokoomus ^{koostumus*}
A	Pur-20 (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa)
B	Pur-20 (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa) + 0,75 % hiivauutetta
C	Makeata heraa (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa)
D	Makeata heraa (80 osaa) + hapanta heraa (20 osaa) + 0,075 % hiivauutetta
E	Rasvatonta kuivamaitoa
F	Makeata heraa
G	Pur-20

* (muodostettu 12 %:n kuiva-ainepitoisuuteen)

Taulukko 2-A
Titrattava happamuus
Tuntia

Väliaine	7	9
A	0,450 [*] (4,90) ^{**}	0,580 (4,70)
B	0,525 (4,80)	0,645 (4,70)
C	0,400 (5,00)	0,535 (4,70)
D	0,480 (4,90)	0,630 (4,60)
E	0,415 (5,30)	0,520 (5,05)
F	0,005 (7,50)	0,005 (7,50)
G	0,155 (6,30)	0,300 (5,90)

^{*}kehittynyt happamuus

^{**}pH

Taulukko 2-B
Aktiivisuuskoetulokset
Tuntia

Väliaine	7	9
A	0,520	0,540
B	0,525	0,550
C	0,500	0,505
D	0,525	0,545
E	0,430	0,420
F	0,200	0,210
G	0,370	0,375

Taulukko 2-C

Kokki: sauva-suhteet

(S. thermophilus: L. helveticus)

Tuntia

Väliaine	7	9
A	6:1	3:1
B	3:1	3:1
C	4:1	2:1
D	3:1	2:1
E	19:1	16:1
F	1:0	1:0
G	1:0	1:0

Koe 3

Seurattiin samaa menetelmää kuin kokeissa 1 ja 2 lukuunottamatta sitä, että ~~istutusaine~~^{lämpö} sisälsi sauvabakteereina L. lactista. Hautomislämpötila oli 41°C. Väliaineet olivat identtisiä niihin verrattuna, joita käytettiin kokeessa 2 ja kirjaimet tarkoittavat samoja väliaineita kuin esimerkissä 2. Arvot on esitetty jäljempänä taulukoissa 3-A, 3-B ja 3-C.

Taulukko 3-A

Titrattava happamuus ja pH

Tuntia

Väliaine	7	9
A	0,495* (5,00)**	0,700 (4,70)
B	0,650 (4,70)	0,850 (4,50)
C	0,595 (4,70)	0,875 (4,40)
D	0,700 (4,70)	0,885 (4,35)
E	0,005 (7,50)	0,005 (7,50)
F	0,195 (6,30)	0,385 (5,60)
G	0,460 (4,90)	0,670 (4,50)

*Kehittynyt happamuus

**pH

Taulukko 3-B

Aktiivisuuskoetulokset

	Tuntia	
Väliaine	7	9
A	0,525	0,575
B	0,580	0,595
C	0,540	0,525
D	0,530	0,540
E	0,200	0,200
F	0,340	0,405
G	0,460	0,440

Taulukko 3-C

Kokki: sauva-suhteet

(S. thermophilus: L. lactis)

	Tuntia	
Väliaine	7	9
A	6:1	3:1
B	3:1	3:1
C	1:1	1:1
D	7:1	3:1
E	1:0	1:0
F	1:0	1:0
G	1:1	1:1

Edellä olevissa kokeissa kehittynyt happamuus, joka mitattiin titrat-
tavan happamuuden prosenttimääränä, määrättiin tavanomaisilla mene-
telmillä. 9 g väliainetta punnittiin valkoiseen porsliinikuppiin.
Sitten lisättiin 10 tippaa fenolftaleiinin 1,0 %:sta alkoholiliuosta
ja seos titrattiin hieman punaiseksi (30 sekunnin kesto aika) ~~pääte-~~
~~pisteeseen~~ 0,1-n natriumhydroksidiliuoksella. Sen jälkeen kun ymp-
päämätön väliaine oli titrattu vertailutarkoituksessa tulokset esi-
tettiin happamuuden kehittymisprosentteina maitohappona ilmaistuna.

Aktiivisuuskokeet suoritettiin seuraavasti: 100 ml autoklaavissa kä-
siteltyä, esikokeiltua, 11 % kiinteitä aineita sisältävää, rekonsti-
tuoitua NFDM ympättiin 2 ml:lla aktiivista ~~kulttuurista~~ ^{sekan viljelmä}. Tätä
~~viljelmää~~ ^{kulttuuria} haudottiin sitten lämpötilassa 33°C 45 min. Tämän ajan
päätyttyä nostettiin viljelmän lämpötila hitaasti arvoon 46°C
30 minuutin kuluessa. Viljelmää pidettiin sitten tässä lopullisessa
lämpötilassa 2 h. Titrattava happamuus määrättiin edellisessä koh-

dassa esitetyllä tavalla.

Kokkien ja sauvojen suhde määrättiin edellä esitetyissä kokeissa mikroskooppisen tutkimisen avulla, jolloin kokki- ja sauvasolujen summittainen suhde määrättiin silmämääräisen laskennan perusteella. Tämä on tavanomainen menetelmä kokki- ja sauvasolujen suhteen määräämiseksi juuston valmistuksessa. Yksi silmukallinen mikrobiviljelmää ja yksi silmukallinen tislattua vettä sekoitettiin keskenään ja hajotettiin tasaisesti 1 cm²:n suuruiselle alalle puhtaalle lasilevyille. Kiinnittämisen jälkeen tarkasteltiin metyleenisinisellä värjättyä viljelyväliainetta mikroskoopilla öljyyn upotetun objektiivin avulla. Sauvojen ja kokkien kokonaismäärä laskettiin kussakin kolmesta eri kentästä, arvot laskettiin yhteen ja tämän jälkeen laskettiin keskiarvo. Tulokset esitettiin kokkien ja sauvojen suhteen.

Edellä esitettyjen kokeiden tulokset voidaan koota seuraavasti: rekonstituoitu makea hera sen paremmin kuin happaman heran kiinteäkään aineet eivät toimi yksinään tehokkaasti mikrobiväliaineena, samoin kuin eivät myöskään rekonstituoitu ^{rasvaton kuivamaidon} NFDN tai sopivasti suhteutetut makean heran ja happaman heran kiinteiden aineiden seokset. Edelleen aikaansaavat osittain ^{laktosista vapautetut} ~~delaktoidut~~ makean heran kiinteät aineet, kun niitä käytetään makean heran sijasta seoksessa, parempia tuloksia ja edistävät sauva- ja kokkiviljelmien seosten erinomaista kasvua. Tämä näyttää johtuvan happaman heran sauva- ja kokkiviljelmien stimuloimisesta ja näiden seosten korkeamman tuhkapitoisuuden puskuroimisesta ^{vasta vaikutuksesta} vaikutuksesta. Yleisesti ottaen voidaan sanoa, että keksinnön mukaisissa mikrobiviljelmissä aikaansaadaan ja ylläpidetään edulliset sauvojen ja kokkien suhteet. Näin ollen keksintö ^{olla saavutetaan} ~~aikaansa~~ tärkeän edistys ^{sakeet} ~~valmistettaessa~~ mikrobiviljelmiä italialaisen juuston valmistusta varten. Keksinnön mukaisesti valmistetut mikrobiviljelmät ovat laadultaan yhtä hyviä tai parempia kuin ne, jotka on valmistettu ^{RKM rasvattoman kuivamaidon} ~~NFDN~~ mikrobiviljelmistä, mutta ovat paljon halvempia valmistaa.

Mitä väliaineen kustannuksiin tulee, ^{varhaan} ~~ottaen huomioon nykyiset~~ ^{illa} ~~laktosista~~ ^{RKM:n} ~~NFDN:n~~ kuivan makean heran, kuivan happaman heran ja kuivan ^{vapautetun} ~~delaktoidun~~ heran hinnat, voidaan keskimääräisenä säästönä pitää noin 60-90 % käytettäessä keksinnön mukaisia ^{heräsekoituksia} ~~heräsekoituksia~~ väliaineita ^{RKM} ~~tavanomaiseen NFDN~~ väliaineeseen verrattuna. ^{saavutetaan} ~~saavutetaan~~ noin

60-90 % säästö verrattuna

Suomen
Kielitoimiston
painattama
vii edellä
kuvassa
saavutetaan
käsittämällä

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä italialaisen juuston valmistusta varten tarkoitetun kokkien ja sauvojen sekaviljelmän valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää
 - a) sellaisen vesipitoisen käymisväliaineen valmistamisen, joka sisältää kaikkiaan 9-15 % kiinteitä aineita, jolloin nämä kiinteät aineet muodostuvat pääasiallisesti 15-25 %:sta sellaisen happaman heran kiinteitä aineita, joiden titrattava happamuus ei ole pienempi kuin 0,30 %, yhdessä 70-90 %:n kanssa muita kiinteitä aineita, jotka ovat sellaisen makean heran kiinteitä aineita, joiden titrattava happamuus on korkeintaan 0,16 %, tai näiden seokset yhdessä rasvattoman kuivamaidon kiinteiden aineiden kanssa, jolloin näitä maidon kiinteitä aineita ei ole läsnä enempää kuin 1 paino-% (kuten) 9 paino-osaa kohden happaman heran ja makean heran kiinteiden aineiden kokonaismäärästä,
 - b) tämän väliaineen ymppäämisen sellaisella mikrobiviljelmällä, joka sisältää *Streptococcus thermophilus* {kokkeja} ja *Lactobacillus* ~~jotka kuuluvat luokkaan~~ ^{sauvoja} (*Thermobacterium*) ~~(sauvoja)~~, jolloin kokki- ja sauvasolujen suhde on alueella 2,5:1 - 5,5:1, ja
 - c) näiden kokki- ja sauvasolujen viljelemisen mainitussa väliaineessa sellaisen mikrobiviljelmän saamiseksi, jossa kokki- ja sauvasolujen suhde on alueella 2,5:1 - 5,5:1.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sellaisen vesipitoisen käymisväliaineen valmistamisen, joka sisältää kaikkiaan 10-14 % kiinteitä aineita, jolloin nämä kiinteät aineet sisältävät 75-85 % makean heran kiinteitä aineita, jotka sisältävät korkeintaan 60 % laktoosia, ja 15-25 % mineraaleja (tuhkaa) kuivapainon perusteella laskettuna.

*happaman heran kiinteät aineet
pussit
kuivamaidon kiinteät aineet
25%*
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että makea hera sisältää kuivapainon perusteella laskettuna 43-55 % laktoosia ja 20-25 % proteiinia.

*ed 13
tuhkaa
happamainen*
4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Lactobacillus* on *L. bulgaricus*.
5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Lactobacillus* on *L. helveticus*.

6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että *Lactobacillus* on *L. lactis*.

7. Patenttivaatimuksen 2 ja 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että väliaine ympätään mikrobiviljelmäseoksella, jossa kokki- ja sauvasolujen suhde on noin 3:1 - 5:1, ja näitä kokki- ja sauvasoluja viljellään mainitussa väliaineessa sellaisen mikrobiviljelmän muodostamiseksi, jossa kokki- ja sauvasolujen suhde on noin 3:1 - 5:1.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

Suomi - Finland P 57958 (C12K 3/00)

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA 3.531.297 (A23C 19/02), 3.852.158 (C12K 1/10)

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

79-05-25 Hely Lommi

Allekirjoitus