



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№

883174

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР,
Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий
выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Способ получения молокосвертывающего ферментного
препарата руссулин"

Автор (авторы):

Гуцалюк Валерий Михайлович, Кулинченко
Виталий Романович, Нудьга Михаил Николаевич,
Каталевский Евгений Евгеньевич, Круглова Нелли
Павловна, Евтихов Петр Николаевич, Елифанов Аркадий
Евгеньевич и Ручков Петр Николаевич

Заявитель:

КИЕВСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Заявка №

2903964

Приоритет изобретения

31 марта 1980г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений СССР

21 июля 1981г.

Действие авторского свидетельства распро-
страняется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 883174

(61) Дополнительное к авт. свид-ву ..

(22) Заявлено 31.03.80 (21) 2903964/28-13

с присоединением заявки № —

(23) Приоритет —

(51) М. Кл.³

С 12 N 9/50//
А 23 С 19/032

Опубликовано 23.11.81. Бюллетень № 43

(53) УДК 576.15.
.08(088.8)

Дата опубликования описания 23.11.81

(72) Авторы
изобретения

В. М. Гуцалюк, В. Р. Кулинченко, М. Н. Нудьга,
Е. Е. Каталевский, Н. П. Круглова, П. Н. Евтихов,
А. Е. Епифанов и П. Н. Ручков

(71) Заявитель

Киевский технологический институт пищевой промышленности

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА РУССУЛИН

1

Изобретение относится к производст-
ву микробиальных заменителей сычужно-
го фермента для сыродельной промышлен-
ности.

Известен способ получения фермента
медицинского назначения Руделина, пре-
дусматривающий культивирование проду-
цента *Russula decolorans* (штамм 2) на
жидкой питательной среде, в состав ко-
торой вводят 5,0-20 г/л кукурузной
муки. После осаждения эталоном белко-
вый раствор смешивают с фракциониро-
ванной микрокристаллической целлюло-
зой из расчета 8,5-11,5 г/л и фильтру-
ют с использованием нетканых материа-
лов из полипропилена, а фильтрат под-
вергают ультрафильтрации [1].

Недостаток известного способа -
сложность технической схемы, обуслов-
ленная необходимостью получения высоко-
активного препарата, а также низкая
эффективность процесса ультрафильтра-
ции водных экстрактов фермента.

2

Наиболее близким к предлагаемому
по технической сущности является спо-
соб получения молокосвертывающего фер-
ментного препарата Руссулин, предус-
матривающий культивирование его проду-
цента *Russula decolorans* (штамм 2) на
жидкой питательной среде, содержащей
источники углерода, азота, необходи-
мые минеральные соли в условиях аэра-
ции с последующим выделением целевого
продукта из фильтрата культуральной
жидкости и его сушкой [2].

Недостаток известного способа -
его низкая эффективность и небольшой
выход фермента.

Целью изобретения является упроче-
ние способа и увеличение выхода фер-
мента.

Поставленная цель достигается тем,
что согласно способу, предусматриваю-
щему культивирование его продуцента
Russula decolorans (штамм 2) на жид-
кой питательной среде, содержащей ис-
точники углерода, азота, необходимые

минеральные соли в условиях аэрации с последующим выделением целевого продукта из фильтрата культуральной жидкости и его сушкой, выделение ферментного препарата проводят путем ультрафильтрации фильтрата культуральной жидкости до содержания сухих веществ 4-6% с последующей распылительной сушкой ультраконцентрата при pH 5,0-5,5, причем для мембран на основе ацетата целлюлозы pH ультрафильтрации устанавливают 5,5-5,7.

Кроме того, при содержании фермента в грамме сухих веществ фильтрата культуральной жидкости 30-60 тыс. ед. полученный ультраконцентрат диафильтруют водой с pH, равным pH ультраконцентрата, до удельной активности фермента 125-130 тыс. ед./г с последующей ультрафильтрацией диаконцентрата или его непосредственной подачей на сушку.

Технология способа состоит в следующем.

Культура высшего базидиального гриба *Russula decolorans* (штамм 2) выращивается на питательной среде, содержащей, %: кукурузная мука 1,0-1,8; гидролизные дрожжи 0,2-0,3; калий хлористый 0,1; калий фосфорнокислый однозамещенный 0,4-0,06; калий фосфорнокислый двухзамещенный 0,02-0,04; магний сернокислый 0,05-0,07; натрий азотнокислый 0-0,3; pH питательной среды 5,3-5,5, температура ферментации 25-26°C, избыточное давление 0,03-0,05 МПа, подача стерильного воздуха в количестве 0,5 объема на один объем среды в минуту. Продолжительность процесса ферментации 110-150 ч.

После ферментации получаем культуральную жидкость с грибным запахом, светло-коричневого цвета, имеющую во взвешенном состоянии гифы мицелия гриба в виде шариков или нитей различной величины в количестве 4-7 г/л, pH 3,5-5,0; молокосвертывающая активность (МА) 400-200 ед./мл. Культура гриба охлаждается до 18-20°C и освобождается от мицелиальной массы фильтрацией через плотную ткань типа "бязь". Отделенную от культуральной жидкости биомассу сушат с целью ее дальнейшего использования в сельском хозяйстве, а фильтрат подвергают очистке от взвешенных частиц сепарированием с последующей его холодной стерилизацией через асбестоцеллюлозные пластины марки СФ, причем для мембран на основе ацетата целлюлозы (например, полимер-

ные пленки типа "Владипор" марки УАМ-100) перед сепарированием фильтрат культуральной жидкости доводят концентрированным раствором NaOH до pH 5,5-5,7.

Фильтрат культуральной жидкости после предварительной обработки с содержанием сухих веществ 0,4-0,6%, ХПК 1300-1500 мгО₂/л подают на ультрафильтрацию через полупроницаемые мембраны, на 98-100% задерживающие молекулы фермента Руссулин, например мембраны марки УАМ-100. Во избежание термической инактивации фермента температура фильтрата культуральной жидкости в процессе ультрафильтрации поддерживается равной 18-20°C.

Ультрафильтрацию проводят до содержания сухих веществ 4-6%. При этом в ультрафильтрат проходит 95-98% всего объема фильтрата культуральной жидкости, 50-70% низкомолекулярных соединений и балластных белков, в результате чего удельная активность фермента возрастает в 2-3 раза.

Если начальное содержание фермента в грамме сухих веществ фильтрата культуральной жидкости 60-100 тыс. ед./г, ультраконцентрат доводят ледяной уксусной кислотой или концентрированным раствором едкого натра до pH 5,0-5,5 и подают на распылительную сушку с температурой на входе 120-130°C, на выходе 60-70°C, причем ультраконцентрат, полученный на ацетатцеллюлозных мембранах подается на сушку непосредственно после ультрафильтрации. После сушки получают мелкодисперсный, однородный порошок светло-коричневого цвета, 1 г которого растворяется в течение 10 мин в 100 мл воды при 35°C, что соответствует требованиям, предъявляемым сыродельной промышленностью к микробальным заменителям сычужного фермента. Препарат стандартизуют поваренной солью до МА 100 + 5 тыс. ед./г а ультрафильтрат, имеющий ХПК 400 - 500 мгО₂/л и СВ 0,3-0,6%, частично используют для приготовления исходной питательной среды или подают на биологическую очистку.

Если начальная удельная активность фильтрата культуральной жидкости составляет 30-60 тыс. ед./г, полученный ультраконцентрат диафильтруют водой с pH, равным pH ультраконцентрата, до удельной активности фермента 125-130 тыс. ед./г. Диаконцентрат дополнительно ультрафильтруют до СВ 4-6%

ультрафильтрата (выход фермента на стадии дополнительной ультрафильтрации 98%). Ультрафильтрат подают на распылительную сушку, в результате которой получают 126 г ферментного препарата с МА 105 тыс. ед/г (выход фермента на стадии сушки 72%), а диафильтрат и оба ультрафильтрата смешивают (ХПК смеси 390 мг O_2 /л, СВ 0,38%) и направляют на биологическую очистку. Общий выход фермента 65% (с дополнительной

ультрафильтрацией 60%), выход ферментного препарата по весу в пересчете на стандартную активность составляет 1,7 г/л культуральной жидкости.

Применение ультрафильтрации с последующей распылительной сушкой ультраконцентрата в технологии получения молокосвертывающего ферментного препарата Руссулин позволит увеличить выход фермента и снизить затраты на его производство.

Стадии получения ферментного препарата	Выделение препарата методом осаждения		Выделение препарата методом ультрафильтрации	
	Выход по МА на стадии, %	Общий выход по МА, %	Выход по МА стадии, %	Общий выход по МА, %
Предварительная обработка перед вакуум-выпариванием (отделение мицелля гриба, сепарирование)	97-93	97-93	-	-
Предварительная обработка перед ультрафильтрацией (отделение мицелля гриба, сепарирование, осветление)	-	-	95-92	95-92
Вакуум-выпаривание фильтрата культуральной жидкости	90-80	87-74	-	-
Ультра- и диафильтрация фильтрата культуральной жидкости	-	-	96-88	91-81
Осаждение фермента этиловым спиртом, отделение осадка, экстрагирование фермента водой	70-60	61-44	-	-
Лиофильная сушка концентрата	80-70	49-31	-	-
Распылительная сушка концентрата	-	-	75-70	68-57
Стандартизация, фасовка и упаковка готового продукта	99-98	48-30	99-98	67-56

Примечание: Данные по выходу промежуточных продуктов спиртоосажденного ферментного препарата взяты из опытно-промышленного регламента на производство ферментного препарата Ренниноруссулин Г 10 Х, М., 1979.

Формула изобретения

1. Способ получения молокосвертывающего ферментного препарата *Russulin*, предусматривающий культивирование его продуцента *Russula decolorans* (штамм 2) на жидкой питательной среде, содержащей источники углерода, азота, необходимые минеральные соли в условиях аэрации с последующим выделением целевого продукта из фильтрата культуральной жидкости и его сушкой, отличающийся тем, что, с целью упрощения способа и увеличения выхода фермента, выделение ферментного препарата проводят путем ультрафильтрации фильтрата культуральной жидкости до содержания сухих веществ 4-6% с последующей распылительной сушкой ультраконцентрата при pH 5,0-5,5, причем для мембран на основе аце-

тата целлюлозы pH ультрафильтрации устанавливают 5,5-5,7.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что при содержании фермента в грамме сухих веществ фильтрата культуральной жидкости 30 - 60 тыс. ед., полученный ультраконцентрат диафильтруют водой с pH, равным pH ультраконцентрата, до удельной активности фермента 125-130 тыс. ед./г с последующей ультрафильтрацией диаконцентрата или его непосредственной подачей на сушку.

Источники информации,

15 принятые во внимание при экспертизе

1. Авторское свидетельство СССР по заявке № 2794095/28-13, кл. С 12 N 9/50, 1979.

2. Авторское свидетельство СССР № 522230, кл. С 12 D 13/10, 1972 (прототип).

Составитель И. Привалова

Редактор И. Николайчук

Техред З. Фанта

Корректор Г. Решетник

Заказ 10124/37

Тираж 531

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

филиал ИПИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4

СУПРОВІДНА ІНФОРМАЦІЯ ДО ПУБЛІКАЦІЇ
ОПИС ВІНАХОДУ ДО АВТОРСЬКОГО СВІДОЦТВА 883174

Автори винаходу В. М. Гуцалюк, В. Р. Кулінченко, М. Н. Нудьга, Е. Е. Каталевський, Н. П. Круглова, П. Н. Евтіхов, А. Е. Епіфанов і П. Н. Ручков

Заявник Київський технологічний інститут харчової промисловості

СПОСІБ ОТРИМАННЯ МОЛОКОЗГОРТАЛЬНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ
РУСУЛІН

Винахід відноситься до виробництва мікробних замінників сичужного ферменту для сироварної промисловості.

Ключові слова: фермент, мікроби, руссулін

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ 883174

Авторы изобретения В. М. Гуцалюк, В. Р. Кулинченко, М. Н. Нудьга, Е. Е. Каталевский, Н. П. Круглова, П. Н. Евтихов, А. Е. Епифанов и П. Н. Ручков

Заявитель Киевский технологический институт пищевой промышленности

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА
РУССУЛИН

Изобретение относится к производству микробных заменителей сычужного фермента для сыродельной промышленности.

Ключевые слова: фермент, микробы, руссулин

DESCRIPTION OF INVENTION TO COPYRIGHT CERTIFICATE 883174

Authors of invention In. M. of Gucalyuk, In. M. of H Kulinchenko. Nud'ga, E. E. Katalevskiy, H. P. of Kruglova, P. of H. Evtikhov, A. E. Epifanov and P. N. Ruchkov

A declarant is the Kievan technological institute of food retail industry

METHOD OF RECEIPT MOLOKOSVERTYVAYUSCHEGO ENZYMIC PREPARATION OF
RUSSULIN

An invention behaves to the production of microbial substitutes of runnet enzyme for cheesemaking industry.

Keywords: enzyme, microbes, russulin