ETH zürich

ETH Library

Die Anwendung einer Bacillus subtilis-Protease als Labersatzstoff

Doctoral Thesis

Author(s):
Puhan, Zdenko

Publication date:
1966

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000133455

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. Nr. 3861

Die Anwendung einer Bacillus subtilis-Protease als Labersatzstoff

ABHANDLUNG

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften

der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

ZDENKO PUHAN
dipl. Ing.-Agr. Universität Beograd
geboren am 6. Dezember 1935
jugoslawischer Staatsangehöriger

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. E. Zollikofer, Referent
Prof. Dr. L. Ettlinger, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich
1966

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Gewinnung, Reinigung und Charakterisierung eines milchgerinnenden Enzyms von Bacillus subtilis und der Eignung dieser Protease als Labersatzstoff für die Käseherstellung.

Es wurde untersucht, mit welchem geeigneten Nährsubstrat bei günstiger Bebrütungstemperatur eine hohe Produktion an Bacillus subtilis-Protease (BSP) erhalten werden kann.

Die Art der Stickstoff-Quelle hat einen wesentlichen Einfluss. Die Enzymproduktion ist umso höher, je weniger das zugesetzte Kasein bereits abgebaut ist.

Als optimale Temperaturen für die BSP-Bildung erwiesen sich 38 - 40°C. Die Enzymproduktion stieg parallel zum Lebendkeimgehalt und erreichte ihren höchsten Stand bei der maximalen Keimzahl.

BSP ist ein extrazelluläres Enzym.

Das Enzym hat in rohem und gereinigtem Zustand bei Anwendung gleicher Mengen dieselbe proteolytische Wirkung in der Milch.

Das Temperatur-Optimum für die Milchgerinnung beträgt 65°C, das pH-Optimum 5.0 - 5.5.

Calcium-Zusatz beschleunigt die Gerinnung. Die Wirkung des Calciums ist jedoch geringer als bei Lab (Chymosin).

Versuche mit roher Milch bestätigten das Gesetz "Enzymkonzentration x Gerinnungszeit = konstant" nicht. Eine zunehmende Verdünnung des Enzyms, d.h. Verlängerung der Gerinnungszeit, bewirkte eine wachsende Verzögerung, die mit der berechneten Gerinnungszeit nicht übereinstimmte.

In pasteurisierter Milch konnte eine solche Verzögerung nicht beobachtet werden. Anhand zahlreicher Versuche liess sich zeigen, dass in der rohen Milch das Immunglobulin, speziell die Pseudoglobulin-Fraktion, für diese Verzögerung der Milchgerinnung im höheren Verdünnungsbereich (Gerinnungszeit über 300 - 400 Sekunden) verantwortlich ist.

Mit Zusätzen von genau bekannten Mengen Immunglobulin, gewonnen aus Kolostrum und aus Eiklar, liess sich die Wirkung der BSP wesentlich stärker

hemmen als diejenige des Labstoffes.

Die BSP-Gallerte zeigte im Vergleich zur Labgallerte eine viel langsamere Syneresis und eine schlechte Molkenabgabe. Eine Herabsetzung des pH-Wertes der Milch um ca. 0,3 pH beschleunigt die Molkenausscheidung.

Die proteolytische Wirkung von BSP ist stärker als diejenige des Chymosins. Im Gegensatz zum Lab ist BSP im neutralen Bereich aktiver als im sauren Milieu.

Während einer Wärmebehandlung von 5 Minuten bei 75°C wird BSP vollständig inaktiviert. Hält man das Enzym während 30 Minuten bei 50°C, tritt ein Aktivitätsverlust von 9,3 % auf.

Mit der gereinigten BSP wurden Hartkäse nach Emmentalerart hergestellt. Es war notwendig, die Fabrikation den Eigenschaften der BSP anzupassen, da es sonst nicht gelang, den gewünschten Trockenheitsgrad der Käsemasse zu erreichen.

Durch Aenderungen von 3 Faktoren: Erhöhung der Gerinnungstemperatur auf 35°C, Verkürzung der Gerinnungszeit auf etwa 20 Minuten und Senkung des pH-Wertes der Milch auf 6.25 - 6.30 liess sich der Wassergehalt im Käse besser regulieren und demjenigen des Labkäses angleichen.

Die Ergebnisse der chemischen Untersuchungen während der Reifung erwiesen sich im Vergleich zum Labkäse als abweichend. Geschmack und Aroma der Käse waren nicht typisch, doch angenehm und nicht bitter. Dagegen war die Teigbeschaffenheit absolut ungeeignet für einen Hartkäse (kurz, bröckelig, weich).

Aufgrund unserer Versuche kann die BSP für die Hartkäse-Fabrikation vorläufig nicht gebraucht werden.

Sehr gute Resultate wurden jedoch mit Weichkäsen erreicht. Mit BSP fabrizierte Münster- und Camembertkäse reiften normal, und im konsumreifen Zustand liess sich kein deutlicher Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollkäsen feststellen.

SUMMARY

In this thesis it has been tried to produce, purify and characterise a milk clotting enzyme from Bacillus subtilis, for using it as a rennet substitute in cheese manufacturing.

In order to obtain a high Bacillus subtilis protease (BSP) production, different culture media and incubation temperatures were investigated.

The nitrogen source used for the culture medium is of great importance. It could be showed that the enzyme production is higher when the added casein is less broken down.

38 - 40°C proved as optimum temperature for the formation of BSP. The enzyme production increases parallel to the number of viable cells and reaches its highest level with the maximum bacterial count.

BSP is an extracellular enzyme.

The enzyme has the same proteolytic activity, crude an purified, and when applied in equal quantities.

Optima for the milk clotting are 65°C and pH 5.0 - 5.5.

The addition of Calcium accelerates the clotting, the influence, however, is less significant than with rennet.

Experiments with raw milk did not confirm the law "Concentration of enzyme x clotting time = constant". With growing dilution of the enzyme (longer clotting time), the retardation, compared with the calculated clotting time, increases.

This retardation was not observed in pasteurized milk. Numerous tests proved that in raw milk the immune globulin, especially the pseudoglobulin fraction, is responsible for the retardation of the milk clotting at higher dilutions (clotting time above 300 - 400 sec.).

With additions of known quantities of immune globulines, isolated from colostrum and white of egg, the clotting activity of BSP could be inhibited much more than that of rennet.

The BSP coagulum had a slower syneresis than the rennet coagulum, and a

weaker whey separation. Lowering of the pH value of the milk (appr. 0.3 pH) brought a better whey separation.

BSP has a greater proteolytic activity in the neutral pH range, rennet in the acid pH range.

Heat treatment during 5 minutes at 75°C completely inacivates BSP. Keeping the enzyme 30 minutes at 50°C reduces it's activity by 9,3 %.

The purified BSP was used for making hard cheese of the Emmental type. It was necessary to adapt the manufacturing process to the properties of BSP in order to obtain the desirable dryness of the cheese body.

The water content of the fresh cheese could be influenced by changing the manufacturing process as follows: raising the clotting temperature to 35°C, reducing the clotting time to about 20 minutes and lowering the acidity of the milk to pH 6.25 - 6.30. Through this the moisture became similar to that of rennet cheese.

The results of the chemical examinations during ripening showed certain differences between BSP and rennet cheese. Its flavour was not typical but agreeable and not bitter. The body properties of BSP cheese, however, were absolutely unsuitable for a hard cheese (short, crumbly, soft).

Based on all our investigations we come to the conclusion that BSP - at least for the time being - is unsuitable for hard cheese manufacturing.

On the other hand we obtained very good results with soft cheese. "Münster-" and "Camembert-" cheeses, made with BSP, had a normal ripening. There was no distinct difference between ripe BSP an rennet cheeses.

Résumé

L'enzyme coagulant le lait et produit par la protéase du Bacillus subtilis est le sujet de ce travail. Il a pour but d'étudier cet enzyme quant à sa production, sa purification et ses propriétés pour ensuite examiner dans quelles mesures la protéase pourrait remplacer la présure en fromagerie.

Les recherches se protèrent tout d'abord sur le milieu et la température optimum pour une forte production de protéase du Bacillus subtilis (BSP).

La caséine ajoutée au milieu comme source d'azote et son degré de peptonisation a une influence déterminante sur la production d'enzyme. Cette dernière est d'autant plus élévée que le degré de peptonisation de la caséine est moindre.

L'optimum de température pour la formation des BSP se situe entre 38° et 40°C. La production d'enzyme augmente parallèlement au nombre de germes vivante et atteint son niveau le plus élévé au maximum du nombre de germes.

Le BSP est un enzyme extracellulaire.

Employé à l'état purifié ou non et à quantités égales, son action protéolytique dans le lait est la même. Pour la coagulation du lait l'optimum de température resp. de pH est de 65°C resp. 5.0 - 5.5. L'adjonction de Ca accélère la coagulation mais l'action de cet élément est moins marquée que dans le cas de la chymosine.

Des essais avec du lait cru ne confirment pas la loi selon laquelle :"Concentration de l'enzyme x temps de coagulation = constante."

En diluant progressivement l'enzyme, c'est-à-dire en prolongeant le temps de coagulation, le retard est plus grand par rapport au temps calculé par la formule.

Le retard dans le temps effectif par rapport au temps calculé n'est plus observé lorsque l'on oppère avec du lait pasteurisé. De nombreux essais ont démontré que dans le lait cru, l'immunoglobuline, spécialement la fraction pseudoglobuline, est responsable de ce retard dans le temps de coagulation

lors de fortes dilutions (temps de coagulation dépassant 300 - 400 secondes).

L'adjonction de quantités connues d'immunoglobuline extraite du blanc d'oeuf et de colostrum, entraîne une inhibition plus forte pour le BSP que pour la présure.

Le caillé obtenu à partir du BSP montre une synérêse plus lente et plus grande rétention du petit-lait par rapport à celui obtenu à l'aide de la présure. Ce dernier phénomène est moins marqué en abaissant le pH de 0.3.

L'action protéolytique du BSP est plus forte que celui de la chymosine et par rapport à cette dernière, est plus active en milieu neutre qu'en milieu acide.

Soumis à une température de 75°C durant 5 minutes le BSP perd complètement son activité. Un traitement thermique pendant 30 minutes à une température de 50°C a pour effet de diminuer l'activité de 9.3%. En se servant du BSP pour la fabrication du fromage type emmental il fut indispensable d'adapter la fabrication aux particularités de l'enzyme afin d'obtenir une dissécation désirée de la pâte.

Par le jeu des trois facteurs: Augmentation de la température de coagulation jusqu'a 35°C, diminution du temps de coagulation à 20 minutes et abaissement du pH du lait à 6.25 - 6.30, on influence la teneur en eau pour atteindre celle d'un fromage obtenu à l'aide de la présure.

De deux fromages, l'un fabriqué en employant de la présure pour le second du BSP, l'analyse chimique laisse apparaître entre ces deux quelques différences durant la maturation. Pour le second comparé au premier le goût et l'arome sont acceptables, pas amer mais pas du tout typique.

La consistence de la pâte est par contre mauvaise dans le cas d'un fromage à pâte dure (courte, cassante, molle). Ainsi pour l'instant le BSP ne peut être employé dans la fabrication de ce type de fromage. Les essais entrepris dans la fabrication des pâtes molles sont plus concluants. Les types Münster et Camembert ne présentent aucune anomalie durant la maturation et au moment d'être consommés.