



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 66728
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C Patentti myönnetty 10 12 1934
(45) Patent meddelat

(51) Kv.Kk.³/Int.Cl.³ A 23 C 19/032

(21) Patentihakemus — Patentsökning	801072
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	02.04.80
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	02.04.80
(41) Tulot julkaistiin — Brevet offentliggjort	10.10.80
(44) Nähesvärdspäronen ja kundjulkaisun ppm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.08.84
(32)(33)(31) Pyydetty suoikeus — Begärd prioritet	09.04.79

Tanska-Danmark(DK) 1456/79
Toteennäytetty-Styrkt

- (71) Novo Industri A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, Tanska-Danmark(DK)
(72) Sven Branner-Jørgensen, Charlottenlund, Palle Schneider, Ballerup, Peter Eigtved, København, Tanska-Danmark(DK)
(74) Berggren Oy Ab
(54) Menetelmä mikrobijuoksuttimen destabiloimiseksi lämmön avulla -
Förfarande för destabilisering av mikroblöpe med hjälp av värme

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää mikrobijuoksuttimen lämpöstabiloimiseksi. Juoksuttimella tarkoitetaan maitoa koaguloivaa entsyymituotetta.

Juustoa valmistettaessa koaguloidaan maito tarkoituksella kyetä erottamaan kvarkki herasta. Tuotteita, jotka sisältävät juoksutinta, joka on maitoa koaguloiva entsyymi, joka on erotettu vasikan mahasta, on käytetty pitkään tässä tarkoituksessa. Viime aikoina juoksutintarve on voitu tyydyttää vasikanjuoksuttimen avulla, mutta viime vuosina on kehitetty useita vasikanjuoksuttimen korvaavia aineita, joihin sisältyvät mm. mikrobijuoksuttimet, jotka ovat peräisin kannoista Mucor miehei ja Mucor pusillus. Mucor miehei-juoksutin on edullinen juuston valmistuksessa alhaisesta hinnastaan johtuen ja johtuen sen epäspesifisestä proteolyttisestä aktiivisuudesta, ja myös sen johdosta, että se muistuttaa suuresti juoksutinta kalsiumioni-herkkyyden suhteen. Kannan Mucor miehei erinomainen varastoimisstabiilisuus on toinen edullinen ominaisuus, joka ainakin osaksi johtuu sen suuresta lämpöstabiilisuudesta.

Muutamia pastöroituja heroja on käytetty kokomaidon lisäaineena, esimerkiksi herajauheen muodossa, rikastetun maidon valmistamiseksi esimerkiksi pikkulasten ruokia varten. Pastöroitu hera, joka on saatu juustosta, joka on valmistettu käyttäen Mucor miehei-juoksutinta, voi silti sisältää vähäisen juoksutiivisuuden Mucor miehei-juoksuttimen suuresta lämpöstabiiliisuudesta johtuen. Pienikin juoksuttimen jäännösaktiivisuus herajauheessa on haitallinen, koska proteiinin koaguloitumista ei tässä vaiheessa haluta. Tällainen voisi tapahtua mikäli herajauhetta käytettäisiin rikastetun maidon valmistamiseksi esimerkiksi pikkulasten ruokia varten. Rikastunut maito voi hyytyä ennen joutumistaan lapsen vatsaan, esim. syöttöpullossa, mikä aiheuttaisi maidon virtauksen estymisen pullosta.

Aikakausjulkaisussa Biochem. Biophys. Acta 271 (1972), 93-101 (W.S. Rickert, Structural and Functional Determinants of Mucor miehei protease, I. Modification of the NH₂ terminus and lysine residues by carbamylation), on esitetty, että Mucor miehei-proteasi (Mucor miehei-juoksuttimen aktiivinen aineosa) voidaan karbamyloida kaliumsyanaatilla, ja että karbamyloidulla tuotteella on vähäinen lämpödestabiloitumisaste. Käytännön kokeet ovat osoittaneet, että karbamyloidun entsyymin lämpödestabiloituminen on liian alhainen ratkaisemaan edellä mainitun juoksuttimen aktiivisuusprobleemin pastöroidussa herassa. Eräs toinen yritys on kuvattu belgialaisessa patenttihakemuksessa n:o 6/47048, jossa on esitetty entsyymin asyloiminen destabiloimistarkoituksissa.

Esillä olevan keksinnön päämääränä on aikaansaada taloudellisesti edullinen menetelmä mikrobijuoksuttimen lämpödestabiloimiseksi siinä määrin, että ne haitat, jotka aiheutuvat mikrobijuoksuttimen jäännösaktiivisuudesta pastöroidussa herassa, voidaan oleellisesti välttää.

Näin ollen keksintö käsittää menetelmän mikrobiologisen juoksuttimen termiseksi destabiloimiseksi aktiivisuuden vähenemiseen asti, joka ei ylitä 50 %, ja keksintö on tunnettu siitä, että juoksutinta käsitellään vesiväliaineessa pH-arvossa 3-10 halogenoitujen yhdisteiden ryhmän hapetusaineella, jolloin halogeeniatomin hapetusluku on 0-3 ja reaktioseoksessa hapetusaineen ja entsyymivalmisteen kokonaisproteiinimäärän painosuhte on 0,01-1.

On todettu, että keksinnön mukaisesti modifioitu mikrobijuok-
sutin destabiloituu huomattavasti ja että destabiloimisaste
on riittävä täyttämään heran hyväksikäytölle asetettavat vaa-
timukset ilman, että sillä on huomattavaa haitallista vaiku-
tusta juoksutinpreparaatin varastoimisstabiilisuuteen. Yllät-
täen on todettu, että keksinnön mukaisesti on mahdollista ai-
kaansaada sellainen destabiloimisaste (määritelty tarkemmin
jäljempänä), joka on vähintään 5°C, edullisesti 7-11°C, joka
tällä edullisella alueella saattaa modifioidun entsyymin läm-
pöstabiilisuuden vastaamaan vasikan juoksuttimen vastaavaa
arvoa, jolloin vasikan juoksuttimen edulliset ominaisuudet
yhdistyvät mikrobijuoksuttimen edullisten ominaisuuksien
kanssa.

Juoksutinaktiivisuus määrätään menetelmällä British Standard
3624: 1963 (Menetelmä juoksuttimen maidon koaguloimiskyvyn
määrittämiseksi).

Koska tämä keksintö koskee mikrobijuoksuttimen säädettyä
lämpödestabilointia, on jäljempänä selitetty niitä menetel-
miä, joita käytetään lämpöstabiilisuuden mittaamiseksi ja
lämpöstabiilisuuden määrän pienentämiseksi, so. destabiloitui-
misen määrän pienentämiseksi, jolloin tämä destabiloituminen
esitetään yksikössä °C.

Ihanteellisissa olosuhteissa voidaan entsyymi inaktivoida
sopivan korkealla lämpötilatasolla siten, että entsyymin jään-
nösaktiivisuus pienenee ajan funktiona alenevan eksponentti-
käyrän mukaisesti, so. jossa esiintyy selvästi määriteltävä
puoliintumisaika, joka on lämpötilan (°C) funktio. Puoliintu-
misaika $T_{1/2}$ voidaan laskea kaavasta

$$T_{1/2} = \frac{(t_2 - t_1) \ln 2}{\ln A_1 - \ln A_2}$$

jossa A_1 on entsyymiaktiivisuus mitattuna kuumentamisen jäl-
keen määrättyyn lämpötilaan ajan t_1 kuluessa, kun taas A_2 on
entsyymiaktiivisuus mitattuna ajan t_2 pituisen kuumentamisen
jälkeen samaan määrättyyn lämpötilaan. Puoliintumisaika on
sitä lyhyempi mitä korkeampi on lämpötila muiden olosuhteiden

pysyessä ennallaan. Useita entsyymejä käytettäessä vaikuttaa entsyymiliuoksen pH-arvo ja ionivahvuus sekä määrättyjen suolojen esiintyminen oleellisesti puoliintumisaikaan. Lisäksi voi entsyymin kemiallinen modifiointi muuttaa puoliintumisaikaa oleellisesti. Mikäli määrätyn entsyymin kemiallinen modifiointi aiheuttaa entsyymin lämpödestabiloitumisen, sanotaan destabiloitumisasteen olevan $n^{\circ}\text{C}$ jos alkuperäisellä (modifioimattomalla) entsyymillä ja modifioidulla entsyymillä on sama puoliintumisaika lämpötilassa $N^{\circ}\text{C}$ ja vastaavasti lämpötilassa $(N-n)^{\circ}\text{C}$.

On kuitenkin huomattava, että destabiloimisarvot ovat likiarvoja määrättyyn asteeseen saakka johtuen puoliintumisajan likiarvoluonteesta. Kaikki destabiloitumisarvot on tässä selityksessä mitattu pH-arvossa 6,0, koska destabiloimismittauksen tulokset riippuvat pH-arvosta.

Normaalisti seuraa keksinnön mukaista käsittelyä aktiivisuuden pieneneminen. On todettu, että taloudellisista syistä destabiloitumista ei tule suorittaa siinä määrin, että vastaava aktiivisuuden menetys on suurempi kuin noin 50 %, edullisesti suurempi kuin noin 30 %, ja kaikkein edullisimmin sen tulee olla alle 10 %.

Tyypillisessä tapauksessa noin 10°C suuruinen destabiloituminen, aktiivisuuden menetyksen ollessa rajoitettuna alle 10 %, näyttää olevan sopiva kompromissi edellä mainittujen vastakkaisten tekijöiden välillä.

Esimerkkejä sopivista hapettavista aineista, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisesti, ovat hypokloriitti, esim. natriumhypokloriitti, hypobromiitti, esim. natriumhypobromiitti, vapaa kloori, N-kloori-meripihkahappoimidi, kloramiini-T ja trikloori-isosyanuurihappo.

Hapetusainetta on käytettävä sellaisessa väkevyydessä, että haluttu destabiloitumisaste aikaansaadaan kohtuullisessa ajassa, joka voi olla muutamasta minuutista aina 48 tuntiin tai vielä pitempi niissä tapauksissa, joissa reaktion annetaan tapahtua sitä keskeyttämättä. Siinä tapauksessa, että

hapetusaineen väkevyyks on liian pieni, on destabiloituminen myös liian pieni, ja siinä tapauksessa, että hapetusaineen väkevyyks on liian suuri, on myös aktiivisuuden menetys liian suuri. Optimiväkevyydet vastaavat varsinaisesti hapetusaineen ja entsyymipreparaatissa olevan proteiinin kokonaismäärän välistä painosuhdetta, noin 3-30 osaa hapetusainetta per 100 osaa kaikkiaan proteiinia. Jos mikrobijuoksutinvalmiste puhdistetaan suureen yksikköaktiivisuuteen, voidaan hapetusaineen määrä pienentää niinkin pieneen arvoon kuin 1 g per 100 g kaikkiaan proteiinia.

Se pH-arvo, jossa reaktio tapahtuu, voi vaihdella laajoissa rajoissa, so. välillä noin pH 3 ja 10, jolloin edullisimmat alueet riippuvat pääasiallisesti hapetusaineesta. Täten hypokloriitin ollessa hapetusaineena on edullisin pH-alue 5-9, vielä edullisemmin 6-8.

Reaktiolämpötila ei ole kriittinen silloin, kun reaktiolämpötiloja pidetään sellaisissa arvoissa, esim. alle noin 30°C, joissa entsyymien stabiilisuus on tyydyttävä. Entsyymistabiilisuutta voidaan kuitenkin parantaa lisäämällä tunnettuja proteiininstabiloimisaineita, esim. NaCl, määrässä 5-20 % entsyymipreparaattia, tai sorbitolia tavanomaisissa entsyymiä stabiloivissa määrissä.

Kysymyksessä olevaa reaktiomekanismia ei täysin ymmärretä eikä myöskään ole varmaa sisältääkö lopullinen destabiloitu entsyymimolekyylä halogeenisubstituentteja. On ilmeistä, että entsyymissä, samoin kuin kaikissa proteiinimolekyyleissä, voi tapahtua ja tapahtuu useita erilaisia reaktioita, esim. hapetus- ja kloorausreaktioita. Koska mielenkiinto tässä yhteydessä kohdistuu destabiloitumiseen, ovat kaikki sellaiset reaktiot, jotka deaktivoivat entsyymien, haitallisia, kun taas sellaiset reaktiot, jotka termisesti destabiloivat entsyymiä pienentämättä entsyymiaktiivisuutta, ovat toivottavia.

Destabiloimisarvo vähintään 5°C, edullisesti 7-11°C, ja tätä seuraava aktiivisuuden menetys, joka ei ole suurempi kuin 30 %, ja on edullisesti alle 10 %, katsotaan rajoiksi keksintöä toteutettaessa. Aktiiviset halogeeni-hapetusaineet täyttä-

vät nämä ehdot. Vapaa kloori, joka johdetaan vesipitoiseen väliaineeseen, muuttuu kloridi- ja hypokloriitti-ioneiksi. Edellä mainitut N-kloorireagenssit muuttuvat vastaaviksi hypokloriitti-ioneiksi. Edullinen reagenssi on natriumhypokloriitti, jota käytetään pH-alueella 5-9, edullisesti 6-8.

Asyloiminen, joka kuvataan belgialaisessa patenttihakemuksessa n:o 6/47048, aiheuttaa noin 3°C suuruisen destabiloitumisen. Hapettaminen vetyperoksidilla aikaansaa myös destabiloitumisen.

Entsyymien suora käsittely aktiivisella halogeenireagenssilla esim. natriumhypokloriitilla, aikaansaa useita käsittelyetuja ja peroksidireaktioon verrattuna. Pääedun oletetaan olevan sen, että aktiivinen halogeenireagenssi voi kulua täydellisesti reaktioseoksessa, kun taas reaktio peroksidia käytettäessä on lopetettava esimerkiksi katalaasia lisäämällä.

Keksinnön mukaisen menetelmän eräs edullinen toteuttamismuoto käsittää käsittelyn sellaisella hapetusaineella, jonka muodostaa klooripitoinen yhdiste.

Eräs toinen edullinen keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamismuoto käsittää käsittelyn destabiloimisasteeseen vähintään 5°C, edullisesti 7-11°C, siten, että juoksutinaktiivisuuden pieneneminen ei ylitä 50 % eikä ole edullisesti suurempi kuin 30 %.

Eräs toinen edullinen keksinnön toteuttamismuoto esittää käsittelyn hapetusaineella, joka on halogeenipitoinen yhdiste, jonka halogeenin hapetusluku on 0 tai 1.

Eräs toinen edullinen keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamismuoto käsittää hypokloriittikäsittelyn.

Eräs toinen keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamismuoto käsittää Mucor miehei-juoksuttimen käsittelyn.

Eräs toinen edullinen keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamismuoto käsittää käsittelyn hapetusaineella, jolloin hapetusaineen ja entsyymipreparaatissa olevan proteiinin kokonaismäärän

väläinen painosuhte reaktioseoksessa on välillä 0,01 ja 1 ja edullisesti välillä 0,03 ja 0,3.

Keksinnön mukaisen menetelmän erään toisen edullisen toteuttamismuodon mukaisesti on vesipitoisen väliaineen pH-arvo välillä 5 ja 9.

Eräessä toisessa keksinnön mukaisen menetelmän edullisessa toteuttamismuodossa on vesipitoisen väliaineen lämpötila välillä 0 ja 30°C.

Keksinnön erään toisen toteuttamismuodon mukaisesti keksintö käsittää destabiloidun mikrobijuoksuuttimen, joka on valmistettu keksinnön mukaista menetelmää käyttäen.

Keksinnön kolmannen toteuttamismuodon mukaisesti se käsittää menetelmän juuston valmistamiseksi, jonka mukaisesti keksinnön mukaista juoksuutinta käytetään maidon koaguloimiseksi. Se hera, joka on peräisin tästä juustonvalmistuskäsittelystä, voidaan käyttää pastöroimisen jälkeen proteiinipitoisena aineosana ilman vaikeuksia.

Käytännössä on todettu, että destabiloidun juoksuuttimen käyttö on edullista valmistettaessa kestojuustoja.

Kahdessa samanlaisessa 150 litran suuruisessa juustonvalmistussäiliössä valmistettiin kukin juusto käyttäen modifioitua Mucor miehei-juoksuutinta, joka oli valmistettu tämän selityksen esimerkin 16 mukaisesti, ja käytetään modifioimatonta Mucor miehei-juoksuutinta. Kuusi koetta suoritettiin kahteen kertaan. Näiden kokeiden tuloksina voitiin todeta, että keksinnön mukainen juoksuutin kykeni aikaansaamaan tavanomaisia tanskalaisia juustolaatuja, kuten Samsø ja Danbo, joilla oli vähintään yhtä hyvät ominaisuudet kuin käytettäessä vastaavaa modifioimatonta juoksuutinta.

Destabiloimismenetelmä voidaan toteuttaa ja edullisesti toteutetaan lopullisena vaiheena mikrobijuoksuutinta valmistettaessa. Todellisuudessa voidaan (kaupallisesti) puhdasta mikrobijuoksuutinta tai juoksuutinkonsentraattia käyttää tätä

keksintöä toteutettaessa. Niinpä esim. mikrobijuoksutinliuoksen, joka muutoin on valmista tavanomaisiin viimeistelykäsittelyihin ennen käyttöä, pH-arvo säädetään määrätylle käsittelyalueelle (esimerkiksi pH 7) ja sekoitetaan sitten ympäristön lämpötilassa hapetusaineliuoksen kanssa, jonka hapetusaineen määrä on edellä mainitulla painosuhtealueella 3-30 osaa (esimerkiksi natriumhypokloriitin määrä on 20 osaa) 100 osaa kohden mikrobijuoksutinliuoksessa olevan proteiinin kokonaismäärästä. Seoksen annetaan sitten seistä muutamia tunteja siksi, kunnes haluttu destabiloimisaste on saavutettu, esim. 2-3 tuntia. Reaktio voidaan lopettaa lisäämällä aktivoitua hiiltä tai pelkistysainetta, kuten natriumsulfiittia, sopivan reaktioajan kuluttua. Destabiloitua entsyymituotetta voidaan sitten käsitellä tavanomaisten viimeistelykäsittelyjen avulla, esim. suodattamalla, säätämällä pH-arvo ja entsyymin yksikköaktiivisuus tavanomaisille tasoille jne.

Keksintöä kuvataan seuraavassa yksityiskohtaisemmin alla oleviin esimerkkeihin viitaten.

Lähtöaine on seuraavissa esimerkeissä juoksutinväkeväite, joka on valmistettu brittiläisen patentin n:o 1 108 287 toisen koetehdaskokeen mukaisesti, jolloin ainoastaan viljelyliuos väkevöitiin aktiivisuuteen, joka vastasi suunnilleen puhtaan entsyymin 1 %:sta liuosta (Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg (1970), Vol. 37, n:o 14, 301-325), ja raakaan väkevöitteeseen lisättiin 18 % NaCl. Yksinkertaisuuden vuoksi nimitetään tätä väkevöitettä seuraavassa nimellä "RENNILASE 46".

Esimerkki 1

Kaksi kolmen 25 ml:n erän sarjaa, jotka oli valmistettu sekoittamalla 12,5 ml RENNILASE 46 ja 12,5 ml vettä, säädettiin vastaavasti pH-arvoihin 7,0, 8,0 ja 9,0 lisäämällä 1-n NaOH, ja kuhunkin näihin seoksiin lisättiin 0,4 ml 2,25 M NaClO-liuosta, jolloin pH-arvo pidettiin vakiona edellä mainituissa arvoissa.

Ensimmäinen sarja, joka käsitti kolme erää, sovitettiin jäädytyslaitteeseen yli yön (noin 18 tuntia). Toinen sarja, joka

66728

käsitti kolme erää, pidettiin huoneen lämpötilassa 2 tuntia. Mainittujen jaksojen jälkeen mitattiin pH-arvon aleneminen. Tämän jälkeen nämä annokset laimennettiin sekoittamalla 0,2 ml 50 ml:n kanssa vettä ja samanaikaisesti pH säädettiin arvoon 6,0 natriumasettaatti/etikkahapolla.

Ne pH-arvon alenemiset ja jäännösaktiivisuudet, jotka saatiin juoksuttimen ja natriumhypokloriitin reaktion jälkeen, on esitetty seuraavassa taulukossa.

Alku pH	pH kun on kulunut		Jäännösaktiivisuus (%) kun on kulunut	
	2 tuntia	18 tuntia	2 tuntia	18 tuntia
7,0	6,9	6,9	86,3	83,1
8,0	7,6	7,6	86,1	81,7
9,0	8,2	8,2	78,4	75,4

Tämän jälkeen lämpökäsiteltiin laimennettuja näytteitä lämpötilassa 55°C 30 min pH-arvossa 6,0, jonka jälkeen mitattiin jäännösaktiivisuudet.

Alku pH	Jäännösaktiivisuus (%) 30 minuutin pituisen lämpökäsittelyn jälkeen lämpötilassa 55°C	
	2 tunnin näyte	18 tunnin näyte
7	16,3	4,2
8	16,3	4,3
9	32,3	14,6
Vertailu	98,7	

Edellä mainitut jäännösaktiivisuudet vastaavat seuraavia puoliintumisajan ja destabiloitumisen arvoja.

Alku pH	$T_{1/2}$ min; 30 min. 55°C, pH 6,0		Destabiloituminen	
	2 tuntia	18 tuntia	2 tuntia	18 tuntia
7	11,5	6,5	11	12
8	11,5	6,6	11	12
9	18,4	10,8	10	11
Vertailu	-		-	

Esimerkki 2

Kolmen 150 ml suuruisen RENNILASE 46-erän pH säädettiin vastaavasti arvoihin 5,0, 6,0 ja 7,0. Kukin näistä kolmesta erästä jaettiin kolmeksi osaksi, joihin lisättiin vastaavasti 0,8 ml, 1,2 ml ja 1,6 ml kaupan olevaa 2,25 M NaOCl-liuosta, jolloin pH pidettiin vakiona mainituissa arvoissa.

Näitä yhdeksää näytettä varastoitiin sitten ympäristön lämpötilassa (22°C) 18-20 tuntia, jonka jälkeen kustakin yhdeksän näytteen sarjasta otettiin 10 ml:n näyte. Kuhunkin näihin 10 ml:n näytteisiin lisättiin vastaavasti 0,4, 0,6 tai 0,8 ml 1 M Na₂SO₃-liuosta riippuen siitä, kuinka paljon NaOCl:ä oli lisätty vastaavaan erään, tarkoituksella poistaa mahdollisesti läsnä oleva ylimääräinen hypokloriitti.

0,2 ml täten käsiteltyjä näytteitä laimennettiin 50 ml:lla vettä ja pH säädettiin arvoon 6,0 etikkahappo/natriumasetaatilla. Laimennetut ja pH-arvoltaan säädetyt näytteet lämpökäsiteltiin lämpötilassa 55°C 30 min. Aktiivisuusaanto, jäännösaktiivisuus lämpökäsittelyn jälkeen ja laskettu puoliintumisaika sekä destabiloituminen ilmenevät seuraavasta taulukosta.

pH	Lisätty NaOCl-määrä, ml	Aikaansaa-tu aktiivisuus, %	Jäännösaktiivisuus, %, 30 min, 55°C, pH 6,0	T _{1/2} minuuttia, 30 min, 55°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
	0,8	99,4	59,4	39,9	8
5,0	1,2	95,3	57,6	37,7	9
	1,6	84,8	56,1	36,0	9
	0,8	100	53,9	33,6	9
6,0	1,2	91,6	50,5	30,4	9
	1,6	81,4	47,9	28,3	9
	0,8	98,1	49,1	29,2	9
7,0	1,2	87,7	42,7	24,4	10
	1,6	78,3	35,7	20,2	10

Esimerkki 3

600 ml RENNILASE 46 säädettiin lämpötilassa noin 10°C pH-arvoon 6,0 4-n NaOH:n avulla. Tämä osa jaettiin kuuteen 100

ml:n erään. Kuhunkin näihin kuuteen erään lisättiin vastavasti 0, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 ja 2,4 ml kaupallista 2,25 M NaOCl-liuosta ja kaikkien kuuden osan pH säädettiin arvoon 7.

Noin 15 tunnin kuluttua lisättiin suunnilleen lämpötilassa 5°C 2 ml 1 M Na₂SO₃:a tarkoituksella poistaa mahdollinen ylimääräinen hypokloriitti. Sulfiitin lisäys ei muuttanut juoksuuttimen stabiilisuutta. Aktiivisuuden muutos mitattiin. Myös 5 ml näytteitä laimennettiin 10 kertaaisesti 0,1 M asetaattipuskurissa, pH 6,0, jonka jälkeen 5 ml laimennettuja näytteitä lämpökäsiteltiin lämpötilassa 60°C 15 min. Jäännösaktiivisuus lämpökäsittelyn jälkeen määrättiin ja puoliintumisaika ja destabiloituminen laskettiin. Arvot ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Lisätty määrä 2,25 M NaOCl, ml	Kokonaisaktiivisuuden muutos, %	Jäännösaktiivisuus-% lämpökäsittelyn jälkeen	T _{1/2} min; 15 min, 60°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
0	-	99	-	-
0,8	+ 0,6	35	9,9	9
1,2	0	19	6,3	10
1,6	- 4,4	14	5,3	10
2,0	- 8,5	10	4,5	10
2,4	-14,9	7	3,9	11

Esimerkki 4

Tämän esimerkin lähtöaine ei ollut RENNILASE 46 vaan sellainen RENNILASE 46, johon ei ollut lisätty 18 % NaCl.

Edellä mainitun lähtöaineen perusteella valmistettiin viisi 200 g näytettä, jotka sisälsivät vastaavasti 0, 5, 10, 15 ja 20 % NaCl. pH säädettiin arvoon 6,0 4-n NaOH:n avulla.

Kustakin edellä mainitusta viidestä 200 g näytteestä otettiin 100 ml:n näyte. Kuhunkin viiteen 100 ml:n näytteeseen lisättiin 1 ml kaupallista 2,25-n NaOCl-liuosta, jolloin lämpötila pidettiin välillä 5 ja 10°C. Kaikkien viiden 100 ml:n näytteen pH säädettiin sitten arvoon 7,0 4-n NaOH:n avulla ja seistettiin lämpötilassa noin 5°C.

Noin 20 tunnin pituisen seisottamisajan jälkeen määrättiin aktiivisuuden muutos. Myös 5 ml näytteitä laimennettiin 10-kertaisesti 0,1 M asetaattipuskurilla, pH 6,0, jonka jälkeen 5 ml suuruisia laimennettuja ja pH-arvoltaan säädettyjä näytteitä lämpökäsiteltiin lämpötilassa 60°C 15 min. Tämän jälkeen määrättiin jäännösaktiivisuus. Ei-lämpökäsitelty näyte käsiteltiin rinnakkain vertailunäytteenä.

Koeparametrit ja tulokset ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Lisätty NaCl-prosenttimäärä	Lisätty määrä 2,25 M NaOCl, ml	Aktiivisuuden muutos, %	Jäännösaktiivisuus 15 min pituisen lämpökäsittelyn jälkeen, %	T _{1/2} , min 15 min, 60°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
0	0	-	98	-	-
0	1	- 4,2	31	8,9	9
5	1	+ 7,8	32	9,1	8
10	1	+ 4,0	40	11,3	8
15	1	+ 6,8	46	13,4	8
20	1	+ 2,4	51	15,4	8

Esimerkki 5

Kymmenen koesarjaa suoritettiin erilaisissa pH-arvoissa, nimittäin arvoissa 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 ja 11,0. Kussakin sarjassa oli kolme näytettä, jotka oli valmistettu laimentamalla 12,5 ml suuruisia eriä RENNILASE 46 yhtä suurella tilavuusmäärällä vettä. Ensimmäiseen näytteeseen kussakin sarjassa lisättiin 75 µl kaupan olevaa 2,25 M natriumhypokloriittiliuosta, toiseen 150 µl ja kolmanteen 300 µl, jotka määrät vastaavat (noin) vastaavasti 4, 8 ja 16 g natriumhypokloriittia 100 g kohden näytteessä olevaa kokonaisproteiinia. Kunkin sarjan pH pidettiin vakiona esitetyissä arvoissa. Reaktiolämpötila oli sama kaikissa sarjoissa (noin 5°C).

Suunnilleen 114, 66 ja 90 tunnin pituisten reaktioaikojen jälkeen, käytettäessä vastaavasti kunkin sarjan ensimmäistä, toista ja kolmatta näytettä, laimennettiin kaikki näytteet 50 ml:ksi. Analyysissä käytettävät näytteet valmistettiin

laimentamalla sopivasti (suunnilleen suhteessa 1:125), jolloin pH säädettiin samanaikaisesti arvoon 6,00 etikkahapon ja natriumasetatiliuosten avulla.

Näitä näytteitä lämpökäsiteltiin sitten lämpötilassa 55°C 30 min. Aktiivisuusarvo, jäännösaktiivisuus lämpökäsittelyn jälkeen, laskettu puoliintumisaika ja siitä laskettu destabiloituminen on esitetty seuraavassa taulukossa.

Alku pH	Lisätty NaClO- määrä, ul/25 ml näytettä	Lopul- linen pH- arvo	Aktiivi- suus- saanto, %	Jäännös- aktiivi- suus, %	T _{1/2} ' min	Destabi- loitumi- nen, °C
2,5	75	2,52	93,0	77,3	80,8	6
	150	2,75	80,5	71,6	62,2	7
	300	2,50	16,2	40,7	23,1	9
3	75	3,00	101,3	76,9	79,2	6
	150	3,15	97,6	60,5	41,4	8
	300	3,00	32,4	70,0	22,7	9
4	75	3,96	106,1	71,8	62,8	7
	150	4,05	102,4	64,2	46,9	8
	300	3,94	69,8	41,3	23,5	9
5	75	4,95	104,4	74,5	70,6	7
	150	4,99	99,4	62,2	43,8	8
	300	4,80	71,1	45,1	26,1	10
6	75	5,86	101,7	59,4	39,9	8
	150	5,98	94,8	40,8	23,2	9
	300	5,66	61,5	8,6	8,48	11
7	75	6,61	96,3	39,5	22,4	9
	150	6,64	90,2	7,1	7,86	11
	300	6,51	49,2	4,0	6,46	11
8	75	7,40	94,3	48,3	28,6	8
	150	7,26	87,1	6,4	7,57	11
	300	-	-	-	-	-
9	75	8,02	90,4	68,2	54,3	7
	150	7,79	77,7	17,5	11,9	10
	300	7,34	47,3	9,3 x)	2,92 x)	13
10	75	8,34	81,2	78,6	86,4	6
	150	8,23	68,5	34,0	19,3	9
	300	7,83	44,4	9,3 x)	2,92 x)	13
11	75	10,34	57,2	93,5	30,9	4
	150	10,02	42,2	74,4	70,3	7
	300	9,80	9,9	-	-	-

x) 10 min pituinen lämpökäsittely.

Nämä arvot osoittavat, että seuraavat olosuhteet ovat optimaaliset suoritettaessa destabiloiminen natriumhypokloriitilla.

pH-alue: 6-8.

Natriumhypokloriittimäärä: 150 μ l 2,55 M liuosta per näyte, vastaa (suunnilleen) 8 g natriumhypokloriittia per 100 g kaikkiaan proteiinia.

Esimerkki 6

Valmistettiin kaksi erää seoksesta, jossa oli 25 ml RENNILASE 46 ja 20 g jäävettä, jolloin pH säädettiin arvoon 7,0 4-n NaOH:n avulla.

Näihin kahteen erään lisättiin vastaavasti 33 ja 66 mg N-kloorimeripihkahappoimidiä liuotettuna 5 ml:an jäävettä, jolloin pH säädettiin samanaikaisesti arvoon 7,0.

Kaksi tuntia myöhemmin laimennettiin 0,2 ml erät 50 ml:lla vettä, jolloin pH säädettiin samanaikaisesti arvoon 6,0 natriumasettaatti/etikkahapon avulla.

Jäännösaktiivisuus reaktion jälkeen juoksuttimen ja N-kloorimeripihkahappoimidin avulla oli seuraava:

N-kloorimeripihkahappoimidin lisätty määrä mg	Jäännösaktiivisuus, %
33	99,0
66	96,5

Lämpökäsittely suoritettiin samalla tavoin kuin esimerkissä 1 lämpötilassa 55°C 30 min pH-arvossa 6,0. Tämän jälkeen jäännösaktiivisuudet määrättiin ja laskettiin puoliintumisajat ja destabiloitumiset. Tulokset ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Lisätty N-kloorimeripihkahappoimidi-määrä, mg	Jäännösaktiivisuus, 55°C, 30 min, pH 6,00, %	T _{1/2} min, 30 min, 55°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
33	41,5	23,6	10
66	26,4	15,6	10

Esimerkki 7

NaOBr-liuos, jonka molaarisuus oli noin 2, valmistettiin lisäämällä tipottain 3 g Br₂:a 10 ml:an sekoitettua 4-n NaOH-liuosta jääkylvyn avulla jäähdyttäen.

25 ml RENNILASE 46 sekoitettiin 25 ml:n kanssa vettä ja pH säädettiin arvoon 7,5 1-n NaOH:lla. 25 ml:an tätä liuosta lisättiin 0,5 ml edellä mainittua natriumhypobromiittiliuosta noin tunnin kuluessa, jolloin pH pidettiin arvossa välillä 7,3 ja 7,8 1-n HCl:ää lisäämällä.

Noin 30 min myöhemmin määrättiin aktiivisuuden menetys ja lämpöstabiilisuus. Aktiivisuuden menetys oli noin 20 % ja jäännösaktiivisuus 20 min pituisen käsittelyn jälkeen lämpötilassa 60°C ja pH-arvossa 6,0 oli 14 %, mikä vastasi noin 7 minuutin puoliintumisaikaa tai noin 8°C suuruista destabiloitumista.

Esimerkki 8

50 ml RENNILASE 46 laimennettiin 50 ml:lla vettä. Seos jäähdytettiin jääkylvyn avulla ja pH säädettiin arvoon 7,0 1-n NaOH:lla. Tämän jälkeen lisättiin noin 0,1 g vapaata Cl₂:a, jolloin pH aleni arvoon noin 3,8 ja neste tuli sameaksi ja vaaleammaksi. Reaktioseoksen annettiin vaikuttaa noin 10 min ja sitten lisättiin 4 ml 1 M Na₂SO₃-liuosta ylimääräisen Cl₂:n poistamiseksi.

0,2 ml näytteet laimennettiin ennen Cl₂:n lisäämistä ja sen jälkeen 50 ml:lla vettä ja pH säädettiin arvoon 6,0 natriumasettaatti/etikahapolla. Se aktiivisuuden menetys, joka liittyi juoksuttimen ja kloorin väliseen reaktioon, oli 21 %.

Kloorilla käsitellyn juoksuttimen lämpökäsittelyn jälkeen lämpötilassa 55°C 30 minuutin kuluessa oli jäännösaktiivisuus 63 %. Tämä vastaa noin 45 minuutin puoliintumisaikaa ja noin 8°C destabiloitumista.

Esimerkki 9

Valmistettiin kaksi erää 25 ml:sta RENNILASE 46 ja 25 g:sta jäävettä ja pH säädettiin arvoon 7,0 4-n NaOH:lla.

Näihin kahteen seokseen lisättiin vastaavasti 60 ja 120 mg trikloori-isosyanourihappoa ja samanaikaisesti pH säädettiin arvoon 7,0.

Suunnilleen 4 tuntia myöhemmin laimennettiin 0,2 ml edellä mainittuja seoksia 50 ml:lla vettä ja samanaikaisesti pH säädettiin arvoon 6,0 natriumasettaatti/etikkahapolla. Täten laimennettuja näytteitä lämpökäsiteltiin lämpötilassa 55°C 30 min.

Aktiviteettisaannot, jäännösaktiivisuudet lämpökäsittelyn jälkeen ja laskettu puoliintumisaika ja destabiloituminen ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Lisätyn trikloori-isosyanuurihapon määrä, mg	Aktiivisuusaanto, %	$T_{1/2}$ min, 30 min, 55°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
60	93,0	35	9
120	81,5	16	10

Esimerkki 10

Kaksi 25 ml:n erää RENNILASE 46 sekoitettiin 20 g:n kanssa jäävettä kummassakin erässä ja pH säädettiin arvoon 7,0 4-n NaOH:n avulla.

Molempiin edellä mainittuihin eriin lisättiin sitten vastavasti 70 ja 140 mg kloramiini-T:tä liuotettuna 5 ml:an jäävettä, ja samanaikaisesti pH säädettiin arvoon 7,0.

Noin 2 tuntia myöhemmin laimennettiin 0,2 ml edellä mainittuja näytteitä 50 ml:lla vettä, jolloin pH säädettiin samanaikaisesti arvoon 6,0 natriumasettaatti/etikkahapolla, ja täten laimennetut ja pH-arvoltaan säädetyt näytteet lämpökäsiteltiin lämpötilassa 55°C 30 min. Aktiivisuusaannot, jäännösaktiivisuudet lämpökäsittelyn jälkeen ja lasketut puoliintumisaika-arvot sekä destabiloituminen ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Lisätty kloramiini T-määrä, mg	Aktiivisuusaanto, %	$T_{1/2}$ min, 30 min, 55°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
70	96,5	19,2	10
140	77,9	8,5	12

Esimerkki 11

25 ml RENNILASE 46 säädettiin pH-arvoon 10,0 1-n NaOH:lla.

66728

Seos jäädytettiin jäävedessä ja 2 ml:n liuoseriä, jotka sisälsivät 0,05 M I₂ 0,25 M KI:ssä, lisättiin edellä mainittuun 25 ml:an pH-arvoltaan säädettyä RENNILASE 46, jolloin samanaikaisesti pH säädettiin arvoon 10 l-n NaOH:lla kunkin 2 ml:n suuruisen jodireagenssin lisäämisen jälkeen. Otettiin vertailunäyte ja myös 0,5 ml näyte ennen jokaista uutta jodireagenssin 2 ml suuruisen lisäämisen suorittamista.

Analyttisissä tarkoituksissa laimennettiin 0,5 ml näytteet ja pH säädettiin arvoon 6,0 etikkahappo/natriumasetaatilla. Tämän jälkeen suoritettiin lämpökäsittely lämpötilassa 60°C 30 minuutin kuluessa.

Koetulokset ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Lisätty I ₂ -liuoksen määrä KI:ssä, ml	Aktiivisuus-saanto, %	Jäännösaktiivisuus, 60°C, 30 min, %	T _{1/2} min, 30 min, 60°C, pH 6,0	Destabiloituminen, °C
0	100	88	163	0
2	100	88	163	0
4	96	90	197	0
6	91	88	163	0
8	76	85	128	1
10	63	71	61	3

Esimerkki 12

RENNILASE 46 laimennettiin käyttämättä lisättyä NaCl:a kolmasti. 20 ml täten laimennettua RENNILASE 46 säädettiin pH-arvoon 8,5 ja jäädytettiin lämpötilaan 0°C, jonka jälkeen lisättiin 0,7 ml liuosta, jossa oli 0,05 M I₂ 0,25 M KI:ssä. Noin 15 minuuttia myöhemmin säädettiin pH arvoon 6 lisäämällä 0,1 M NaHSO₃:a.

Tämä näyte laimennettiin analyttisiin tarkoituksiin ja samanaikaisesti pH säädettiin arvoon 6,0 etikkahappo/natriumasetaatilla avulla. Tämän jälkeen näytettä lämpökäsiteltiin lämpötilassa 60°C 30 min.

Aktiivisuusaanto oli 42,6 %.

Jäännösaktiivisuus lämpökäsittelyn jälkeen oli 35 %.

Laskettu puoliintumisaika lämpötilassa 60°C ja pH-arvossa 6 oli 20 min. Tämä vastaa noin 5°C suuruista destabiloitumista, ja vertailunäytteellä oli sama puoliintumisaika, noin 20 min, lämpötilassa 65°C.

Esimerkki 13

3 g Mucor pusillus-proteasaasia (Noury, 1:220 000) liuotetaan 30 ml:an 10 %:sta NaCl ja pH säädetään arvoon 6,5 lämpötilassa 5-10°C. 3 x 50 µl 15 %:sta NaOCl lisätään 30 minuutin väliajoin. Kolmen tunnin pituisen sekoittamisen jälkeen seosta pidetään lämpötilassa 4°C 16 tuntia ja pH säädetään arvoon 5,0. Näytteet otetaan talteen aktiivisuuden ja lämpöstabiiliisuuden määrittämiseksi. Tulokset ilmenevät seuraavasta taulukosta.

Näyte/reaktioaika	Aktiivisuusaanto, %	Puoliintumisaika pH-arvossa 6,0, 0-30 min lämpötilassa: (min)		Destabiloituminen, °C
		50°C	55°C	
Vertailu	100	144-155	18-31	-
24 tuntia	84-91	26-22	5-11	5

Esimerkki 14

Tämän esimerkin mukainen lähtöaine ei ollut RENNILASE 46 vaan RENNILASE 46, johon oli lisätty 6 % NaCl 18 %:n NaCl sijasta.

1 litra lähtöainetta jaettiin neljään 250 ml:n suuruiseen erään. Lämpötila säädettiin arvoon 5-10°C ja näiden kolmen erän pH säädettiin arvoon 6,5 4-n NaOH:n avulla. Näihin kolmeen erään lisättiin myös vastaavasti 1, 1,2 ja 1,4 % (tilavuus/tilavuus) 13,5 %:sta paino/paino NaOCl:ää, jonka jälkeen pH säädettiin arvoon 7,5 4-n NaOH:lla, ja näytteitä haudottiin lämpötilassa noin 5°C.

Vastaavasti 3, 27 ja 53 tunnin pituisten reaktioaikojen jälkeen poistettiin 50 ml näytteet kustakin hypokloriitin avulla käsitellystä erästä, ja kuhunkin 50 ml:n suuruiseen näytteeseen

lisättiin 250 mg (0,5 % paino/tilavuus) aktiivista hiiltä ("Carboraffin BGN"). 1 vuorokausi aktiivisen hiilen lisäämisen jälkeen näytteet suodatettiin ja kokeiltiin stabiilisuuden ja juokсутinaktiivisuuden suhteen (1' määräys). Näytteitä pidettiin lämpötilassa 5°C 9 vrk. hypokloriitin lisäämisen jälkeen, jonka jälkeen kokeiltiin uudelleen niiden stabiilisuus ja juokсутtimen aktiivisuus (saanto) (2' määräys). Seisyyään vielä 4 vrk lämpötilassa noin 5°C ja 2 vrk lämpötilassa noin 25°C, määrättiin juokсутinaktiivisuus jälleen ja tulos laskettiin (3' määräys).

Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa, joista ilmenee, ettei tapahdu oleellista destabiloitumisen tai aktiivisuusaannon muutosta kun reaktioaika pidennetään 3 tunnista 53 tunniksi.

Taulukko 1

Hypokloriitin lisäys, % tilavuus/ tilavuus	Määräys	Destabiloituminen, °C		
		Reaktioaika		
		3 tuntia	27 tuntia	53 tuntia
1	1.	9,2	9,4	9,1
	2.	9,3	9,4	9,3
1,2	1.	10,0	10,1	9,8
	2.	10,0	10,1	10,1
1,4	1.	10,6	10,7	10,5
	2.	10,6	10,6	10,7

Taulukko 2

Hypokloriitin lisäys, % tilavuus/ tilavuus	Määräys	Saanto, %		
		Reaktioaika		
		3 tuntia	27 tuntia	53 tuntia
1	1.	96	99	97
	2.	97	99	95
	3.	97	97	98
1,2	1.	90	93	92
	2.	94	90	92
	3.	92	94	94
1,4	1.	89	91	90
	2.	92	89	91
	3.	91	89	88

Esimerkki 15

Viisi 25 ml:n näytettä RENNILASE 46 säädettiin vastaavasti pH-arvoihin 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 ja 6,0.

Kuhunkin näihin näytteisiin lisättiin 0,04 g natriumkloriittia, jolloin pH-arvot pidettiin vakiona mainituissa arvoissa.

Näytteiden annettiin seistä lämpötilassa 5°C 6 vrk, jonka jälkeen ne analysoitiin jäännösaktiivisuuden ja lämpöstabiilisuuden suhteen lämpötilassa 55°C ja pH-arvossa 6,0.

Alku-pH	Jäännösaktiivisuus, %	Puoliintumisaika (min) (30 minuutin lämpökäsittelyn jälkeen)	Destabiloituminen, °C
2,0	23	122	5,5
2,5	73	63	6,7
3,0	90	53	7,0
3,5	97	48	7,3
6,0	94	49	7,2

Esimerkki 16

Lähtöaine tässä esimerkissä ei ollut RENNILASE 46 vaan sellainen RENNILASE 46, joka oli modifioitu kahdessa suhteessa:

1) viljelyväliaine väkevöitiin aktiivisuuteen, joka vastasi sellaisen liuoksen väkevyyttä, jossa on noin 1,6 % puhdasta entsyymiä (eikä 1 % puhdasta entsyymiä), ja 2) 9 % NaCl (eikä 18 % NaCl) lisättiin raakaväkevöitteeseen.

Tällä tavoin valmistettiin 5952 kg modifioitua RENNILASE 46 koetehtaassa.

pH säädettiin arvoon 6,4 lämpötilassa 9°C 34 %:sella NaOH:lla ja tähän lisättiin 109 kg 12,5 %:sta (paino/paino) NaOCl-liuosta. Tämän käsittelyn aikana pH nousi arvoon 8,0 ja pH säädettiin arvoon 7,4 37 %:sen HCl:än avulla.

18 tunnin pituisen seisottamisen jälkeen lämpötilassa 9-5°C oli pH pudonnut arvoon 6,9. Tämän jälkeen lisättiin 1 % aktiivista hiiltä lämpötilassa 4-5°C. 26 tuntia myöhemmin suoritettiin suodattaminen suodatinpuristimen avulla ja destabiloituminen mitattiin jälleen. Lopuksi väkevöitiin sakan yläpuolella oleva liuos alipaineessa lämpötilassa 30°C ja pH-arvossa 6,7 ja NaCl:ää lisättiin kaikkiaan 18 %.

Todettiin, että lopputuotteen puoliintumisaika oli 11 min ja destabiloituminen 10°C.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä mikrobiologisen juoksuttimen termiseksi destabiloimiseksi aktiivisuuden vähenemiseen asti, joka ei ylitä 50 %, t u n n e t t u siitä, että juoksutinta käsitellään vesiväliaineessa pH-arvossa 3-10 halogenoitujen yhdisteiden ryhmän hapetusaineella, jolloin halogeeniatomin hapetusluku on 0-3 ja reaktioseoksessa hapetusaineen ja entsyymivalmisteen kokonaisproteiinimäärän painosuhte on 0,01-1.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että halogeeni on kloori.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hapetusaineena käytetään halogeenipitoista yhdistettä, jolloin halogeeniatomin hapetusluku on 0 tai 1.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hapetusaineena käytetään hypokloriittia.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään reaktioseoksessa hapetusaineen ja entsyymivalmisteen proteiinin kokonaismäärän painosuhdetta, joka on 0,03-0,3.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely suoritetaan vesiväliaineessa pH-arvossa 5-9.
7. Jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely suoritetaan vesiväliaineessa 0-30°C:n lämpötilassa.
8. Jonkin patenttivaatimuksen 1-7 mukaisesti valmistetun juoksuttimen käyttö maidon koaguloimiseksi juustonvalmistuksessa.

Patentkrav

1. Förfarande för termisk destabilisering av mikrobiologiskt löpe till en aktivitetsminskning, som ej överstiger 50 %, k ä n n e t e c k n a t av att löpet behandlas i vattenmedium vid ett pH-värde 3-10 med ett oxidationsmedel ur gruppen av halogenerade föreningar, varvid halogenatomen har ett oxidationstal på 0-3 och viktförhållandet i reaktionsblandningen mellan oxidationsmedlet och enzympreparatets totala proteinmängd är 0,01-1.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att halogenet är klor.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att som oxidationsmedel användes en halogenhaltig förening, varvid halogenatomens oxidationstal är 0 eller 1.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t av att som oxidationsmedel användes en hypoklorit.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t av att man använder ett viktförhållande mellan oxidationsmedlet och enzympreparatets totala proteinmängd i reaktionslösningen, som uppgår till 0,03-0,3.
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t av att behandlingen utföres i ett vattenmedium vid ett pH-värde av 5-9.
7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t av att behandlingen utföres i ett vattenmedium vid en temperatur av 0-30°C.
8. Användning av enligt något av patentkraven 1-7 framställt löpe för koagulering av mjölk vid ostframställning.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Biochimica et Biophysica Acta, vol. 328, 1973, Amsterdam, P.A. McBride-Warren et al.,-"Structural and functional determinants of Mucor miehei protease, II. Circular dichroic studies on the native and periodate-oxidized enzyme", p. 52-60. Chemical Abstracts, vol. 89 (1978), 161696j, N.Z.J. Dairy Sci. Technol. 1978, 13(2), p. 127-128.