

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 811748 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **811748**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12P 19/14
A23C 21/02**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **04.06.1981**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.06.1981**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.12.1981**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

06.06.1980 FR 8012616

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Corning Glass Works, Corning New York, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Baret, Jean-Luc Alain Guy, France, RANSKA, (FR)

2 • Dohan, Luc Alain, TOWN UNKNOWN, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Menetelmä laktoosin hydrolysoimiseksi.

Förfarande för hydrolys av laktos.

Menetelmä laktoosin hydrolysoimiseksi

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä laktoosin hydrolysoimiseksi. Tarkemmin sanottuna esillä oleva keksintö kohdistuu menetelmään esimerkiksi heran sisältämän laktoosin hydrolysoimiseksi immobilisoidun laktaasin avulla.

V. 1976 Ranskan juustotuotanto saavutti suunnilleen 1 000 000 tonnia, jolloin sivutuotteena tuotettiin yli 6 miljoonaa tonnia heraa. Tällainen hera sisältää litraa kohti noin 6-9 g valkuaista, 45-50 g laktoosia, 6-8 g mineraalisuoloja ja 1-2 g rasvaa. Maailmanlaajuisesti herasta saatava laktoosimäärä oli jo v. 1977 lähes 3,5 miljoonaa tonnia.

Aiemmin heraa pidettiin jätetuotteena, joka poistettiin viemäristöihin tai virtoihin ja jokiin. Koska ympäristön saastumisesta on alettu entistä enemmän huolestua, suuri osa herasta jalostetaan monenlaisiksi eläin- ja ihmisravintoaineiksi. Esimerkiksi suurtehoultrasuodattimien kehitys mahdollistaa nyt heravalkuaisen erotuksen herasta. Tällainen valkuainen on poikkeuksellisen arvokasta. Esimerkiksi 35 %:nen heravalkuaistiiviste voi korvata rasvattoman maitojauheen monissa ruokatuotteissa, kuten leipomotuotteissa, juomissa ja pakastejälkiruuissa. Valitettavasti valkuaisten erotus herasta antaa tulokseksi nestejakeen, jota kutsutaan permeaatiksi, jolla viime aikoihin asti on ollut vähän tai ei lainkaan arvoa.

Immobilisoitujen entsyymien käyttööntulon jälkeen laktoosin hydrolyysi permeaatiksi, joko kivennäisiä poistamalla tai poistamatta, on käynyt kaupallisesti mahdolliseksi. Glukoosin ja galaktoosin läsnäolon takia hydrolysoitu laktoosi on paljon makeampaa ja liukoisempaa kuin pelkkä

laktoosi. Niin ollen hydrolysoitu tuote on toimiva makeut-
tin, jota voidaan käyttää leivonnaisten, maitopohjaisten
jälkiruokien ja jäädytettyjen makeisten kuten jäätelön
valmistukseen. Lisäksi hydrolysoitu tuote on tehokkaas-
ti käymiskykyinen seos, joka sopii käytettäväksi käymis-
substraattina esim. panimo- ja lääketieteellisuuksissa.

Erilaiset menetelmät laktoosin hydrolysoimiseksi ovat tie-
tysti tuttuja alan keskitason ammattimiehille. Entsymaat-
tinen hydrolyysi on erityisen käyttökelpoinen elintarvi-
ketuotteiden valmistukseen ja, kuten jo todettiin, immobi-
lisoitujen entsyymien käyttö on erityisen edullista.

Vain asian havainnollistamiseksi H.H. Weetall et al.,
Biotechnol. Bioeng., 16, 295 (1974), käsittelevät immobi-
lisoituneen laktaasin valmistusta ja sen käyttöä happaman
heran entsymaattisessa hydrolyysissä. Entsyymi, josta oli
eristetty sekä sienet että hiiva, immobilisoitiin sirko-
nioksidilla päällystetyille huokoisille lasiosasille.
Substraatti muodostui joko laktoosin vesiliuoksesta tai
happamasta herapermeaatista.

Lisäksi L.E. Wierzbicki et al., Biotechnol. Bioeng., 16,
397 (1974), kuvasivat laktoosin hydrolyysiä happamassa
herassa käyttämällä laktaasia (-galaktosidaasia) immobili-
soituna huokoisille lasiosasille painopisteen ollessa
vähän laktoosia sisältävien maitotaloustuotteiden valmis-
tuksessa uudelleen käytettävän katalyytin valmistuksessa
ja kuvauksessa. Erityisesti puhdistettuja laktaaseja
mikro-organismeista *Aspergillus niger*, *Lactobacillus*
helveticus ja *Saccaromyces lactis* immobilisoitiin huokoi-
sille lasiosasille. Substraatti muodostui happamasta
herajauheesta, joka oli rekonstruoitu vedessä sopivaan
kiintoainekonsentraatioon. Joissakin tapauksissa rekonstru-
oidusta happamasta herasta poistettiin valkuainen kuumen-
tamalla kiehuvaan vedessä 5 min.

Lopuksi H.H. Weetall et al., Biotechnol. Bioeng., 16, 689 (1974), kuvaavat immobilisoidun laktaasin valmistusta laktoosin entsyymaattista hydrolyysia koskevien jatkuvien tutkimusten osana. Käytettiin sienilaktaasia, joka oli immobilisoitu sirkonioksidilla päällystetyille huokoslasihiukkasille ja huokoisille titaanioksidihiukkasille. Saatuja immobilisoituja entsyymivalmisteita käytettiin laktoosin hydrolyysiin makeassa täyssherassa, happamassa täyssherassa, happamassa heraultrasuodoksessa ja puhtaassa laktoosissa.

Laktoosin hydrolyysi herassa voidaan myös suorittaa ilman edeltävää ultrasuodatusvaihetta ja joko kivennäisiä poistamalla tai poistamatta. Tuote, joka vielä sisältää valkuaisia, on samanlainen kuin hydrolysoitu permeaatti, joten sitä voidaan myös käyttää elintarviketeollisuudessa, kuten jo kuvattiin.

Valitettavasti kuitenkin laktoosin hydrolyysi herassa immobilisoitujen entsyymien avulla ilman edeltävää ultrasuodatusvaihetta ei ole täysin ongelmaton, erityisesti kaupallisessa mittakaavassa.

Tällaiset ongelmat liittyvät yleensä sellaisten valkuaisien läsnäoloon herassa, jotka pyrkivät laskeutumaan immobilisoidulle entsyymikerrokselle, ts. päällystämään immobilisoidun entsyymiin. Valkuaisainepäällyste vuorostaan estää tai jopa pysäyttää laktoosin diffuusion entsyymiin ja hydrolyysituotteiden, ts. glukoosin ja galaktoosin diffuusion pois entsyymistä. Niin ollen aikaa myöten entsyymaattinen toiminta selvästi vähenee. Tuloksena on että, immobilisoidun laktaasin käyttö laktoosin hydrolyysiin täyssherassa on epäkäytännöllistä suurmittakaavaisella, jatkuvalla pohjalla. Lisäksi valkuaisen poisto ultrasuodatuksella ennen hydrolyysiä pyrkii poistamaan bakteerisaastutuksen pienentäen siten bakteerikasvua immobilisoidulla entsyymillä, mikä osaltaan vaikuttaa entsyymaattisen toi-

minnan selvään vähenemiseen aikaa myöten ja immobilisoidun entsyymireaktorin tukkeutumiseen.

On kuitenkin selvää, että täysheran hydrolyysiin käytettävän taloudellisen, kaupallisen prosessin on säilytettävä entsyymaattinen toiminta jonkin minimiarvon yläpuolella riittävän ajanjakson aikana. Sen tähden yritykset, joita on tehty tyydyttävän menetelmän löytämiseksi herahydrolyysiä varten immobilisoidujen entsyymien avulla, ovat ensisijaisesti keskittyneet sellaisen herapermeaatin käyttöön, josta kivennäiset on poistettu. Vaikka erilaisia immobilisoidun entsyymikerroksen käsittelyjä, kuten jaksottaista pesua ja desinfiointia (esim. etikkahappoliuoksilla), on ehdotettu, tarvitaan yhä kaupallisesti käyttökelpoista menetelmää täysherahydrolyysiä varten, ts. sellaisen täysheran hydrolyysiä varten, jolle ei aiemmin ole suoritettu ultrasuodatuskäsittelyä.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on sen tähden saada aikaan menetelmä heran käsittelemiseksi, jolloin ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksiksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on myös saada aikaan menetelmä heran käsittelemiseksi, jolloin ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksiksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla tarvitsematta edeltävää ultrasuodatuskäsittelyä.

Esillä olevan keksinnön toisena tarkoituksena on saada aikaan menetelmä heran käsittelemiseksi, jolloin ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksiksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla, johon menetelmään kuuluu väline immobilisoidun entsyymin puhdistamiseksi.

Vielä eräs esillä olevan keksinnön tarkoitus on saada aikaan menetelmä heran käsittelemiseksi, jolloin ainakin

osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla, johon menetelmään kuuluu väline immobilisoidun entsyymin desinfioimiseksi.

Vielä eräs esillä olevan keksinnön tarkoitus on saada aikaan menetelmä heran käsittelymiseksi, joka menetelmä joissakin käytöissä poistaa edeltävän ultrasuodatuskäsittelyn tarpeen.

Keksinnön lisätarkoituksena on saada aikaan menetelmä immobilisoidun laktaasin puhdistamiseksi siihen saostuneesta heravalkuaisesta.

Nämä ja muut tarkoitukset käyvät selville alan ammattimiehille seuraavasta selityksestä ja vaatimuksista.

Esillä oleva keksintö tarjoaa siis menetelmän heran käsittelymiseksi, jolloin ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla, joka menetelmä käsittää vaiheet:

- A. heran kuumentamisen lämpötilaan n. 45:stä noin 90°C:een ainakin 15 sekuntia;
- B. kuumennetun heran linkoamisen sen ollessa vielä lämmin; ja
- C. lingotun heran saattamiseen kosketukseen immobilisoidun laktaasin kanssa olosuhteissa, jotka riittävät hydrolysoimaan ainakin osan sen sisältämästä laktoosista glukooksi ja galaktoosiksi.

Esillä oleva keksintö saa myös aikaan menetelmän happaman heran käsittelymiseksi, jolloin ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla, joka menetelmä käsittää vaiheet:

- A. heran selkeytyksen;
- B. heran kuumentamisen lämpötilaan noin 45:stä noin 90°C:een ainakin 15 sekuntia; ja
- C. kuumennetun heran saattamisen kosketukseen immobilisoidun laktaasin kanssa olosuhteissa, jotka riittävät hydrolysoimaan ainakin osan sen sisältämästä laktoosista glukoosiksi ja galaktoosiksi.

Esillä oleva keksintö saa edelleen aikaan menetelmän heran käsittelymiseksi, jolloin poistetaan ainakin osa sen sisältämästä valkuaisesta, joka menetelmä käsittää vaiheet:

- A. heran kuumentamisen lämpötilaan noin 45:stä noin 90°C:een ainakin 15 sekuntia; ja
- B. kuumennetun heran linkoamisen sen ollessa vielä lämmin.

Esillä oleva keksintö tarjoaa edelleen menetelmän immobilisoidun laktaasin puhdistamiseksi, jolle on saostunut valkuaista, joka menetelmä käsittää immobilisoidun laktaasin saattamisen kosketukseen proteaasiliuoksen kanssa.

Esillä olevan keksinnön menetelmä on tarkoitettu käytettäväksi laktaasin kanssa, joka on sidottu veteen liukenevattomaan kantimeen. Niin ollen, kuten alalla hyvin tunnetaan, laktaasi hydrolysoituu ainakin n. 80 % glukoosiksi ja galaktoosiksi viemällä laktoosia sisältävä vesiliuos, esim. hera ja herapermeaatti, immobilisoidun laktaasin sisältävän kolonnin läpi, tyypillisesti lämpötilassa alle n. 60°C. Kuten jo kuvattiin, poistoaine voi olla osaksi konsentroitu, niin että saadaan siirappi, joka sopii käytettäväksi eri elintarvikkeiden makeuttimena.

Tällainen menetelmä voidaan suorittaa jatkuvasti tai eräprosessina. Jatkuva prosessi on tietysti edullisempi.

Esillä olevan keksinnön menetelmässä käytetyn laktaasin tuottavat lukuisat eri mikro-organismit, kuten sienet, bakteerit ja hiivat. Sienilaktaasit ovat ehkä yleisimmät, esim. laktaasit, jotka on eristetty mikro-organismeista

Aspergillus niger ja *Aspergillus oryzae*. Menetelmät laktaasin eristämiseksi mikro-organismeista ovat tietysti hyvin tunnettuja alalla.

Entsyymien immobilisointi veteen liukenemattomalle kantomelle on helposti toteutettavissa eri menetelmillä, jotka myös ovat tunnettuja. Viimeisimpien immobilisointimenetelmien kohdalla viitataan julkaisuun I. Chibata "Immobilized Enzymes", Halsted Press, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1978, ss. 1-73. Immobilisointimenetelmä ei ole kriittinen. Haluttaessa tällaiset kantimet voivat olla huokoisia, mikä mahdollistaa suuremman entsyymipanoksen kantimen massayksikköä kohti. Yleensä entsyymit sidotaan veteen liukenemattomiin kantimiin fysikaalisella adsorptiolla, ionisidoksella, kovalenssisidoksella tai jollakin niiden yhdistelmällä.

Veteen liukenemattomat kantimet voivat yleensä olla joko orgaanisia tai epäorgaanisia. Esimerkkejä orgaanisista kantimista ovat mm. polyesterit, kuten poly(etyleenitereftalaatti); polyamidit, kuten nailon 6 ja nailon 6.6; polyakrylaatit; polymetakrylaatit; polyakryyliamidit; poly(akryylihappo); poly(metakryylihappo); poly(galakturonihappo); poly(asparagiinihappo); etyleeni-maleiinihappoanhydridikopolymeerit; polyolefiinit, kuten polyetyleeni, polypropyleeni, polybuteeni ja polybutadieeni; polystyreeni; poly(aminostyreeni); poly(vinyylidikloridi); poly(vinyylialkoholi); poly(vinylideenidikloridi); selluloosa ja sen johdannaiset; agaroosigeelit; dekstraanigeelit ja niiden johdannaiset; polysakkaridit; polypeptidit; kollageeni ja vastaavat.

Epäorgaaniset kantimet voidaan luokitella kvartsipitoisiksi tai kvartsittomiksi metallioksideiksi. Esimerkkejä kvartsipitoisista kantimista ovat mm. lasi, piidioksidi, wollastoniiitti, bentoniitti, kordieriitti ja vastaavat. Esimerkkejä kvartsittomista metallioksideista ovat mm.

alumiinioksidi, spinelli, apatiitti, nikkelioksidi, titaanioksidi, sirkoniumoksidi ja vastaavat.

Yleensä veteen liukenematon kannin voi olla missä tahansa halutussa muodossa. Kannin voi olla hiukkasmainen luonteeltaan, vaihdellen hienojakoisesta jauheesta karkeaan raemaiseen aineeseen, tai kannin voi olla yhtenäinen, muotoiltu esine, kuten litteä tai kaareva levy tai pallo tai kolmiulotteinen esine kuten suorakulmainen tai lieriömäinen putki tai mutkikas monoliitti. Käytännössä kannin on kuitenkin useimmiten hiukkasmainen.

Ainoastaan asian havainnollistamiseksi viitataan esimerkeinä menetelmistä, joilla entsyymejä immobilisoidaan epäorgaanisille kantimille, US-patenttiin 3 519 538 (joka vastaa FR-patenttia 2 020 527), US-patenttiin 3 556 945 (joka vastaa FR-patenttia 2 001 336) ja US-patentteihin 3 666 627 ja 3 802 997 (jotka vastaavat FR-patenttia 2 020 661).

Ryhdyttäessä nyt tarkastelemaan esillä olevan keksinnön muodostavia erityisiä prosessivaiheita hera kuumennetaan ensimmäisessä vaiheessa lämpötilaan n. 45:stä n. 90°C:een ainakin 15 sek. Edullisesti kuumennusaika on n. 15 sekunnista noin yhteen tuntiin. Tällainen kuumennus aiheuttaa heran pastöroinnin ja aloittaa kiinteiden kolloidisten valkuaishiukkasten muodostuksen suspensiossa, jolloin hiukkaset voidaan sedimentoida linkoamalla.

Toinen vaihe käsittää kuumennetun heran linkoamisen sen ollessa vielä lämmin. Linkoamisolosuhteet eivät ole kriittiset edellyttäen ainoastaan, että nämä olosuhteet riittävät sedimentoimaan kuumennettuun heraan suspendoituneen kiinteän aineen. Tällaiset olosuhteet ovat itsestään selviä alan ammattimiehelle. Vain esimerkin vuoksi mainittakoon, että linkonopeudet n. 8000 - n. 12 000 kierr/min ovat ehkä tyypillisiä.

Kolmannessa vaiheessa lingottu hera saatetaan kosketukseen immobilisoidun laktaasin kanssa olosuhteissa, jotka riittävät hydrolysoimaan ainakin osan heran sisältämästä laktoosista glukoosiksi ja galaktoosiksi. Tällainen kosketus ei ole kriittinen esillä olevan keksinnön menetelmän kannalta, ja yleensä se suoritetaan tunnettujen menettelyjen mukaisesti.

Valinnaaisesti ja edullisesti immobilisoitu laktaasi puhdistetaan sen jälkeen saostuneen valkuaisen poistamiseksi siitä. Tällainen puhdistus voidaan suorittaa alalla hyvin tunnettujen menetelmien mukaisesti. Edullisemmin tällainen puhdistus kuitenkin suoritetaan saattamalla immobilisoitu laktaasi kosketukseen proteolyyttisen entsyymitai proteaasiliuoksen kanssa. Edullisimmin tällaisen liuoksen proteaasiaktiivisuus on n. 0,1 - n. 10 Anson-yksikköä/litra.

Anson-analyysiä voidaan käyttää määrittämään useimpien proteaasien proteolyyttistä aktiivisuutta, vaikka menetelmä on ehkä tunnetuin Euroopassa. Lyhyesti denaturoitua hemoglobiinia hajotetaan standardiolosuhteissa. Hajonnut hemoglobiini saostetaan trikloorietikkahapolla, ja trikloorietikkahappoliukoisen tuotteen määrä määritetään spektrofotometrisesti fenolireagenssilla, joka antaa sinisen värin tyrosiinilla ja tryptofaanilla. Värireaktio suoritetaan tyypillisesti 10 minuutin ajan pH:n ollessa 7,5 ja 25°C:n lämpötilassa. Yksi Anson-yksikkö määritellään sitten entsyymimääräksi, joka näissä olosuhteissa hajottaa hemoglobiinia sellaisella alkunopeudella, että minuuttia kohti vapautuu sellainen määrä trikloorietikkahappoliukoista tuotetta, joka antaa saman värin fenolireagenssilla kuin yksi milliekvivalentti tyrosiinia.

Yleensä voidaan käyttää mitä tahansa proteaasia, joka poistaa valkuaispäällysteen immobilisoidusta entsyymistä vaikuttamatta merkittävän haitallisesti entsyymaattiseen

toimintaan. Esimerkkeinä sopivista proteaaseista mainittakoon neutraalit proteaasit mikro-organismista *Bacillus subtilis* ja alkalinen proteaasi mikro-organismista *Bacillus licheniformis*.

Tällaiset proteaasit ovat pesuainekoostumuksissa laajalti käytettyjen, kaupallisesti saatavissa olevien, hyvin tunnettujen entsyymien ryhmän jäseniä. Esimerkkeinä kaupallisesti saatavissa olevista neutraaleista proteaaseista mainittakoon Protease B 500, jota toimittaa Rapidase, Gist Brocades'in ranskalainen tytäryhtiö, ja Neutrase[®] 0.5 L, jota toimittaa Novo. Eräs esimerkki kaupallisesti saatavissa olevasta alkalisesta proteaasista on Alcalase[®] 0.6 L, jota myös toimittaa Novo, ja joka yleisesti tunnetaan subtilisin A:na.

On hyvin yllättävää ja odottamatonta, että nämä proteaasit, jotka vaikuttavat hyvin hajottavasti valkuaispitoiseen aineeseen, puhdistavat immobilisoidun laktaasin siihen saostuneesta valkuaisesta vaikuttamatta laktaasiin, joka on itse valkuaispitoinen aine. Näin on asianlaita varsinkin, koska tällaisten proteaasien tiedetään olevan erittäin aktiivisia liukoista laktaasia vastaan, ts. laktaasia vastaan, jota ei ole immobilisoitu.

Toinen valinnainen vaihe, joka myös on edullinen, käsittää immobilisoidun laktaasin desinfioinnin. Vaikka desinfiointi yleensä voidaan suorittaa millä tahansa alan ammattimiehelle tunnetulla menetelmällä, erityisen edullinen menetelmä on kuvattu US-patenttihakemuksessa 206 099.

Kuten mainitussa hakemuksessa 206 099 kuvataan, immobilisoitu entsyymi desinfioidaan saattamalla se kosketukseen ainakin yhden substituoidun dietyleenitriamiinin sisältävän laimean vesiliuoksen kanssa sellaisessa konsentraatiossa ja sellaisen ajan verran, jotka riittävät tuhoamaan

saastuttavat mikro-organismit vaikuttamatta merkittävän haitallisesti immobilisoituun entsyymiin.

Tällaisia substituoituja dietyleenitriamiineja käytetään laimeissa vesiliuoksissa, tyypillisesti konsentraatioina n. 0,1 - n. 0,5 paino-%, vaikka pienempiä tai suurempia konsentraatioita voidaan käyttää. Yleensä substituoidun dietyleenitriamiinin konsentraatio, vesiliuoksen kokonaismäärä ja desinfiointikäsittelyn kesto voivat vaihdella laajojen rajojen puitteissa ainakin osaksi riippuen käytetty(i)stä substituoidu(i)sta dietyleenitriamiineista/ammiineista, mikrobisen saastumisen voimakkuudesta, läsnä olevan/olevien mikro-organismi(e)n tyypp(e)istä ja immobilisoidun entsyymin määrästä. Alan ammattimiehet voivat kuitenkin helposti määrittää tällaiset käsittelyolosuhteet tai parametrit. Useimmiten on kuitenkin todettu tyydyttäväksi käsittely n. 15-30 minuutin ajan käyttäen 5-10 litraa 0,1 %:sta desinfiointiliuosta, esim. Tego Dioctyl BS, immobilisoitua entsyymikiloa kohti.

Eräässä suoritusmuodossa immobilisoitu entsyymi sijoitetaan yksinkertaisesti desinfiointiliuoskylpyyn. Valinnaaisesti kylpyä voidaan ravistaa, sekoittaa, kierrättää pumppulaitteella tai muuten sekoittaa.

Toisessa suoritusmuodossa desinfiointiliuos kierrätetään immobilisoidun entsyymin sisältävän kolonnin tai reaktorin läpi. Edullisesti tällainen desinfiointiliuoksen kiertäys suoritetaan vastavirtaan, ts. päinvastaiseen suuntaan kuin syöttöliuoksen virtaus kolonnin tai reaktorin läpi. Kun entsyymi on immobilisoitu hiukkasmaiselle kantomelle ja kolonnin tai reaktorin rakenne sen sallii, desinfiointiliuoksen vastavirran nopeus on edullisesti sellainen, että immobilisoidut entsyymihiukkaset leijutetaan. Tällainen leijutus estää kanavien muodostuksen ja varmistaa immobilisoidun entsyymin täydellisen kosketuksen desinfiointiliuoksen kanssa.

Esillä olevan keksinnön menetelmässä käytetty hera ei vaadi esikäsitteilyä. Edullisesti hera kuitenkin selkeytetään esim. linkoamalla. Selkeytyksen jälkeen herasta voidaan valinnaisesti poistaa kivennäisiä n. 90 %:iin asti, ja/tai hera voidaan hapottaa pH-arvoon n. 3,5 - n. 6. Kivennäisten poisto suoritetaan tunnetuin menetelmin, kuten sähköanalyysillä tai ioninvaihdolla. Hapetus suoritetaan myös tunnetuin menetelmin, jolloin kloorivetyhapon käyttö on erityisen sopiva. Haluttaessa hapetus voidaan suorittaa ennen selkeytystä.

Suoritetaanko hapetus vai ei riippuu ainakin osaksi immobilisoidun laktaasin pH-profiilista ja käytettävän heran pH:sta. Esim. raejuuston (cottage cheese) tuotannosta saatavan happaman heran pH on tyypillisesti n. 4,5 - n. 4,7, kun taas cheddar-juuston tuotannosta saatavan makean heran pH on n. 6 - n. 6,6, joten hera vaatii hapotusta. Kivennäisten poisto voi tietysti myös vaikuttaa heran pH-arvoon.

Vaikka heran lämpökäsittelyä yleensä seuraa linkoaminen, tällainen linkoaminen voidaan joissakin olosuhteissa jättää pois. Yleensä linkoamisvaiheen poisjätto on mahdollinen kun (1) hera on selkeytetty ennen lämpökäsittelyvaihetta ja (2) hera on hapan hera, jonka pH on immobilisoidun laktaasin optimi-pH-arvon tasolla tai sitä lähellä, tyypillisesti pH n. 4,5, ja joka ei sen tähden vaadi hapotusta ennen sen sisältämän laktoosin hydrolyysiä.

Alan ammattimiehelle lienee selvää, että esillä olevan keksinnön menetelmä voi olla joko erämenetelmä tai jatkuva menetelmä, jolloin jälkimmäinen on edullisempi. Jatkuva prosessissa puhdistusta ja/tai desinfiointia, jos ne suoritetaan, ei kuitenkaan suoriteta jatkuvasti, koska näin tehtäessä kolmatta vaihetta ei voitaisi lainkaan suorittaa. Paremminkin nämä kaksi vaihetta suoritettaisiin ajoittain, kuten päivittäin. Lisäksi jatkuva prosessi ei

vaadi, että myös vaiheet A ja B ovat jatkuvia. Haluttaessa vaiheet A ja B voidaan suorittaa erittäin.

Haluttaessa kaksi tai useampi immobilisoidun laktaasin reaktoreja voidaan asentaa rinnakkain. Kun yhdessä reaktorissa on suoritettava ajoittainen immobilisoidun laktaasin puhdistus ja desinfiointi, kolmatta vaihetta voidaan jatkaa toisessa tai muussa reaktorissa prosessin keskeytyksen välttämiseksi. Muut vaihtoehdot ovat tietysti itsessään selviä alan ammattimiehille.

Kuten jo ehdotettiin, esillä olevan keksinnön menetelmän mukaisesti käsitelty hera voidaan neutraloida ja sen jälkeen konsentroida siirapiksi esim. haihduttamalla. Tällaisella siirapilla, joka sisältää valkuaista, glukoosia, galaktoosia ja hydrolysoimatonta jäämälaktoosia, on suuri makeutusteho. Tämä makeutusteho yhdistettynä valkuaisen ravinto- ja funktionaalisiin ominaisuuksiin (kuten emulgointi-, paisunta- ja yhdistystehot) tekee käsitellystä herasta erityisen tavoiteltavan ja arvokkaan elintarvikelisiäineen.

Edelleen esillä olevan keksinnön menetelmä on taloudellinen, koska siinä ei käytetä ultrasuodatusta eikä kuivausvaihteita, jotka kuluttavat paljon energiaa.

On myös selvää, että edellä kuvatut lämpökäsittely- ja linakoamisvaiheet tarjoavat keinon, jolla herasta voidaan poistaa ainakin osa sen sisältämästä valkuaisesta. Niinpä tällaiset vaiheet ovat yleensä eduksi käytöissä, joissa halutaan poistaa ainakin osa heran sisältämästä valkuaisesta turvautumatta ultrasuodatukseen.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä edelleen, mutta eivät rajoita sitä. Jollei muuta mainita, kaikki lämpötilat ovat Celsius-asteita ja laktaasiyksiköt ovat kansainvälisiä yksiköitä.

Esimerkki 1

Mikro-organismista *Aspergillus niger* saatu laktaasi immobilisoitiin hiukkasmaiselle piidioksidikantimelle US-patentissa 3 519 538 kuvatulla menetelmällä. Kolme kolonnia panostettiin sitten suunnilleen samoilla määrillä saatua immobilisoitua laktaasia.

Täyshera selkeytettiin linkoamalla ja siitä poistettiin 50 % kivennäisiä sähködialyysin avulla. Kivennäisten poistoste määritettiin jäämätuhkamittauksella ja tarkistettiin konduktanssimittauksilla standardiolosuhteissa. Saatua hera, josta kivennäisiä oli poistettu, hapotettiin pH-arvoon 3,5 kloorivetyhapolla. Tämä hera, jonka lämpötila aluksi oli 2-4°C, kuumennettiin 80°C:een sekoittamalla siitä n. tunnin ajan. Kuumennettu hera lingottiin lämpimänä nopeudella 8000 - 10 000 kierr/min käyttäen Alpha-Laval (LAPX 202) separaattoria, josta kiintoaineita poistettiin jatkuvasti. Supernatantti koottiin, jäähdytettiin ja varastoitiin ennen hydrolyysivaiheen suorittamista.

Lämpökäsitellyn heran hydrolyysi suoritettiin lämpötiloissa 20°C, 35°C ja 50°C (yksi kolonni lämpötilaa kohti) immobilisoidun laktaasin stabiliteetin määrittämiseksi. Lämpökäsitelty hera sisälsi 4,53 % laktoosia, paino/tilavuus, ja sen pH oli 3,5. Muodostunut glukoosi mitattiin tunnetuin menetelmin kunkin kolonnin tai reaktorin poistokohdassa. Glukoosipitoisuutta käytettiin sen jälkeen laskemaan laktoosin prosentuaalinen konversio ja immobilisoidun laktaasin entsymaattinen aktiivisuus, jälleen tunnetuin menetelmin.

Käyttöolosuhteet ja tulokset kussakin lämpötilassa on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Lämpökäsittelyn, 4,53 % laktoosia sisältävän heran
hydrolyysi pH-arvossa 3,5 ja eri lämpötiloissa

	Lämpötila		
	20 ^o	35 ^o	50 ^o
Yhdistelmä (g) ^a	4,93	4,78	4,90
<u>A. 2 tunnin kuluttua</u>			
Virtausnopeus, (ml/h)	91	107	92
Konversio-% ^b	44	62	80
Eg (u/g)	79,6	210	377
<u>B. 6 tunnin kuluttua</u>			
Virtausnopeus (ml/h)	92	107	93
Konversio-% ^b	44	62	81
Eg (u/g) ^c	82	214	396
<u>C. 21,5 tunnin kuluttua</u>			
Virtausnopeus (ml/h)	82	104	90
Konversio-% ^b	47	62	79
Eg (u/g) ^c	82	212	355

^aImmobilisoidun laktaasiyhdistelmän määrä grammoina (kuiva paino).

^bGlukoosiksi muutetun laktoosin prosenttimäärä.

^cImmobilisoidun laktaasin ominaisaktiivisuus ilmaistuna yksikköinä grammaa kohti.

Immobilisoidun laktaasin erinomainen stabiliteetti todettiin 20^o:ssa ja 35^o:ssa; yli 20 tunnin jatkuvan toiminnan jälkeen ei havaittu häviötä verrattuna alkuperäiseen entsyymitoimintaan, ei perustuen konversioprosenttiin eikä ominaisaktiivisuuteen. 50^o:ssa immobilisoidun laktaasin stabiliteetti oli erittäin hyvä. Vaikka ominaisaktiivisuus pieneni n. 6 % alkuarvosta, konversioprosenttitiedot osoittavat vain 1-2 %:n aktiivisuuden häviötä.

Tapahtuuko entsyymaattista deaktivoointia vai ei nähdään parhaiten vertailemalla ominaisaktiivisuuksia kahden ja vastaavasti kuuden tunnin kuluttua. Tällainen vertailu on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

Immobilisoidun laktaasin ominaisuudet lämpökäsitellyn heran hydrolyysin aikana pH-arvossa 3,5 ja eri lämpötiloissa

	Lämpötila		
	20°	35°	50°
Eg^2^a	79,6	210	377
Eg^6^b	82	214	396
$Eg^{21,5^c}$	82	212	355
$Eg^2-Eg^6^d$	0	0	0
Deaktivointinopeus ^e	0	0	0
Näennäinen puoliintumisaika ^f	α	α	α
$Eg^2-Eg^{21,5^d}$	0	0	22
Deaktivointinopeus ^g	0	0	1,1
Näennäinen puoliintumisaika ^f	α	α	171
$Eg^6-Eg^{21,5^d}$	0	2	41
Deaktivointinopeus ^h	0	0,1	2,6
Näennäinen puoliintumisaika ^f	α	1980	76

^aOminaisaktiivisuus yksikköinä grammaa kohti 2 tunnin kuluttua.

^bOminaisaktiivisuus yksikköinä grammaa kohti 6 tunnin kuluttua.

^cOminaisaktiivisuus yksikköinä grammaa kohti 21,5 tunnin kuluttua.

^dJos algebrallinen ero on negatiivinen luku, eron oletetaan olevan nolla.

^e $(Eg-Eg)/4$, ilmaistuna (u/g)/h.

^fTunteina.

^g $(Eg^2-Eg^{21,5})/19,5$, ilmaistuna (u/g)/h.

^h $(Eg^6-Eg^{21,5})/15,5$, ilmaistuna (u/g)/h.

Esimerkki 2Vertailevat kokeet

Viisi immobilisoitua laktaasikolonnia valmistettiin esimerkin 1 kuvaamalla tavalla, ja jokaista käytettiin hydrolysoimaan laktaasia. Kolonniin 1 syötettiin täys- eli raakarahkaa, joka hapotettiin pH-arvoon 3,5 kloorivetyhapolla. Kolonniin 2 syötettiin heraa, joka oli selkeytetty linkoamalla ja sen jälkeen hapotettu pH-arvoon 3,5 kloorivetyhapolla. Kolonneihin 3, 4 ja 5 syötettiin heraa, joka oli selkeytetty linkoamalla, josta oli poistettu 50 % kiivennäisiä sähködialyysillä ja joka oli hapotettu pH-arvoon 3,5 kloorivetyhapolla. Hydrolyysin aikana tehtiin glukoosimittauksia kuten esimerkissä 1.

Kuuden tunnin jatkuvan käytön jälkeen (koe A) kokeet keskeytettiin ja kukin kolonni huuhdeltiin vedellä vakioolosuhteissa. Kussakin tapauksessa immobilisoitua laktaasia puhdistettiin 20 min 1-% etikkahappovesiliuoksella leijuttavissa vastavirtausolosuhteissa. Hydrolyysi aloitettiin sen jälkeen uudelleen (koe B) samoissa olosuhteissa kuin aiemmin.

Saadut tiedot on esitetty taulukoissa 3-5.

Taulukko 3Täysheran hydrolyysi pH-arvossa 3,5 ja 50°C:ssa^a

	<u>Koe A</u>	<u>Koe B</u>
Virtausnopeus (ml/h)	102	103
Yhdistelmä (g)	4,68	4,68
Laktoosipitoisuus, %	4,26	4,26
<u>2 tunnin kuluttua</u>		
Glukoosipitoisuus (g/l)	17	16,5
Konversio-%	78	76
Eg (u/g)	402	350
<u>6 tunnin kuluttua</u>		
Glukoosipitoisuus (g/l)	11,8	11,4
Konversio-%	54	53
Eg (u/g)	142	133

^aTiedot kolonnista 1.Taulukko 4Selkeytetyn heran hydrolyysi pH-arvossa 3,5 ja 50°C:ssa^a

	<u>Koe A</u>	<u>Koe B</u>
Virtausnopeus (ml/h)	110	111
Yhdistelmä (g)	4,8	4,8
Laktoosipitoisuus, %	4,04	4,04
<u>2 tunnin kuluttua</u>		
Glukoosipitoisuus (g/l)	17,5	17,6
Konversio-%	85	85
Eg (u/g)	520	543
<u>6 tunnin kuluttua</u>		
Glukoosipitoisuus (g/l)	14,1	14,4
Konversio-%	68	70
Eg (u/g)	251	269

^aTiedot kolonnista 2.

Taulukko 5

Selkeytetyn ja demineralisoidun heran hydrolyysi pH-arvos-
sa 3,5 ja eri lämpötiloissa

	20 ^{oa}		35 ^{ob}		50 ^{oc}	
	Koe A	Koe B	Koe A	Koe B	Koe A	Koe B
Virtausnopeus (ml/h)	98	91	107	107	92	92
Yhdistelmä (g)	4,93	4,93	4,78	4,78	4,90	4,90
Laktoosipitoisuus, %	4,04	4,04	4,04	4,04	4,04	4,04
<u>2 tunnin kuluttua</u>						
Glukoosipitoisuus (g/l)	9,8	10,9	14,1	14,2	16 ^d	15,9
Konversio-%	48	53	68	69	78	77
Eg (u/g)	96	110	247	257	305	295
<u>6 tunnin kuluttua</u>						
Glukoosipitoisuus (g/l)	10,1	10,7	12,3	12,7	12,8	12,8
Konversio-%	49	52	60	62	62	62
Eg (u/g)	97	103	175	186	160	160

^aTiedot kolonnista 2.

^bTiedot kolonnista 4.

^cTiedot kolonnista 5.

^dKolmen tunnin kuluttua.

Selvyyden vuoksi entsymaattisen deaktivoinnin ominaisuu-
det on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6

Immobilisoidun laktaasin deaktivointiominaisuudet eri herasyötteidien hydrolyysin aikana pH-arvossa 3,5 ja eri lämpötiloissa

	<u>Lämpö-tila</u>	<u>Eg^{2a}</u>	<u>Eg^{6b}</u>	<u>< Eg^c</u>	<u>Deakt. nopeus^d</u>	<u>Näennäinen puoliintumisaika^e</u>
<u>Täyshera</u>						
Koe A	50 ^o	402	142	260	65	3,1
Koe B	50 ^o	350	133	217	54	3,2
<u>Selkeytetty hera</u>						
Koe A	50 ^o	520	251	269	67	3,9
Koe B	50 ^o	543	269	274	68,5	4,0
<u>Selkeytetty ja demineralisoitu hera</u>						
Koe A	20 ^o	96	97	0	0	∞
Koe B	20 ^o	110	103	7	1,75	31,4
Koe A	35 ^o	247	175	72	18	6,9
Koe B	35 ^o	257	186	71	17,8	7,2
Koe A	50 ^o	305 ^f	160	145	48,3 ^g	3,2
Koe B	50 ^o	295	160	135	33,8	4,4

^aOminaisaktiivisuus 2 tunnin kuluttua.

^bOminaisaktiivisuus 6 tunnin kuluttua.

^cEg²-Eg⁶ (jos Eg⁶ on suurempi kuin Eg², eron oletetaan olevan nolla).

^d<Eg/4, ilmaistuna (u/g)/h, so. ominaisaktiivisuuden lisäys tunnissa ilmaistuna yksikköinä grammaa kohti.

^fPerustuen 3 tunnin kuluttua oletettuun glukoosimittaukseen.

^g<Eg/3.

Perustuen yllä olevien tietojen tarkasteluun voidaan tehdä seuraavat johtopäätökset:

(1) entsyymitoiminnan väheneminen oli nopeaa paitsi 20^o:ssa (kunkin kokeen kohdalla vrt. Eg⁶ Eg²:een);

- (2) kohoavien lämpötilojen vaikutus oli marginaalinen, koska konversioprosentti tasaantui, kun entsyymitoiminta saavutti huippunsa ja sen jälkeen väheni;
- (3) entsyymitoiminnan väheneminen oli palautuva, koska puhdistus palautti toiminnan sen alkutasolle (vrt. kokeiden A ja B ominaisaktiivisuuksia joko 2 tai 6 tunnin kuluttua);
- (4) 35^o:ssa ja 50^o:ssa immobilisoidulla entsyymillä oli liian lyhyt puoliintumisaika kaupallisia käyttöjä varten; ja
- (5) 20^oC:ssa immobilisoidun entsyymin puoliintumisaika näytti olevan tyydyttävä kaupallisia käyttöjä varten, mutta ominaisaktiivisuus oli liian alhainen.

Yhdessä esimerkit 1 ja 2 osoittavat selvästi sen edun, jonka lämpökäsittely ja linkoaminen tarjoavat, kun ne suoritetaan ennen heran hydrolyysiä immobilisoidulla laktaasilla. Tällainen etu käy selvemmin ilmi taulukosta 7, joka esittää yhteenvetona ja vertailee taulukoiden 2 ja 6 tietoja.

Taulukko 7

Immobilisoidun laktaasin deaktivoinnin vertailu selkeytetyn ja demineralisoidun heran hydrolyysin avulla käyttäen lämpökäsittelyä ja ilman sitä

	<u>Lämpötila</u>	<u>Deaktivoointinopeus</u>	<u>Näennäinen puoliintumisaika</u>
Ilman lämpökäsittelyä	35 ^o	17,9 ^a	7 ^a
Lämpökäsittelyä käyttäen	35 ^o	0,1 ^b	1980 ^b
Ilman lämpökäsittelyä	50 ^o	41 ^a	3,8 ^a
Lämpökäsittelyä käyttäen	50 ^o	1,8 ^c	124

^aKokeissa A ja B saatujen arvojen keskiarvo.

^bKoska kaksi kolmesta laskelmasta antoi tulokseksi nolla-deaktivoointinopeuden ja äärettömän puoliintumisaajan, keskiarvojen oletetaan yksinkertaisesti olevan pienempiä

kuin ja suurempia kuin deaktivoointinopeudelle ja puoliintumisajalle saadut yksittäiset äärelliset arvot.

^cKoska yksi kolmesta laskelmasta antoi tulokseksi nolla-deaktivoointinopeuden ja äärettömän puoliintumisajan, keskiarvojen oletetaan olevan pienempiä kuin ja suurempia kuin deaktivoointinopeuksille ja puoliintumisajoille saatujen kahden äärellisen arvon keskiarvot.

Kuten taulukko 7 selvästi osoittaa, selkeytetyn heran, josta mineraaleja oli poistettu, lämpökäsittely ja linkoaminen ennen hydrolyysiä paransivat entsyymien stabiliteettia, mitattuna puoliintumisaikana, kertoimella n. 30 - n. 300, lämpötilasta riippuen. Tällainen parannus vaikuttaa merkittävästi immobilisoidun laktaasin käyttöön täysheeran hydrolyysiin kaupallisessa mittakaavassa.

Esimerkki 3

Tämä esimerkki osoittaa lisäetuja, joita saadaan tulokseksi esillä olevan keksinnön menetelmän puhdistus- ja desinfiointivaiheista.

Joka viikko saatiin n. 100 l täysheraa juustotehtaasta. Vastaanoton jälkeen hera selkeytettiin linkoamalla Alfa-Laval LAPX 202 separaattorissa, joka toimi nopeudella 11 000 - 12 000 kierr/min virtausnopeudella 30-35 l/h. Selkeytetystä herasta poistettiin kivennäisiä n. 50 % Stackpack sähködialyysimoduulissa (Ionics). Saatu selkeytetty hera, josta oli poistettu kivennäisiä, hapotettiin pH-arvoon 3,5 lisäämällä n. 0,7 l/g väkevöityä kloorivetyhappoa heralitraa kohti. Hapotettu hera varastoitiin n. 2-4^o:ssa.

Joka päivä poistettiin n. 10 l hapotettua heraa varastosta, ja heraa kuumennettiin 80^o:seen n. 43 minuutin ajan. Lämmin hera lingottiin yllä kuvatuissa olsouhteissa selkeytystä varten. Sen jälkeen hera jäähdytettiin ja varastoitiin n. 4^o:ssa. Heraa käytettiin sen jälkeen kolmannen

immobilisoitua laktaasia käyttävän herahydrolyysikolonnin syöttöaineena.

Kuhunkin kolonniin panostettiin n. 4,7-5 g esimerkissä 1 kuvattua immobilisoitua laktaasiyhdistelmää. Hydrolyysin aikana käytetty virtausnopeus oli n. 100 - n. 110 ml/h. Hydrolyysilämpötila oli 35^o, ja hydrolyysiä jatkettiin yhtämittaisesti n. 18 tuntia.

Hydrolyysivaiheen lopulla kukin kolonni huuhdottiin vedellä n. 45 min. Sen jälkeen kukin kolonni puhdistettiin ja/tai desinfioitiin seuraavasti:

Kolonni 1

Kolonni puhdistettiin johtamalla kolonnin läpi proteaasin Alcalase[®] 0.6 L liuosta, jonka pH oli 7,5 ja joka sisälsi 6 Anson-yksikköä litraa kohti. Tätä liuosta kierrätettiin 20 min vastavirtaan leijutusolosuhteissa.

Kolonni desinfioitiin sen jälkeen samoin kierrättämällä kolonnin läpi 0,1-% Tego Diocto BS-liuosta. Tego Diocto BS on dioktyylidietyleenitriamiinin ja trioktyylidietyleenitriamiinin seos, jota myy kaupallisesti saksalainen yhtiö Th. Goldschmidt A.G.

Lopuksi kolonni huuhdeltiin jälleen vedellä.

Kolonni 2

Kolonni puhdistettiin ja huuhdottiin kuten kolonnin 1 kohdalla on kuvattu, paitsi että puhdistusliuos oli etikkahapon vesiliuos, jonka pH oli 3.

Kolonni 3

Kolonni desinfioitiin ja huuhdottiin kuten kolonnin 1 kohdalla on kuvattu.

Hydrolyysi ja puhdistus ja/tai desinfiointijaksot tois-

tettiin sitten 17-26 päivän aikana, riippuen kolonnista. Kolonnien tehoa mitattiin joka päivä eri aikoina, kuten jo selitettiin. Saadut tulokset on esitetty taulukossa 8, vaikka siinä on esitetty vain ominaisaktiivisuudet yksinkertaisuuden vuoksi. Taulukko 9 esittää saaduista tiedoista lasketut stabiliteetit ja puoliintumisajat.

Taulukko 8

Lämpökäsitellyn heran hydrolyysi pH-arvossa 3,5 ja 35^o:ssa puhdistus ja/tai desinfiointivaiheiden yhteydessä

Päivä	Kolonne 1			Kolonne 2 ^c			Kolonne 3		
	Eg ²	Eg	Eg ^{17b}	Eg ²	Eg ^a	Eg ^{17b}	Eg ²	Eg ^a	Eg ^{17b}
1	234	235	222	273	258	206	193	174	155
5	238	296	273	231	202	177	139	143	140
10	210	233	219	182	163	111	123	125	98
15	222	220	-	162	117	91	114	122	96,5
17	204	223	210	81	36	13	112	107	97
20	223	213	203				117	104	104
26	198	203	175				103	98	90

^aKeskimääräinen ominaisaktiivisuus yksikköinä grammaa kohti 15 tunnin jatkuvan tuotannon aikana.

^bOminaisaktiivisuus yksikköinä grammaa kohti 17 tunnin kuluttua.

^c17. päivänä päättynyt hydrolyysi.

Taulukko 9

Stabiliteettien ja puoliintumisaikojen yhteenveto lämpökäsitellyn heran hydrolyysin aikana pH-arvossa 3,5 ja 35^o:ssa puhdistus ja/tai desinfiointivaiheiden yhteydessä

	Vain <u>etikkahappo</u>	Vain Tego <u>Diocto BS</u>	Proteaasi, <u>Tego Diocto BS</u>
Puoliintumisaika- päiviä	9	35	55
Stabiliteetti, % ^a	60	90	95

^aStabiliteetti on keskimääräinen tilastollinen suhde ilmaistuna prosentteina aktiivisuudesta 17 tunnin kuluttua aktiivisuuteen asti 2 tunnin kuluttua kaikkina toimintapäivinä.

Taulukoista 8 ja 9 nähdään:

- (1) etikkahapolla desinfioidun kolonnin teho pieneni melko nopeasti mitattuna immobilisoidun laktaasin ominaisaktiivisuutena. Aktiivisuuden pienennys aikayksikköä kohti muuttui huomattavasti suuremmaksi 15. päivän jälkeen, joka johti kolonnin sulkemiseen 17. päivän lopussa;
- (2) verrattuna etikkahapolla desinfioituun kolonniin Tego Diocto BS:llä puhdistetulla kolonnilla oli paljon parempi stabiliteetti ja puoliintumisaika. Niin ollen mikrobisaastumisen valvonta kolonnissa mahdollistaa tärkeän edun saavuttamisen kaupallisella tasolla; ja
- (3) kaikkein mielenkiintoisimmat tulokset saatiin yhdistämällä proteaasiliuosta käyttävä puhdistusvaihe ja ainakin yhtä substituoitua dietyleenitriamiinia, esim. Tego Diocto BS:ää, sisältävää liuosta käyttävä desinfiointivaihe tässä kuvattuun lämpökäsittelyyn. Tämä yhdistelmä paransi merkittävästi stabiliteettia ja puoliintumisaikaa.

Esimerkki 4

Tämän esimerkin tarkoituksena on määrittää täysheran hydrolyysiin käytetyn immobilisoidun laktaasin tehon muutos hydrolyysi/puhdistusjaksojen lukumäärän funktiona. Immobilisoitu laktaasi valmistettiin esimerkin 1 mukaisesti. Kukin hydrolyysivaihe kesti 18 tuntia, ja kuusi jaksoa suoritettiin. Hydrolyysi- ja puhdistusolosuhteet olivat seuraavat:

Hydrolyysi

Syötetty aine oli täyshera, joka oli hapotettu pH-arvoon 3,5 kloorivetyhapolla. Lämpötila oli 32^o, ja 4,2 g (kuivapainopohja) immobilisoitua laktaasia käytettiin.

Puhdistus

Kolonne huuhdottiin ensin vedellä 45 min ja puhdistettiin sen jälkeen etikkahapolla kuten esimerkissä 3 kuvattiin. Lopullinen vesihuuhtelu suoritettiin 3 minuutin ajan.

Tulokset on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10

Useat hydrolyysi/puhdistusjaksot käyttäen täysheraa pH-arvossa 3,5 ja 32^o:ssa ja etikkahappopuhdistusliuosta

<u>Jakso n:o</u>	<u>Keskimääräinen teho hydrolyysin aikana^a</u>		
	<u>Virtaus- nopeus (ml/h)</u>	<u>Konver- sio-%</u>	<u>Eg (u/g)</u>
1	114	49,3	144
2	98	56	149
3	99	46	98
4	94	40	71
5	96	42,6	83
6	94	35	55

^aKeskiarvo laskettiin 15,5 tunnin jatkuvan hydrolyysin aikana (ensimmäinen 2,5 tunnin jakso jätettiin pois).

Yllä olevien tuloksien tarkastelu osoittaa, että

- (1) immobilisoidun laktaasin puoliintumisaika on hyvin lyhyt (hieman alle viisi päivää perustuen ominaisaktiivisuussarvoihin);
- (2) etikkahappopuhdistus ei takaa immobilisoidun laktaasin riittävää stabiliteettia peräkkäisten hydrolyysi/puhdistusjaksojen aikana; ja
- (3) saadut tulokset eivät anna aihetta harkita käytetyn hydrolyysi/puhdistusjakson käyttöä kaupallisessa mittakavassa entsyymitoiminnan nopean häviämisen takia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä heran käsittelymiseksi, jolloin ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoidaan glukooksi ja galaktoosiksi immobilisoidun laktaasin avulla, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet:
 - a) heran kuumentamisen lämpötilaan n. 45-90°C ainakin noin 15 sek;
 - b) kuumennetun heran linkoamisen sen ollessa vielä lämmin; ja
 - c) lingotun heran saattamisen kosketukseen immobilisoidun laktaasin kanssa olsohteissa, joissa ainakin osa sen sisältämästä laktoosista hydrolysoituu glukooksi ja galaktoosiksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisäksi puhdistetaan ja desinfioidaan immobilisoitu laktaasi.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoidun laktaasin puhdistus aikaansaadaan saattamalla immobilisoitu laktaasi kosketukseen proteaasiliuoksen kanssa.
4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoidun laktaasin desinfiointi aikaansaadaan saattamalla immobilisoitu laktaasi kosketukseen vähintään yhden substituoidun dietyleenitriamiinin liuoksen kanssa.
5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heran kuumennusaika on 15 min - 1 tunti.
6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että korkeintaan 90 % mineraaleista poistetaan herasta etukäteen.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hera hapotetaan pH-arvoon 3,5-6 ennen sen saattamista kosketukseen immobilisoidun laktaasin kanssa.
8. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hera kirkastetaan ennen sen kuumentamista.
9. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoitu laktaasi puhdistetaan saattamalla se kosketukseen sellaisen proteaasin liuoksen kanssa, jonka entsyymiaktiviteetti on 0,1-10 Anson-yksikköä litraa liuosta kohti.
10. Menetelmä heran käsittelymiseksi sen proteiinisäilön ainakin osittaiseksi poistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että heraa kuumennetaan 45-90°C:een ainakin 15 sek ja kuumennettua heraa lingotaan sen ollessa vielä lämmin.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

803837

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

FI P 59701 (A23C21/00)

CH

DE

DK

FR

GB P 1400913 (A23J1/20), 1539278 (C13K5/00)

NO

SE

US 4107334 (A23J3/00) 2602746 (99-56)
3852496 (C07G7/02)

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

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Handbuch der Lebensmittelchemie 3. Band, Teil
1968, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 870-1
Biotechnol. Bioeng. vol. 16 (1974) S. 689-96
Milchwissenschaft vol. 31 (3) 1976, S. 129-134
Chem. Abstr. vol. 81 (1974) 116610a: J. Food Sci.
39(2) 1974, S. 374-8
Chem. Abstr. vol. 82 (1975) 12047p: J. Food Sci.
38(6) 1974, S. 1070-3