

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 119025

Int. Cl. C 07 g 7/00 Kl. 12p-16

Patentsøknad nr. 166.382 Inngitt 13.I 1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 16.III 1970

Prioritet begjært fra: 16.I-66 Israel,
nr. 24.981

Aharon Katchalsky, 18 Dubnov Street, Tel Aviv, Israel,
Eitan Lahav, 5 Margolin Street, Rishon-le-Zion, Israel,
Mogens Torbens Sode-Mogensen, Ordrupsvej 45B, Ordrup,
København, Danmark og
Det Israelske Landbruksdepartement i Jerusalem, Israel.

Oppfinnere: De tre førstnevnte søkerne.

Fullmektig: Mag. scient. Per Aubert.

Fremgangsmåte til fremstilling av de antibakterielt
virksomme forbindelsene hel kaseicidin, α -kaseicidin,
 β -kaseicidin og γ -kaseicidin.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte til fremstilling av de antibakterielt virksomme polypeptidforbindelsene hel kaseicidin, α -kaseicidin, β -kaseicidin og γ -kaseicidin.

urning av melk ved hjelp av egnede bakterier er meget viktig innen meieri-industrien for fremstilling av forskjellige surmelkprodukter, aromatisk smør såvel som oster av forskjellige typer og slag.

Det har allerede lenge vært observert at den normaleurning av melk i mange tilfeller hemmes hvilket kan resultere enten i fullstendig reaksjonssvikt eller i en betraktelig forsinkelse. Spesielt ved fremstilling av ost kan melkesyreproduksjonen ved hjelp av syrevekkeren forsinkes eller hindres slik at det ikke er mulig å lage ost med den ønskede høye kvalitet eller å lage ost i det hele tatt. Hemm-

ingen av den riktige syreutvikling under ostefremstilling forandrer således ostens sluttlige egenskaper eller hindrer hele dens fremstilling.

Det er nå oppdaget at melkesyredannelsen til en viss grad avhenger av melkens egenskaper som tjener som substratmateriale, fordi melk er et kulturmedium for melkesyrebakteriene. Det har lenge vært observert at ostefremstillingsprosesser forsinkes og at det forekommer defekter i det endelige osteprodukt på grunn av at visse melkeprodukter ikke er egnet som kulturmedier. Det at et visst medium ikke egner seg som kulturmedium for bakterier kan være følgen av tilstedeværelsen av visse naturlige hemmende stoffer og/eller mangel på visse avgjørende vekststoffer.

Til tross for de ovenfor nevnte observasjoner og mange studier som har vært foretatt når det gjelder spørsmålet om naturlig hemmende og stimulerende egenskaper i melk, har det hittil ikke vært funnet noen forklaringer på de ovenfor omtalte fenomener. Dette skyldes ganske sikkert melkens meget komplekse natur og det faktum at mange stammer av melkesyrebakterier som benyttes i ostefremstilling, ikke oppfører seg på samme måte i dette medium.

I de senere år har mange naturlige polypeptider med antibakterielle virkninger blitt isolert og karakterisert. Det er således funnet at flere bakterier og sopptyper utskiller cykliske antibakterielle peptider slik som gramicidin, tyroidin, polymyxiner og bacitraciner. Også leukin, som er et protamin med sterke antibakterielle egenskaper, ble isolert og et basisk peptid som hemmet veksten til bakterier ble isolert fra svine-thyroid.

Disse og andre observasjoner har ifølge foreliggende oppfinnelse ledet til den antagelse at hemmingen av utviklingen av melkesyrebakterier i melk muligens kan skyldes en naturlig polypeptidforbindelse med antibakterielle egenskaper, som hele tiden er tilstede i melk i form av en forløper fra hvilken den under visse betingelser kan dannes eller frigjøres. Oppfinnelsen er basert på den videre antagelse at hvis en slik forbindelse virkelig dannes, kan den også ha andre antibakterielle egenskaper som kan gjøre den egnet for bruk i medisin. Begge disse antagelser ble konstatert ifølge foreliggende oppfinnelse.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebragt en fremgangsmåte til fremstilling av de antibakterielt virksomme forbindelsene hel kaseicidin, α -kaseicidin, β -kaseicidin og γ -kaseicidin, kjennetegnet ved at det dannes en homogen suspensjon av kasein, α -kasein, β -kasein eller γ -kasein i vann, og at suspensjonens pH-verdi

stilles til 6-7 ved tilsetning av en base til fullstendig oppløsning av kaseinet, hvorefter det tilsettes et proteolytisk enzym til oppløsningen og reaksjonsblandingen inkuberes ved ca. 30°C, hvorefter enzymet inaktiveres ved oppvarming, det tilsettes en syre som er i stand til å utfelle parakaseinater, de utfelte parakaseinater fraskilles og det dannede kaseicidin isoleres fra supernatanten.

pH-verdien i den ovenfor omtalte reaksjon velges fortrinnsvis ved ca. 6.4.

Eksempler på proteolytiske enzymer som kan benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse er rennin, papain, pepsin og trypsin. Av disse er rennin det mest effektive og foretrekkes derfor og kan brukes i mengder på 0.02 µg per 1 ml av en 1.7% vandig kaseinoppløsning.

Enzymene behøver ikke å brukes i ren tilstand og forskjellige kommersielle eller andre sammensetninger som inneholder disse kan anvendes. Når det f.eks. gjelder rennin kan både ren rennin såvel som dens sammensetninger slik som kommersiell ostelöpe kan benyttes.

Oppfinnelsen vil i det følgende bli beskrevet og eksemplifisert under henvisning til bruken av rennin, idet det skal forstås at dette bare er brukt som eksempel. Betegnelsen "rennin" i følgende beskrivelse har til hensikt å dekke både ren rennin såvel som sammensetninger inneholdende rennin slik som f.eks. i kommersiell ostelöpe.

De ifølge oppfinnelsen fremstilte forbindelser, nemlig hel kaseicidin, α-kaseicidin, β-kaseicidin og γ-kaseicidin, kan kjenne- tegnes som følger:

(a) Molekylvekt bestemt ved ultra-sentrifugering i veronal-buffer-oppløsninger med ionestyrke på 0.2 og kaseicidin-konsentrasjoner på 1%, 0.67%, 0.50% og 0.33% i en flerkanalcelle ved hjelp av likevektsmetoden med kort kolonne ifølge David A.

Yphantis, "Annals of the New York Academy of Science", volum 88, artikkel 3, sidene 586-601, 31. august 1960.

Tabell I

	Mol- vekt 1%	Mol- vekt 0.67%	Mol- vekt 0.50%	Mol- vekt 0.33%	Mol-vekt gjennom- snittlig	Mol- vekt 0.00%
Hel kaseicidin	5137	5637	5428	6077	5569	6500
α-kaseicidin	4891	5010	4965	5605	5117	5120
β-kaseicidin	3910	3950	4090	4210	4040	4250
γ-kaseicidin	5130	5380	5700	5690	5475	6150

(b) Total N: Hel kaseicidin 14.54%, α -kaseicidin 14.76%,
 β -kaseicidin 15.01%, γ -kaseicidin 11.98%.

(c) Total P: Hel kaseicidin 0.43%, α -kaseicidin 0.27%,
 β -kaseicidin 0.19%, γ -kaseicidin 0.38%.

(d) Sammensetninger uttrykt i mengder av aminosyrer per 100 g tørrstoff:

Tabell II

	Hel kaseicidin	α -kaseicidin	β -kaseicidin	γ -kaseicidin
Aspartinsyre	8.17	9.17	4.91	6.24
Threonin	10.57	6.55	6.22	7.05
Serin	5.40	4.41	3.39	5.71
Glutaminsyre	19.77	16.23	16.85	17.95
Prolin	13.80	11.44	16.20	14.51
Glycin	2.36	2.50	3.59	3.07
Alanin	3.90	2.41	2.70	3.09
Valin	8.18	4.35	10.55	8.11
Isoleucin	8.04	5.71	7.08	6.07
Leucin	6.51	9.30	6.52	6.36
Tyrosin	1.94	3.42	3.59	5.16
Fenylalanin	2.74	3.42	4.38	4.13
NH ₃	1.60	1.70	1.40	1.60
Lysin	6.72	6.74	4.41	4.62
Histidin	2.53	4.48	1.49	1.37
Arginin	<u>3.76</u>	<u>4.95</u>	<u>4.83</u>	<u>2.72</u>
Totalt	<u>105.99</u>	<u>96.78</u>	<u>98.11</u>	<u>97.76</u>

Ifølge oppfinnelsen tilveiebringes hel kaseicidin fra hel kasein, α -kaseicidin fra α -kasein, β -kaseicidin fra β -kasein og γ -kaseicidin fra γ -kasein. Den separate isolering av de forskjellige kaseiner fra melk er i og for seg kjent fra litteraturen. Således utfelles f. eks. hel kasein ved romtemperatur fra frisk upasteurisert skummet melk ved langsomt å regulere pH-verdien for denne melken til 4.6 med 0.25 n HCl. Det utfelte kasein filtreres gjennom et osteklede og vaskes flere ganger med destillert vann, hver gang med suspendering i et passende volum vann og refiltrering.

Rensede α - og β -kaseiner kan fremstilles ved hjelp av urea-metoden ifølge Hipp et al. J. Dairy. Sci. 35, 272-281 og det rensede γ -kasein kan fremstilles ved hjelp av alkoholmetoden ifølge Hipp et al.

J. Amer. Chem. Soc. 72, 4928-4931. Denne metoden kan modifiseres noe for å forbedre utbyttet, som beskrevet av E. Lahav i Special Bulletin nr. 72 i august 1964 (the National and University Institute of Agriculture, the Volcani Institute of Agricultural Research, Rehovoth, Israel).

Fra hver av de fire kaseinene fremstilles den tilsvarende kaseicidin ved omsetning med et proteolytisk enzym, f.eks. rennin. Enzymet tilsettes til en homogen vandig kaseinoppløsning og reaksjonsblandingen inkuberes deretter ved ca. 30°C. Når enzymet er rennin, som brukes i en mengde på 0.2 µg per 1 ml av en 1.7% vandig kaseinoppløsning, er inkubasjonstiden 14 timer. Hvis andre mindre kraftige enzymer brukes er inkubasjonstiden lengre og/eller større mengder enzym er nødvendig.

Når reaksjonen er ferdig oppvarmes oppløsningen for å inaktivere enzymet, avkjøles deretter til romtemperatur og til den avkjølte oppløsning tilsettes en uorganisk syre eller en egnet organisk syre slik som f.eks. eddiksyre eller triklorediksyre (TCA). Av disse syrer er TCA spesielt effektiv og kan tilsettes til den ovenfor avkjølte oppløsning i form av en 8% vandig oppløsning inntil pH-verdien er senket til ca. 1.25. Når syren er uorganisk eller hvis det brukes eddiksyre, må den mengden som tilsettes kontrolleres slik at pH-verdien ikke faller under 4.6.

Ved tilsetningen av syre utfelles parakaseinat. Det utfelte parakaseinat fjernes ved sentrifugering og supernatanten renses ved dialyse mot destillert vann ved 2°C. Fra den resulterende rensede oppløsningen kan kaseicidinet isoleres f.eks. ved hjelp av frysetørking.

Den antimikrobielle aktivitet til de fire kaseicidiner ble målt in vitro for å bestemme:

- (a) kaseicidinenes styrke som antibakterielle midler, og
- (b) en gitt mikro-organismes følsomhet overfor kjente konsentrasjoner av kaseicidiner.

På grunn av kaseicidinenes relativt store molekylstørrelse ble den fortløpende "kraft" fortynningstest anvendt fremfor diffusjonsmetoden.

Flere fortynninger av de forskjellige kaseicidiner ble foretatt i 4 ml "kraft" pepton og podet med testorganismen *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* og *Bacillus stearothermophilus*.

Podningsmidlet (400 000 bact./ml) var i alminnelighet 0.1 ml av en 20 timer gammel "kraft" kultur. Rørene ble inkubert i 72 timer og etter inkubasjonen ble graden av veksthemming av organismen notert for hver konsentrasjon av kaseicidinet, uttrykt i mikrogram stoff per milliliter "kraft" pepton.

Følgende resultater ble oppnådd:

Tabell III

Totalt antall bakterier per milliliter medium etter 72 timers inkubasjon, i bakterier av tusen.

	Konsentra- sjon i /ug/ml	Sarcina lutea	Staphylo- coccus aureus	Bac. substilis	Bac. Stearother- mophilus
Kontroll		66.000	32.000	46.000	17.000
Hel kase- icidin	10	66.000	33.000	46.000	18.000
	100	66.000	32.000	38.000	17.000
	500	64.000	32.000	32.000	17.000
	1000	64.000	31.000	0	17.000
	1600	52.000	32.000	0	16.000
	2000	11.000	0	0	0
α -kase- icidin	10	66.000	31.000	42.000	19.000
	100	66.000	32.000	38.000	19.000
	500	66.000	31.000	19.000	18.000
	1000	68.000	30.000	0	17.000
	2000	42.000	0	0	0
β -kase- icidin	10	62.000	32.000	44.000	19.000
	100	2.000	22.000	2.000	19.000
	500	0	0	0	18.000
	1000	0	0	0	0
-kase- icidin	10	66.000	32.000	42.000	18.000
	100	66.000	32.000	42.000	19.000
	500	--	32.000	42.000	19.000
	1000	--	0	42.000	0

-- betyr at ingen eksperimenter ble utført.

0 betyr ingen vekst.

Lignende inhiberende virkninger av kaseicidinene i en konsentrasjon på 125 μ g/ml ble oppnådd med hensyn til *Diplococcus pneumonia* og *Streptococcus pyogenes*.

En baktericid virkning ble fastslått ifølge metodene til S.D. Elek og G.R.F. Hilson, Y.S. Chabbert og J.C. Patte, og L.P. Garrod og T.M. Waterworth, som beskrevet av K.R. Eriksen, M.D. Thesis, København 11. oktober 1965, Universitetets institutt for almen patologi. Ved

kombinasjonen av kaseicidinene med peniciliner ble det frembragt en synergistisk effekt, som ble bestemt ifølge J. Lederberg og E. M. Lederbert som beskrevet av K. R. Eriksen, loc. cit.

Toksisitetsforsøk ble utført ved hjelp av intraperitoneale innsprøytninger i mus og marsvin, og det ble funnet at kaseicidinene var ikke-toksiske i konsentrasjoner på opp til 200 mg/kg legemsvekt.

Ved gjentatte innsprøytninger i de samme dyrene ved intervaller på 10-16 dager ble det ikke observert noen symptoner på anaphylaxis og allergiske reaksjoner av noe slag.

Det kunne videre fastslås ifølge oppfinnelsen at kaseicidinene faktisk er ansvarlige for de tidligere nevnte uregelmessigheter, som av og til forekommer ved fremstillingen av ost og andre meieri-produkter som et resultat av total eller delvis inhibering av utviklingen av melkesyrebakterier. For å vise dette ble det foretatt fortløpende fortynninger av de forskjellige kaseicidinene i 100 ml nylig skummet melk pasteurisert ved oppvarming til 85°C i en kort periode og deretter avkjølt til 30°C. Hver del av således fremstilt melk ble podet med 1 ml kommersiell Chr. Hansens oste-syrevekker og inkubert ved 30°C i 6 timer. Etter inkubasjonen ble den surnede melken titrert og dannet syre ble oppført uttrykt som ml 0.1N NaOH benyttet til titrering av 100 ml surnet melk. Følgende resultater ble oppnådd:

Tabell IV

Konsentrasjon i µg per ml melk	Titreringsresultat etter 6 timers inkubasjon ved 30°C uttrykt som ml 0.1N NaOH per 100 ml melk inneholdende kaseicidiner.			
Kaseicidin:	Hel	α	β	γ
0	69.0	69.0	69.0	69.0
10	69.0	69.5	69.0	70.5
20				71.0
30			69.0	
40				71.5
50			69.5	
60				72.0
70			70.5	
80				72.5
100	69.0	69.0	72.0	74.0
150				74.5
200	69.5	64.0	70.0	
250				63.0
300	69.0			
400	67.5	59.0	69.0	
500	63.0			50.0
600		54.0	67.5	
800		47.0	66.5	
1000	61.0	44.0	64.5	38.0
1600	55.0			
2000	52.0	40.0	48.0	

Det følger fra tabell IV ovenfor at små mengder hel kaseicidin og α -kaseicidin ikke har noen virkning på surningen av melken i det hele tatt. Ettersom de konsentrasjoner som faktisk finnes i løpebehandlet melk nåes, nedsettes imidlertid melkesyreproduksjonen av syrevekkeren hvilket klart tyder på en antimikrobiell aktivitet for kaseicidinenes vedkommende. Det fremkommer også fra tabellen at små konsentrasjoner av β - og γ -kaseicidiner også i en viss utstrekning stimulerer aktiviteten til melkesyrebakteriene, men ettersom konsentrasjonene öker virker disse kaseicidinene også som antibakterielle midler.

Det kan sluttet fra tabell IV ovenfor at både de absolutte mengder av hver av kaseicidinene såvel som deres relative mengder, bestemmer surningshastigheten på melken og mens det i noen tilfeller ikke vil være noen virkning eller endog en viss stimulering, vil det i andre tilfeller forekomme en klar inhibering.

Både de absolutte mengdene av kaseicidinene i melken såvel som deres relative mengder avhenger av løpeinnvirkningen, fordi det er bare ved løpeinnvirkning at disse antibakterielle stoffer dannes fra kaseinet. Dette ble ifölge foreliggende oppfinnelse fastslått som følger:

100 ml fortlöpende porsjoner av nylig skummet melk ble behandlet med 0.03 ml Chr. Hansens kommersielle ostelöpe som tilsvarer den mengden som i praksis brukes i ostefremstilling. Etter inkubasjon ved 30°C i forskjellige tidsperioder som varierte mellom 1 og 10 minutter, ble enzymet inaktivert ved oppvarming til 80°C i 3 minutter. Etter en inkubasjon på mer enn 10 minutter koagulerer melken ved oppvarming til 80°C og resultatene etter de nevnte lengre inkubasjonsperioder kunne derfor ikke undersøkes. Etter den ovenfor omtalte behandling ble melken avkjölt til 30°C, innpodet med 1 ml oste-syrevekker og inkubert i 6 timer ved 30°C.

For kontrollformål ble samme fremgangsmåte fulgt med ostelöpe og rennin, som på forhånd var inaktivert.

Den tildannede syre ble notert som i de tidligere eksperimenter. Resultatene er gitt i fölgende tabell:

Tabell V

Effekten av kort-tidsvirkning av ostelöpet og rennin på surningskapasiteten til melk, titrering som ml 0.1N NaOH per 100 ml

Innvirkningens varighet i minutter	Melk med ostelöpe	Melk med rennin
1	70.5	73.5
2	73.5	74.0
3	74.0	75.0
4	74.5	75.5
5	72.0	70.0
10	66.0	66.5
Kontroll	69.5	72.0

Det fremgår fra tabell V ovenfor at allerede etter 1 minuts behandling av melken med ostelöpet såvel som med rennin, forekommer det en stimulering av syreutviklingen og denne stimulering öker, når en toppverdi etter 4 minutter og deretter forekommer en betydelig inhibering. Det bör i denne forbindelse errindres at melk har en sterk buffer-virkning og den oppförte inhibering er derfor meget betydelig.

Oppfinnelsen er videre illustrert ved fölgende eksempel, som viser tilveiebringelsen av de antibakterielt virksomme kaseicidiner:

Eksempel

A. Fremstilling av hel kasein

Hel kasein ble utfelt ved romtemperatur fra 50 l frisk upasteurisert skummet melk ved langsomt å stille pH-verdien til 4.6 med 11 liter 0.25N HCl. Det utfelte kasein ble filtrert gjennom et osteklede og vasket fem ganger med destillert vann, hver gang ved suspensjon i et volum på 75 liter vann og filtrering gjennom et osteklede.

B. Fremstilling av α - og β -kasein

1500 g våt hel kasein (400 g tørrvekt) ble opplöst ved tilsetning av 2259 g urea og vann som ga et totalt volum på 5.7 liter og en ureakonsentrasjon på 6.6 M.

Til opplösningen ovenfor ble det ved romtemperatur langsomt og under omröring tilsatt 2.425 liter vann hvilket bragte ureakonsentrasjonen ned til 4.63 M. Bunnfallet som dannet seg under disse betingelser var hovedsakelig α -kasein, som ble fjernet ved sentrifugering. Det urene α -kasein ble videre rensset ved å opplöse det i 1500 ml av en 6.6 M ureaopplösning også inneholdende 15.9 g NaCl. Fra opplösningen ble rent α -kasein utfelt ved tilsetning av 1500 ml vann og bunn-

fallet ble frafiltrert og vasket med en 4.7 M ureaoppløsning. For å fjerne spor av β -kasein ble produktet igjen oppløst i en vandig ureaoppløsning og bunnfelt på nytt som før. Urea ble fjernet fra produktet ved vasking med et overskudd vann. Etter tørking ble 150 g ren α -kasein tilveiebragt.

Det tilveiebragte filtrat etter fjerningen av det utfelte α -kasein og som utgjorde 4.63 molar med hensyn til urea, ble fortynnet ned til 3.3 M urea ved tilsetning av destillert vann. Dette ga et lite bunnfall som var en blanding av α - og β -kasein i omtrent samme mengdeforhold som de forekommer i den ufraksjonerte kasein. Dette bunnfall ble fjernet ved sentrifugering og kassert. Det gjenstående filtrat som i oppløst tilstand inneholdt α -kaseinet og som hadde en ureamolaritet på 3.3, ble fortynnet til en ureamolaritet på 1.7 og på samme tid ble pH-verdien stilt til 4.7 ved tilsetning av ca. 20 ml 0.1N HCl. Den utfelte urene β -kasein ble rensset ved oppløsning i 2 liter av en 4.6 M vandig ureaoppløsning og ved fraksjonering med eluering med vann. Også i dette tilfelle inneholdt den delen som var oppløselig i en 3.3 M ureaoppløsning, men uoppløselig i en 1.7 M ureaoppløsning, det reneste β -kasein. Ved utfelling på nytt på denne måten ble den resterende lille mengde α -kasein fjernet og 60 g ren β -kasein ble oppnådd.

C. Fremstilling av γ -kasein

Omtrent 1000 g (tørrvekt) våt hel kasein ble suspendert i vann og oppløst ved langsom tilsetning av 0.1N NaOH for således å gi en 7% oppløsning av hel kasein med en pH-verdi på 6.9. Etter å ha stått natten over ble et likt volum absolutt alkohol tilsatt langsomt under omrøring. α - og β -kasein ble utfelt ved langsom tilsetning av 0.1N HCl i 50% alkohol for således å gi en pH på 5.7. Bunnfallet ble fjernet ved sentrifugering ved romtemperatur. Supernatanten ble avkjølt til 2°C og etter å ha stått natten over utfelte γ -kaseinet seg. Bunnfallet ble fjernet ved sentrifugering ved 2°C og oppløst i 2 liter 50% alkohol ved romtemperatur og utfelt på nytt ved 2°C som før. Bunnfallet ble fjernet ved sentrifugering ved 2°C og produktet ble tørket med en blanding av like volumdeler aceton og eter ved romtemperatur. 8 g ren γ -kasein ble oppnådd.

D. Fremstilling av kaseicidinene

Fremstillingen av hel, α -, β - og γ -kaseicidin foregår på en analog måte fra det respektive kasein, som tjener som utgangsmateriale, som følger:

En 1.7% oppløsning av kaseinet, som tjener som utgangsmateriale, fremstilles først ved å lage en homogen kasein-vannsuspen-sjon ved hjelp av grundig blanding av kaseinet med vann i en morter. Den beregnede mengde på 0.1N NaOH tilsettes deretter langsomt under kraftig omrøring. For å oppløse kaseinet og bringe oppløsningen til en pH på 6.4, kreves det for hel, α -, β - og γ -kasein en mengde på 0.5, 0.5, 0.45, og 0.35 milliekvivalent NaOH respektivt for hvert gram fuk-tig fritt kasein. For å fullstendiggjøre oppløsningen må blandingen stå i flere timer ved regelmessig oppdeling. Etter at kaseinet er fullstendig oppløst fjernes de resterende uoppløste urenheter ved sen-trifugering.

Til den resulterende oppløsning tilsettes krystallisert rennin i en mengde på 0.02 mikrogram for hver ml oppløsning og den resulterende reaksjonsoppløsning inkuberes ved 30°C i 14 timer. På slutten av denne perioden oppvarmes oppløsningen til 80°C for å in-aktivere enzymet. Etter avkjøling til romtemperatur tilsettes en 8% triklor-eddiksyreoppløsning (TCA) til reaksjonsblandingen i et forhold mellom reaksjonsoppløsning til TCA = 3:1, hvilket gir en endelig kon-sentrasjon av triklor-eddiksyre i reaksjonsoppløsningen på 2%. Det resulterende bunnfall fjernes ved sentrifugering og supernatanten som inneholder det ønskede kaseicidin dialyseres mot destillert vann ved 2°C i 72 timer, idet vannet skiftes hver 12. time. Hver gang anvendes en mengde på 30 volumdelers destillert vann for hver volumdel kaseici-dinoppløsning hvilket utgjør en total mengde på 180 volumdelers vann. Etter dialysen er ferdig frysetørkes oppløsningen.

Ved å gå frem på denne måten er utbyttene som følger:

Hel kaseicidin fra 1.5 liter av en 1.7% utgangsuppløsning av hel kasein - 1.9378 gram.

α -kaseicidin fra 1.5 liter av en 1.7% utgangsuppløsning av α -kasein - 1.3414 gram.

β -kaseicidin fra 1.5 liter av en 1.7% utgangsuppløsning av β -kasein - 0.9074 gram.

γ -kaseicidin fra 0.250 liter av en 1.7% utgangsuppløsning av γ -kasein - 0.2860 gram.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte til fremstilling av de antibakterielt virk-somme forbindelsene hel kaseicidin, α -kaseicidin, β -kaseicidin og γ -kaseicidin, k a r a k t e r i s e r t v e d at det dannes en homo-gen suspensjon av kasein, α -kasein, β -kasein eller γ -kasein i vann, og

at suspensjonens pH-verdi stilles til 6 - 7 ved tilsetning av en base til fullstendig oppløsning av kaseinet, hvoretter det tilsettes et proteolytisk enzym til oppløsningen og reaksjonsblandingen inkuberes ved ca. 30°C, hvoretter enzymet inaktiveres ved oppvarming, det tilsettes en syre som er i stand til å utfelle parakaseinater, de utfelte parakaseinater fraskilles og det dannede kaseicidin isoleres fra supernatanten.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det proteolytiske enzym som anvendes er rennin.

Anførte publikasjoner: -