(19) DANMARK (11) **DK 175134 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl^{7}.: **C 12 N 9/64**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1996 00272**

(22) Indleveringsdag: **1996-03-08**

(24) Løbedag: **1987-09-30**

(41) Alm. tilgængelig: **1996-03-08**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-06-14**

(30) Prioritet: **1986-10-01 US 913965 1987-08-17 US 086499**

(73) Patenthaver: **Sanofi Bio Ingredients, Inc., 620 Progress Avenue, Waukesha, Wisconsin 53187-1609, USA**

(72) Opfinder: **Peter Birschbach, 425 Carpenter Place, Waukesha, Wisconsin 53186, USA**

(74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til at forøge chymosinindholdet af et mælkekoaguleringsenzymholdigt materiale afledt af et chymosinholdigt væv af lav kvalitet til et forudbestemt niveau**

(57) Sammendrag:

Fremgangsmåde til at forøge chymosinindholdet af et mælkekoaguleringsenzymholdigt materiale afledt af et chymosinholdigt væv af lav kvalitet til et forudbestemt niveau, hvor det enzymholdige materiale måles for at bestemme chymosinindholdet deraf, og der til det enzymholdige materiale sættes en tilstrækkelig mængde chymosin fremstillet fra en væske indeholdende de mælkekoagulerende enzymer chymosin og pepsin, hvor den enzymholdige væske indstilles til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 19 x 10^3 μS, et anionbyttermedium bringes i ligevægt til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 19 x 10^3 μS, det ligevægtsindstillede ombytningsmedium bringes i kontakt med den indstillede enzymholdige væske til binding af pepsin til ombytningsmediet, chymosin udvindes af den væske, der fremkommer efter kontakt med lejet af ombytningsmedium, og ombytningsmediet periodisk bringes i kontakt med en opløsning til fjernelse af bundet pepsin derfra, til at forøge det samlede chymosinindhold til et forudbestemt niveau.

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til at forøge chymosinindholdet af mælkekoagulerende enzymholdige materialer afledt af chymosinholdige væv af lav kvalitet til et forudbestemt niveau.

Løbe afledt af dyrevæv, såsom den fjerde mave (kallunet) af okser, indeholder to mælkekoagulerende enzymer chymosin og oksepepsin. Den relative koncentration af disse to enzymer varierer meget afhængende først og fremmest af dyrets alder på slagtningstidspunktet og/eller dets kost. Løbe afledt af unge kalve, der er mindre end 60 dage gamle, er f.eks. typisk sammensat hovedsagelig af chymosin, medens den, der er afledt af et voksent dyr, er sammensat først og fremmest af oksepepsin.

Anvendt til fremstilling af ost giver løber, der har højt chymosinindhold, i almindelighed højere udbytter og bedre aroma og tekstur. Variationer i chymosinindholdet kræver ændringer i den anvendte mængde løbe for at opretholde samme udbytte og ostekvalitet. Tilgængeligheden af løbe med højt chymosinindhold bliver mere begrænset på grund af en reduktion i antallet af slagtede kalve.

(International Dairy Federation) IDF-standard 110:1982 beskriver en kromatografisk metode til at bestemme chymosinindhold og oksepepsinindhold i løbeekstrakter. Chymosin og pepsin påføres først på en diethylaminoethyl (DEAE) celluloseharpiks. Natriumchloridopløsninger af forskellige koncentrationer ledes så i rækkefølge gennem søjlen for at opnå en første fraktion indeholdende chymosin og en anden fraktion indeholdende pepsin.

Formålet med opfindelsen er at angive en fremgangsmåde til at forøge chymosinindholdet af mælkekoagulerende enzymholdige materialer afledt af chymosinholdigt væv af lav kvalitet til et forudbestemt niveau.

Dette opnås ved en fremgangsmåde af den angivne art, som er ejendommelig ved, at det enzymholdige materiale måles for at bestemme chymosinindholdet deraf, og der til det enzymholdige materiale sættes en tilstrækkelig mængde chymosin fremstillet fra en væske indeholdende de mælkekoagulerende enzymer chymosin og pepsin, hvor den enzymholdige væske indstilles til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 19 x 10^3 μS, et anionbyttermedium bringes i ligevægt til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 10 x 10^3 μS, det ligevægtsindstillede ombytningsmedium bringes i kontakt med den indstillede enzymholdige væske til binding af pepsin til ombytningsmediet, chymosin udvindes af den væske, der fremkommer efter kontakt med lejet af ombytningsmedium, og ombytningsmediet periodisk bringes i kontakt med en opløsning til fjernelse af bundet pepsin derfra, til at forøge det samlede chymosinindhold til et forudbestemt niveau.

Fremgangsmåden til adskillelse af chymosin fra en væske indeholdende de mælkekoagulerende enzymer chymosin og pepsin, såsom en løbeekstrakt, er genstand for kravene i DK nr. 2860/88. Ved denne fremgangsmåde bringes et anionbyttermedium, som selektivt binder pepsin, i kontakt med væsken. Chymosin udvindes af væsken, der fremkommer efter kontakt med ionbytningsmediet, og ionbytningsmediet bringes periodisk i kontakt med en opløsning til fjernelse af pepsin. Før adskillelsestrinnet bliver løbeekstrakten eller anden væske indeholdende mælkekoagulerende enzymer indstillet til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2, fortrinsvis ca. 4,0 til ca. 5,0, og mest foretrukket ca. 4,4 til ca. 4,6, og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 19 x 10^3, fortrinsvis ca. 5 x 10^3 til ca. 15 x 10^3 og mest foretrukket 8 x 10^3 til ca. 10 x 10^3 μS. Ionbyttermediet bringes i ligevægt til ca. samme pH-værdi og ledningsevne. Da løbeekstrakter i reglen indeholder væsentligt mindre mængder pepsin end chymosin, kan forholdsvis store mængder chymosin fraskilles, før det bundne pepsin må fjernes fra ionbyttermediet.

Fremgangsmåden til adskillelse af chymosin fra en væske indeholdende de mælkekoagulerende enzymer chymosin og pepsin kan i en udførelsesform ske ved, at ombytningsmediet pakkes i en væskekromatografisk søjle, den indstillede enzymholdige væske ledes gennem lejet af ombygningsmedium, chymosin udvindes af væskeafløbet fra søjlen, og den pepsinfjernende opløsning er en eluant, som ledes gennem lejet af ombytningsmedium.

Lejet kan være i hovedsagen statisk, og den indstillede enzymholdige væske kan ledes kontinuerligt derigennem.

Fremgangsmåden kan også udføres ved, at en portion af den indstillede enzymholdige væske indføres i søjlen, lejet omrøres i tilstrækkelig tid til, at ombytningsmediet bringes i intim kontakt med enzymet og binder pepsin dertil, og der udtages en væskeekstrakt indeholdende chymosin af søjlen.

Fremgangsmåden kan desuden omfatte et trin til skylning af ombytningsmediumlejet med en væske, såsom den væske, der anvendes til ækvilibrering af ombytningsmediet, efter at en forudbestemt mængde af den enzymholdige væske er blevet ført derigennem.

I en udførelsesform bliver ionbyttermediet, der fortrinsvis er en DEAE-celluloseharpiks, pakket som et leje i en væskekromatografisk søjle, løbeekstrakten eller lignende ledes gennem lejet af ionbyttermedium, chymosin udvindes af væsken, der løber fra søjlen, og en eluant ledes periodisk gennem lejet af ionbyttermedium for at fjerne det bundne pepsin. Pepsin kan udvindes af den udløbende eluant.

I en anden udførelsesform omrøres lejet af ionbyttermedium, og løbeekstrakten tilsættes portionsvis.

Chymosinindholdet af løbeekstrakter afledt af maver af dårlig kvalitet kan således ifølge den foreliggende fremgangsmåde

forøges til et forudbestemt niveau ved at sætte en passende mængde af det udvundne chymosin dertil.

Udgangsmaterialet er en væske indeholdende de mælkekoagulerende enzymer chymosin og pepsin. Disse to mælkekoagulerende enzymer kan fås af en række forskellige kendte kilder, herunder løbe afledt af dyrevæv eller eksisterende i produkter bestående af blandinger af enzymer, såsom en blanding af svinepepsin, oksepepsin og oksechymosin. Fremgangsmåden er særligt effektiv til løber ekstraheret af den fjerde mave (kallunet) af okser, og fremgangsmåden vil blive beskrevet i forbindelse med en sådan løbeekstrakt. Den kan også anvendes til materiale indeholdende chymosin og pepsiner (andre end oksepepsin), som bindes til et anionbyttermedium ved de nedenfor beskrevne betingelser.

Løben kan ekstraheres af dyrevæv på enhver sædvanlig metode. For at bringe ombytningsmediet til selektivt at binde oksepepsin bliver den flydende løbeekstrakt først indstillet til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2×10^3 til ca. 19×10^3 μS. Der er ingen tendens hos hverken chymosin eller oksepepsin til at bindes til et anionbyttermedium, når pH-værdien af løbeekstrakten er under ca. 3,8, og begge er tilbøjelige til at bindes til et anionbyttermedium, når pH-værdien er over ca. 5,2. Mere fuldstændige adskillelser af chymosin fra oksepepsin kan opnås ved en pH-værdi i intervallet fra ca. 4,0 til ca. 5,0, og endnu mere fuldstændige adskillelser kan i reglen fås ved en pH-værdi i intervallet ca. 4,4 til ca. 4,6.

Hvis ledningsevnen af løbeekstrakten er under ca. 2×10^3 μS, er oksepepsinet og andre bundne molekyler, såsom pigment, tilbøjelige til at blive irreversibelt bundet til et anionbyttermedium. Hvis ledningsevnen er over ca. 19×10^3 μS, er der en tendens til, at hverken oksepepsin eller chymosin bindes til et anionbyttermedium. Mere fuldstændige adskillelser af chymosin fra oksepepsin kan opnås med en led-

ningsevne i intervallet fra ca. 5×10^3 til ca. 15×10^3, og endnu mere fuldstændige adskillelser kan i reglen fås med en ledningsevne i intervallet fra ca. 8×10^3 til ca. 10×10^3 μS. For tiden ser det ud til, at den optimale pH-værdi og ledningsevne er henholdsvis ca. 4,5 og 9×10^3 μS.

pH-værdien af løbeekstrakten kan indstilles til det ønskede niveau ved tilsætning af en passende mængde af en egnet syre af fødevarekvalitet, såsom fortyndet svovlsyre (hvis den oprindelige pH-værdi er over det ønskede niveau) eller en egnet base af fødevarekvalitet, såsom ammoniumhydroxid (hvis pH-værdien er under det ønskede niveau). Ledningsevnen af løbeekstrakten målt ved en ledningsevnebro eller lignende kan indstilles til et ønsket niveau ved tilsætning af en passende mængde af et egnet salt af fødevarekvalitet, såsom natriumchlorid (hvis den oprindelige ledningsevne er under det ønskede niveau) eller ved at fortynde med afioniseret vand (hvis ledningsevnen er over det ønskede niveau).

Anionbyttermediet kan være enhver type, der er i stand til at blive bragt i ligevægt til selektiv binding af oksepepsin og derefter frigøre det bundne oksepepsin efter at være bragt i kontakt med en eluant, der er uskadelig i fødevarer. Egnede ionbytningsmedier indbefatter de, der har en indifferent uopløselig grundmasse, såsom cellulose, acrylpolymerer og lignende, og hvori der er indført—anioniske funktionelle grupper, såsom amino, alkylamino, guanidino og kvaternære ammoniumgrupper. Grundmassen skal have en struktur, der er tilstrækkelig åben eller løs, således at den ikke bliver tilstoppet med partikler i løbeekstrakten, og som muliggør et rimeligt gennemløb, når den anvendes i en væskekromatografisk søjle som nedenfor beskrevet.

Celluloseharpikser, der har en åben fibrøs grundmasse, foretrækkes. Repræsentative egnede celluloseharpikser er beskrevet i US patent nr. 3.573.277, hvortil der henvises. DEAE-celluloseharpikser har vist sig at være særligt effektive.

Når der anvendes en DEAE-celluloseharpiks som ombytningsmedium, bliver den forudcirkuleret på sædvanlig måde før brugen. F.eks. omrøres harpiksen i 0,5 N saltsyre i 30 minutter, og den overliggende væske dekanteres. Harpiksen skylles så med afioniseret vand, indtil den overliggende væske har en pH-værdi på 4,0. Harpiksen omrøres så i 0,5 N natriumhydroxid i 30 minutter, og den overliggende væske dekanteres. Harpiksen skylles så med afioniseret vand, indtil den overliggende væske har en pH-værdi på 8,0.

Det forudcirkulerede ombytningsmedium bringes i ligevægt til en pH-værdi og en ledningsevne inden for de ovennævnte intervaller, således at oksepepsin tiltrækkes selektivt til ombytningsmediet. Ligevægtsindstillingen kan opnås ved at vaske ombytningsmediet med en stødpudeopløsning, der har den ønskede pH-værdi og ledningsevne. F.eks. kan en typisk ligevægtsopløsning bestå af en vandig opløsning, der indeholder 0,5% (vægt/rumfang) natriumbenzoat og en tilstrækkelig mængde natriumchlorid til at give en ledningsevne på 9×10^3 μS, hvortil der sættes fortyndet svovlsyre for at indstille pH-værdien til 4,5. Ligevægtsindstilling fortsættes, indtil den dekanterede overliggende væske har den ønskede pH-værdi og ledningsevne.

Det forudcirkulerede og i ligevægt bragte ionbytningsmedium kan pakkes i en sædvanlig kromatografisk søjle indeholdende en porøs bærer, såsom en sigte for et leje af ombytningsmediet og en ventil til at regulere en kontinuerlig strøm af løbeekstrakten gennem søjlen.

Den indstillede løbeekstrakt indføres i søjlen, passerer gennem det statiske harpiksleje og strømmen af det chymosinholdige afløb indstilles med en reguleringsventil, således at der muliggøres tilstrækkelig kontakt mellem løbeekstrakten og harpiksen til at oksepepsinet kan bindes på harpiksen. Denne tid kan bestemmes ved at analysere afløbet på sædvanlig måde for chymosin og oksepepsin. Hvis den mængde ekstrakt, som

indføres i søjlen, eller hastigheden, hvormed den passerer gennem harpikslejet er for høj, vil en del af oksepepsinet ikke bindes på harpiksen (dvs. at der er en ufuldstændig adskillelse mellem oksepepsin og chymosin), og dette vil afspejles i tilstedeværelse af større mængder oksepepsin i afløbet.

Rumfanget af og hastigheden, hvormed løbeekstrakten indføres i søjlen, kan bestemmes ved rutineforsøg og afhænger af rumfanget af anionbyttermediet i søjlen, enzymbindingskapaciteten af det særligt anvendte ombytningsmedium, koncentrationen af oksepepsin i løbeekstrakten og koncentrationen af forureninger som ikke er enzym i løbeekstrakten (f.eks. pigment), der bliver bundet til ombytningsmediet. Til formål, hvor mindre end i hovedsagen fuldstændig adskillelse af chymosin er acceptabel, kan strømningshastigheden af løbeekstrakten gennem søjlen forøges. Dette nedsætter kontakttiden og resulterer i en mindre fuldstændig adskillelse.

En sådan fremgangsmåde med et statisk leje kan have mangler, når den anvendes til nogle rå løbeekstrakter. Det kan være vanskeligt at opretholde en acceptabel strømningshastighed gennem søjlen, især når der anvendes en viskos ekstrakt. Det øvre lag af ombytningsmediet kan blive mættet med uopløselige materialer, såsom fedtstoffer, muciner osv., hvilket forårsager en reduktion i strømningshastighed. Kanaldannelse i ombytningsmediet kan forekomme, hvilket resulterer i en reduktion af kontakt mellem ombytningsmedium og enzymerne og et fald i bindingen af oksepepsin.

Disse mangler kan formindskes ved anvendelse af en søjle med omrørt leje. En sådan søjle ligner en søjle med statisk leje med undtagelse af, at lejet af ombytningsmedium omrøres, ekstrakten tilsættes portionsvis, og den indre diameter af søjlen i reglen er noget større til samme rumfang ombytningsmedium.

Når der anvendes en kromatografisk søjle med omrørt leje, indføres det forud cirkulerede og i ligevægt bragte ombytningsmedium i en søjle, der har en porøs bærer og en egnet omrører, såsom en luftdreven rørepind. Et rumfang indstillet løbeekstrakt indføres i søjlen, og blandingen af ekstrakt og ombytningsmedium omrøres i tilstrækkelig tid til at opnå intim kontakt derimellem og binde oksepepsin til ombytningsmediet. Den nødvendige kontakttid til gode adskillelser er i reglen kortere med en søjle med omrørt leje end med en søjle med statisk leje. Omrøring standses efter den ønskede kontakttid, væskefasen bliver enten aftappet eller dekanteret fra søjlen, og et andet rumfang løbeekstrakt indføres i søjlen. Denne cyklus kan gentages, indtil bindingskapaciteten af ombytningsmediet er blevet opbrugt, eller hele rumfanget af løbeekstrakt er blevet indført i søjlen.

I hovedsagen rent chymosin kan udvindes af afløbet eller væskeekstrakten fra søjlen ved en passende rensningsteknik. F.eks. kan afløbet indstilles til en pH-værdi på ca. 5,6 og derpå indføres i en kromatografisk søjle, hvori chymosin bindes til ombytningsmediet og derpå fjernes med en eluant, der er uskadelig i fødevarer.

Dette chymosin kan ifølge fremgangsmåden sættes til løbeekstrakter for at forøge chymosinindholdet til et forudbestemt niveau. Løbeekstrakter af lav kvalitet kan således forbedres, og chymosinindholdet af løbeekstrakter af enten høj eller lav kvalitet kan indstilles til en standardværdi, således at man dermed eliminerer virkningsvariationer ved fremstilling af ost. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan f.eks. anvendes til efter adskillelse af chymosin fra løbeekstrakter indeholdende så lidt som ca. 15% chymosin (beregnet på samlet mælkekoaguleringsevne) og op til ca. 85% at sættes dette til ekstrakter, der har samme interval af chymosinkoncentrationer for at forøge chymosinindholdet til et ønsket niveau.

Harpikslejet bliver fortrinsvis skyllet periodisk for at fjerne ubundne fremmede materialer. Harpikslejet omrøres fortrinsvis under skylleperioden for at forøge fjernelse af disse fremmedstoffer. Afløbet fra skylleperioden opsamles fortrinsvis i en særskilt beholder.

En eluant indføres periodisk i søjlen for at fjerne det bundne oksepepsin fra harpiksen, og afløbet opsamles i en særskilt beholder. Strømning af eluanten gennem harpikslejet fortsættes indtil der ikke spores nogen eller kun ringe mælkekoagulerende aktivitet i afløbet. Oksepepsin kan koncentreres af afløbet ved ultrafiltrering, omvendt osmose eller anden egnet koncentrationsteknik.

Elutionsopløsningen er fortrinsvis baseret på vand og indeholder et til fødevarer uskadeligt vandopløseligt salt, der har rimelige dissociationsegenskaber. Egnede salte indbefatter natriumchlorid, natriumphosphat og natriumacetat. En særligt effektiv eluant til DEAE-celluloseharpikser er en 10% natriumchloridopløsning, indstillet til en pH-værdi på ca. 4,4 til ca. 4,6. Eluering skal udføres, før det tidspunkt, hvor harpiksen bliver ladet med oksepepsin til det punkt, hvor den ikke længere er i stand til at binde oksepepsin.

Efter eluering kan harpikslejet bringes i ligevægt som ovenfor beskrevet og derved gøres parat til næste adskillelsescyklus.

De følgende eksempler anføres for at eksemplificere foretrukne udførelsesformer for opfindelsen. I eksemplerne blev enzymsammensætningerne bestemt ved fremgangsmåden beskrevet i Collin et al., "A Determination of Chymosin and Bovine Pepsin A in Commercial Rennets and Pepsin", Milchwissenschaft 36(1) 1981.

Eksempel 1

En løbeekstrakt fremkommet af den fjerde mave af slagtekalve blev indstillet til en pH-værdi på 4,5 og en ledningsevne på 7,8 x 10^3 μS og blev undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning. 100 g DEAE-celluloseharpiks blev forcirkuleret ved den almene fremgangsmåde, der er beskrevet ovenfor, og derefter bragt i ligevægt med en opløsning indeholdende 0,5% (vægt/rumfang) natriumbenzoat, hvortil der blev sat natriumchlorid for at indstille ledningsevnen til 8,0 x 10^3 μS, og fortyndet svovlsyre blev tilsat for at indstille pH-værdien til 4,5.

Harpiksen, der var bragt i ligevægt, blev pakket i en kromatografisk søjle af glas indeholdende en porøs lejebærer og en hane til regulering af udstrømningen. Den indstillede løbeekstrakt blev indført i søjlen med en strømningshastighed på ca. 10 ml/min, og afløbet blev opsamlet og undersøgt for enzymsammensætning. Harpiksen blev skyllet med 200 ml ligevægtsopløsning, efter at 1000 ml løbeekstrakt var blevet adskilt. Skylleafløbet blev opsamlet og undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet.

Efter denne skylning blev søjlen elueret med en 10% natriumchloridopløsning indstillet til en pH-værdi på 4,5. Elueringen blev fortsat, indtil der blev påvist en mælkekoagulerende aktivitet på mindre end 1,0 enhed/ml i elutionsafløbet. Elutionsafløbet blev opsamlet og undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning.

Resultaterne af denne prøve er opsummeret i tabel I.

Tabel I

Undersøgelse af løbe og afløb.

	Mælkekoagulerende aktivitet, enheder	Enzymsammensætning, akt. (1) Chymosin	Pepsin (2)
Løbeekstrakt	18.500	85,6	14,4
Adskillelsesafløb	15.630	>99	< 1
Skylleafløb	213	--	--
Elutionsafløb	2.678	11,3	88,7

Noter: (1) % af total mælkekoaguleringsaktivitet
(2) Oksepepsin

Eksempel 2

En løbeekstrakt fra den fjerde mave af slagtekalve blev indstillet til en pH-værdi på 4,5 og en ledningsevne på 9,0 x 10^3 μS og undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning. 200 kg af en DEAE-celluloseharpiks blev forcirkuleret ved den almene fremgangsmåde, der er beskrevet ovenfor, og derefter bragt i ligevægt med en opløsning indeholdende natriumbenzoat, hvortil der var sat natriumchlorid til at give en ledningsevne på 9,0 x 10^3 μS, og fortyndet svovlsyre blev tilsat for at indstille pH-værdien til 4,5.

Den i ligevægt bragte harpiks blev pakket i en kromatografisk søjle af fiberglas med en indre diameter på 122 cm og en højde på 183 cm og indeholdende en motordrevet omrører, en porøs harpikslejebærer og en reguleringsventil. Den indstillede løbe blev indført i søjlen med en strømningshastighed på ca. 25 l/min, og afløbet blev opsamlet. Efter at 23.000 l løbeekstrakt var strømmet gennem søjlen, blev ca. 1900 l af ligevægtsopløsningen indført i søjlen, medens omrøreren var i drift for at vaske harpiksen. Indføring af løbeekstrakten blev fortsat efter afslutning af denne vaskecyklus. En anden

vaskecyklus blev udført, efter at andre 19.300 l af løbeekstrakten var blevet indført og en tredje vaskecyklus blev udført, efter at yderligere 19.840 l af ekstrakten var blevet indført. Vaskeafløbet blev opsamlet og forenet med adskillelsesafløbet. Disse forenede afløb blev undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning.

Efter afslutning af den tredje vaskecyklus blev søjlen elueret med en 10% natriumchloridopløsning indstillet til en pH-værdi på 5,6. Eluering blev fortsat, indtil der blev påvist en mælkekoagulerende aktivitet mindre end 1,0 enhed/ml i elutionsafløbet, og elutionsafløbet blev undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning.

Resultaterne af denne prøve er opsummeret i tabel II.

Tabel II

Undersøgelse af løbe og afløb

	Mælkekoagulerende aktivitet, enheder	Enzymsammensætning, akt. (1) Chymosin	Pepsin (2)
Løbe	$6,11 \times 10^8$	87,1	12,9
Adskillelse og vaskeafløb	$5,247 \times 10^8$	>99	< 1
Elutionsafløb	$0,819 \times 10^8$	8,8	91,2

Noter: (1) % af total mælkekoagulerende aktivitet
(2) Oksepepsin

Af disse resultater kan det ses, at en fraktion indeholdende i hovedsagen kun chymosin og en uanselig mængde oksepepsin kan fås af en løbeekstrakt med ringe eller intet tab i mælkekoagulerende aktivitet.

Eksempel 3

To rækker prøver blev udført for at bestemme effektiviteten af adskillelsen mellem chymosin og oksepepsin i en løbeekstrakt med variationer i pH-værdi og ledningsevne af en ligevægtsindstillet harpiks og en indstillet løbeekstrakt. Ledningsevnen blev holdt på 9 x 10^3 μS og pH-værdien blev varieret i den ene serie, og pH-værdien blev holdt på 4,5 og ledningsevnen blev varieret i den anden.

Til hver prøve blev 25 g af DEAE-celluloseharpiks forcirkuleret ved den almene fremgangsmåde, der er beskrevet ovenfor, og derefter bragt i ligevægt til den ønskede pH-værdi og ledningsevne. Den ligevægtsindstillede harpiks blev pakket i en kromatografisk søjle af glas indeholdende en porøs lejebærer og en hane til at regulere strømmen. En løbeekstrakt fremkommet af den fjerde mave af slagtekalve blev indstillet til samme pH-værdi og ledningsevne som den ligevægtsindstillede harpiks og undersøgt for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning. 1000 ml af den indstillede ekstrakt blev indført i søjlen og strømmede gennem harpikslejet med en hastighed af ca. 4 ml/min og afløbet blev opsamlet. Søjlen blev skyllet med 100 ml af opløsningen anvendt til at ligevægtsindstille harpiksen, og skylleafløbet blev opsamlet og forenet med adskillelsesafløbet.

Efter denne skylning blev søjlen elueret med 250 ml af en 10% natriumchloridopløsning indstillet til en pH-værdi på 5,6 og elutionsafløbet blev opsamlet. De forenede afløb fra adskillelse og skylning og elutionsafløbet blev undersøgt hver for sig for mælkekoagulerende aktivitet og enzymsammensætning, og rumfangene af begge blev målt.

Resultaterne af disse prøver er opsummeret i tabel III. Af resultaterne kan det ses, at der ikke blev opnået nogen betydelig adskillelse mellem chymosin og oksepepsin ved en pH-værdi på 3,7, medens der var en betydelig stigning i chy-

mosinindholdet i adskillelsesafløb og skylleafløb, når pH-værdien blev hævet til 4,0. Der var ingen betydelig adskillelse mellem chymosin og oksepepsin, og begge blev bundet til harpiksen ved en pH-værdi på 5,3, medens der var en betydelig stigning i chymosinindholdet af adskillelsesafløb og skylleafløb, når pH-værdien blev hævet til 5,0. Ved en ledningsevne på 2 x 10^3 μS var der en stigning i chymosinindholdet i adskillelsesafløbet og skylleafløbet, men den totale enzymudvinding var mindre end 60%, hvilket viser at en betydelig mængde af enzymet var irreversibelt bundet til harpiksen. Der var ingen betydelig adskillelse mellem chymosin og oksepepsin ved en ledningsevne på 20 x 10^3 μS, medens der var gode adskillelser ved ledningsevner på 5 x 10^3 og 15 x 10^3 μS.

Tabel III

Enzymadskillelser med variationer af pH og ledningsevne

pH	Ledningsevne x 10^3 µmhos	Løbeekstrakt			Afløb fra adskillelse og skylning			Elutionsafløb		
		Vol., ml	Enzym(1) sammensætning	MCA(2) enheder/ml	Vol., ml	Enzym sammensætning	MCA(2) enheder/ml	Vol., ml	Enzym sammensætning	MCA(2) enheder/ml
3,7	9,0	1000	78% C 22% P	10,6	1140	78% C 21% P	7,4	240	n.p	1,3
4,0	9,0	1000	83% C 19% P	7,2	1120	94% C 6% P	5,8	265	n.p.	1,8
5,0	9,0	1000	78% C 22% P	10,8	1130	100% C 0% P	8,0	285	n.p.	11,6
5,3	9,0	1000	81% C 19% P	6,8	1090	n.p.(3)	0,9	235	80% C 20% P	23,3
4,5	2,0	1000	22% C 78% P	2,4	1120	98% C 2% P	0,5	290	n.p.	2,8
4,5	5,0	1000	22% C 78% P	3,9	1120	n.p.	1,0	265	2% C 98% P	9,5
4,5	15,0	1000	82% C 18% P	15,1	1100	98% C 2% P	11,6	255	n.p.	4,9
4,5	20,0	1000	22% C 78% P	3,8	1100	21% C 79% P	3,2	260	n.p.	2,6

Noter: (1) C = chymosin; P = oksepepsin
(2) MCA = mælkekoaguleringsaktivitet
(3) n.p. = ikke udført

DK 175134 B1

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til at forøge chymosinindholdet af et mælkekoaguleringsenzymholdigt materiale afledt af et chymosinholdigt væv af lav kvalitet til et forudbestemt niveau, k e n d e t e g n e t ved, at det enzymholdige materiale måles for at bestemme chymosinindholdet deraf, og der til det enzymholdige materiale sættes en tilstrækkelig mængde chymosin fremstillet fra en væske indeholdende de mælkekoagulerende enzymer chymosin og pepsin, hvor den enzymholdige væske indstilles til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 19 x 10^3 μS, et anionbyttermedium bringes i ligevægt til en pH-værdi på ca. 3,8 til ca. 5,2 og til en ledningsevne på ca. 2 x 10^3 til ca. 19 x 10^3 μS, det ligevægtsindstillede ombytningsmedium bringes i kontakt med den indstillede enzymholdige væske til binding af pepsin til ombytningsmediet, chymosin udvindes af den væske, der fremkommer efter kontakt med lejet af ombytningsmedium, og ombytningsmediet periodisk bringes i kontakt med en opløsning til fjernelse af bundet pepsin derfra, til at forøge det samlede chymosinindhold til et forudbestemt niveau.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det enzymholdige materiale er en løbeekstrakt.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at løbeekstrakten hidrører fra bovint kallun.