



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

83433

C (45) Patentti ja kumotto
Patent meddelat 10 07 1991

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 12N 9/38, C 12P 19/02

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	844737
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	30.11.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	30.11.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	03.06.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.03.91
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
02.12.83 NL 8304153 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Gist-Brocades N.V., Wateringseweg 1, P.O. Box 1, Delft, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Bijl, Hendrik Louis, Insulindestraat 72, Vlaardingen, Netherlands, (NL)
2. Repelius, Cornelis, Vliervlinder 5, Leiden, Netherlands, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä laktoosia pilkkovan entsyymin mikrobivapaan liuoksen valmistamiseksi ja sen käyttö
Förfarande för framställning av en mikrobfri lösning av ett laktos spjälkande enzym och dess användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

SE B 428257 (A 23C 9/00),
Food Science and technology Abstracts, vol. 10, 1978, nro 1, p. 154, abstract P 81,
Journal of Dairy Research 44 (3), p. 541-548, 1977,
Milchwissenschaft, vol. 34, nro 10, 1979, p. 618-621,
Agr. Biol. Chem., vol. 29, nro 7, 1954, p. 665-671

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmä käsittää laktoosia pilkkovan entsyymin mikrobivapaan liuoksen valmistamisen, siten, että käymisen avulla tuotetun laktoosia pilkkovan entsyymin liuos steriilisuodatetaan talteenoton ja puhdistuksen jälkeen, mutta ennen kuin hajaantumistuotteiden muodostuminen on riittävä tukkimaan steriilisuodattimen.

Tällaista mikrobivapaata liuosta voidaan käyttää alennetun laktoosipitoisuuden omaavan maidon ja maitotuotteiden valmistukseen.

Förfarandet omfattar framställning av en mikrobfri lösning av ett laktos-spjälkande enzym genom steril filtrering av en lösning av ett laktos-spjälkande enzym producerat genom jäsning, efter det att produkten har tillvaratagits och rengöres, men innan sönderfallsprodukter har bildats tillräckligt för att täppa till det sterila filtret.

Sådan mikrobfri lösning kan användas för framställning av mjölk och mjölkprodukter med nedsatt laktoshalt.

Menetelmä laktoosia pilkkovan entsyymin mikrobivapaan liuoksen valmistamiseksi ja sen käyttö - Förfarande för framställning av en mikrobfri lösning av ett laktos spjälkande enzym och dess användning

- 5 Tämä keksintö koskee laktoosia pilkkovan entsyymin mikrobivapaan liuoksen valmistusmenetelmää ja sen käyttöä alennetun laktoosipitoisuuden omaavan maidon ja maitotuotteiden valmistuksessa.

10 Laktoosi (maitosokeri) on disakkaridi, joka esiintyy meijerituotteissa ja erityisesti maidossa, kuoritussa maidossa, kermassa ja muissa maitotuotteissa. Nämä tuotteet sisältävät laktoosia noin 4 - 5%. Tavallisesti ei-absorboituva laktoosi pilkkoutuu kehossa absorboituviksi monosakkarideiksi, glukosiksi ja galaktoosiksi.

- 15 Tämän pilkkoutumisen aikaansaa tavallisesti luonnollinen entsyymi nimeltään β -galaktosidaasi tai laktaasi, jota esiintyy ihmiskehon (tai muiden imettäväisten) suoliseinässä.

20 Laajoilla alueilla maailmaa ihmiset ja eläimet kärsivät niin sanotusta laktoosi-intoleranssista, joka johtuu siitä, että laktoosia sisältävien tuotteiden pilkkomiseksi tarvittava laktaasisysteemi puuttuu niiltä kokonaan tai osittain. Sen tähden joko laktaasi ei pilkkoudu tai se pilkkoutuu riittämättömästi glukosiksi ja galaktoosiksi, jotka voidaan absorboida; ei-absorboitavissa 25 oleva laktoosi aiheuttaa siten suolistohäiriöitä.

Laktoosi-intoleranssi-ilmio on tunnistettu jo vuosikausia. Maitoproteiinilla, aminohappokoostumuksensa vuoksi, on huomattava ravintoarvo. On tehty yrityksiä valmistaa 30 vähälaktoosista tai laktoosivapaata maitoa ja maitotuotteita laktoosi-intoleranssista kärsiville, lisäämällä

maitoon ja maitotuotteisiin laktaasia. Laktaasilisäyksen ylimääräinen etu voi olla, että tällä tavalla käsitellyt tuotteet ovat makeampia.

5 On mahdollista lisätä entsyymiä ja antaa sen reagoida ennen maidon ja maitotuotteiden säilömistä pastöroimalla tai steriloidimalla. Kuitenkin säilytyksen aikana hyvin tunnettu Maillard-reaktio tapahtuu ja pilaa maidon ja maitotuotteiden maun.

10 GB-patenttijulkaisussa 1,477,087 kuvataan menetelmä maidon ja maitotuotteiden käsittelymiseksi laktoosia pilkkovalla entsyymillä, lisäämällä entsyymi aikaisemmin pastöroituu tai steriloituun maitoon juuri ennen pakkaamista, jonka jälkeen pakkaus suljetaan. Entsyymien toivottu reaktio esiintyvän laktoosin kanssa tapahtuu
15 siten suljetussa pakkauksessa. Koska entsyymi lisätään pastöroinnin tai steriloinnin jälkeen, ei Maillard-reaktiota tapahdu niissä oloissa. On selvää, että entsyymi
20 itsessään on tehtävä mikrobivapaaksi ennen kuin se lisätään steriloituun maitoon ja että lisäys maitoon ja/tai maitotuotteisiin täytyy suorittaa aseptisissä oloissa ja steriileillä laitteilla.

25 Julkaistussa SE-patenttihakemuksessa 78 00137 kuvataan menetelmä laktaasin steriloinniseksi säteilyttämällä tai käsittelemällä kemiallisesti, esimerkiksi etyleenioksidilla. Kuvauksen mukaan entsyymi voidaan steriloida liuotetussa muodossa suljetuissa, aseptisissä pakkauksissa sekä myös kiinteässä muodossa. Viimeksi mainitussa tapauksessa steriloitu laktaasi sen jälkeen liuotetaan aikaisemmin steriloituun liuotteeseen. Steriloidun
30 laktaasiliuoksen säiliö yhdistetään annostuslaitteeseen, jonka avulla steriili entsyymiliuos lisätään steriloituun maitoon, joka sen jälkeen pakataan. Kuitenkin ilmeni, että

molemmissa sterilointimenetelmissä laktaasientsyymin aktiivisuus suuresti häviää ja sterilointiin tarvitaan pitkä aika.

5 Julkaisussa Voedingsmiddelentechnologie 13 (1980), 23 on edelleen kuvattu GB-patenttijulkaisun 1,477,087 menetelmää. Tavallisesti meijeriteollisuudelle toimitettu vähämikrobinen laktaasi vesipitoisessa liuoksessa, johon on lisätty yksi tai useampi stabiloiva aine, esim. glyseroli, suodatetaan ennen käyttöä. Suodatettu entsyymiliuos 10 pumpataan steriilisuodattimen läpi, injektoidaan annostuslaitteen kautta aikaisemmin steriloidun maidon tuotantolinjalle, jonka jälkeen sekoitetaan maitoon. Lopuksi seos jaetaan ja pakataan aseptisissa oloissa yksittäisiin pakkauksiin.

15 Kuitenkin käytännössä edelle kuvatussa systeemissä steriilisuodatin usein tukkeutuu. Tukokset aiheutuvat suurimmaksi osaksi proteiinien ja polysakkaridien (kumien) hajoamisesta, joita voi vielä olla jäljellä entsyymiliuoksessa puhdistuksesta huolimatta. Hajaantumis- 20 ilmiöt tavallisesti lisääntyvät mitä kauemmin entsyymiä säilytetään ennen käyttöä ja voivat vielä korostua koska väliaika, joka kuluu kun entsyymien valmistaja tuottaa entsyymien ja meijeriteollisuus sen käyttöä, voi olla huomattavan pitkä. Myös laktaasissa esiintyvä proteaasi 25 voi olla syynä hajaantumisprosessiin.

On selvää että, steriilisuodattimien toistuva vaihtaminen tai puhdistaminen huomattavasti haittaa menetelmän tehokkuutta. Eikä ainoastaan prosessia ole pysäytettävä steriilisuodattimen poistamiseksi, vaan myös koko 30 systeemi täytyy steriloida uudestaan, ennen kuin se voidaan taas käynnistää.

Useita vuosia on yritetty ratkaista mikrobisuodatuksen ongelmaa monilla tavoilla, mutta nämä yritykset joko eivät ole johtaneet toivottuihin tuloksiin tai ne ovat olleet liian kalliita taloudelliseen menetelmään teollisessa mittakaavassa. Sarja- (Cascade) suodatusta yritettiin, t.s. suodatusta, jossa käytettiin sarjaa membraanisuodattimia, joiden huokoskoko pieneni, mutta yllättäen myös nämä suodattimet tukkeutuivat suhteellisen lyhyen ajan kuluttua. On myös ehdotettu, että entsyymiliuos sentrifugoidaan ennen steriilisuodatusta, mutta tämäkään menetelmä ei antanut optimaalisia tuloksia ja teki menetelmän myös huomattavan paljon kalliimmaksi. Muiden talteenottomenetelmien käyttö, esim. entsyymiliuoksen edelleen kirkastaminen, eivät ratkaisseet tukkeutuvien suodattimien ongelmaa.

Nyt on havaittu, että edellä kuvattu suodatusongelma voidaan välttää valmistamalla entsyymi mikrobivapaaksi lyhyen ajan kuluessa käymisen ja tavanomaisten talteenoton ja puhdistamisen jälkeen ja mahdollisesti säilyttämällä se steriilinä liuoksessa ennen maitoon lisäämistä.

Näin ollen keksintö koskee laktoosia pilkkovan entsyymin mikrobivapaan liuoksen valmistusmenetelmää, jossa laktoosia pilkkovan entsyymin liuos tehdään mikrobivapaaksi steriilisuodatuksella käymisen avulla tuotetun laktoosia pilkkovan entsyymin talteenottamisen ja puhdistamisen jälkeen, mutta ennen kuin hajaantumistuotteiden muodostuminen on riittävä tukkimaan steriilisuodattimen.

Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä on lisäksi etuna, että entsyymiliuoksen steriloimisen voi suorittaa entsyymintuottaja itse. Tähän asti eri meijeriteollisuuslaitoksista on jokainen itse steriilisuodattanut käyttämänsä entsyymiliuoksen tai mahdollisesti steri-

loinut sen jollain muulla tavalla.

Entsyymiliuos voidaan tehdä mikrobivapaaksi millä tahansa tunnetulla menetelmällä, jotka kaikki kuuluvat tämän keksinnön piiriin. Mieluimmin tavanomaisen talteenoton, puhdistuksen, autolyysin ja suodatuksen jälkeen, entsyymiliuos tehdään vähämikrobiseksi ennen steriilisuodatusta. Liuos tehdään vähämikrobiseksi mieluimmin mikrobeja vähentävällä suodattimella esimerkiksi SEITZ Supra EKS-suodatin tyynyillä. On edullista tehdä liuos vähämikrobiseksi välittömästi edellä mainittujen vaiheiden jälkeen. Mieluimmin liuos myös ultrasuodatetaan entsyymin konsentroimiseksi ennen steriilisuodatusta.

Steriilisuodatus (mikrobisuodatus) suoritetaan mieluimmin yhdellä tai useammalla membraanisuodattimella. Sopiva suodatin on esimerkiksi membraanisuodatin, jonka huokoskoko on 0,22 μm .

Entsyymiliuoksen mikrobisuodatuksen ajoitus ei ole kriittinen, mutta olisi valittava siten, että mitään huomattavia määriä hajaantumistuotteita ei vielä ole päässyt muodostumaan, mikä aiheuttaa suodattimen tukkeutumisen. Sen vuoksi on suositeltavaa suorittaa mikrobisuodatus lyhyen ajan kuluessa talteenoton ja puhdistamisen jälkeen. Mieluimmin mikrobisuodatus tehdään 14 päivän kuluessa ja kaikkein mieluimmin 5 päivän kuluessa talteenotosta ja puhdistamisesta.

Ennen tai jälkeen entsyymiliuoksen steriloimista steriilisuodatuksella, voidaan lisätä yksi tai useampi liuotin tai muita lisäaineita, esimerkiksi entsyymiaktiivisuuden säätämiseksi toivotulle tasolle ja edelleen entsyymin stabiloimiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi sorbitoli ja glyseroli. Sopivia lisäaineita, jotka

stabiloivat entsyymien, ovat esimerkiksi hydrolysoitu laktoosi, glukoosi, mannitoli ja suolapuskurit. Lisäaineita voidaan lisätä myös maidon tai maitotuotteiden lisämakeuttamiseksi. Tällainen lisäaine on esimerkiksi
5 invertaasi, jota voidaan lisätä tai jota on jo entsyymiliuoksessa. Mieluimmin lisäys suoritetaan steriloinnin jälkeen, lisätyt yhdisteet ovat tietysti edeltäkäsien steriloitujen. Edullinen liuotin, joka samanaikaisesti vaikuttaa entsyymiä stabiloivasti, on glyseroli. Lopullinen
10 glyseroli-vesi-suhde ei ole kriittinen, mutta on mieluimmin välillä 1:9 ja 4:1 tilavuudesta, erityisesti 1:3 - 1:1.

Sopivassa suoritusmuodossa, joka kuvaa keksintöä, vesipitoinen käymistuote, joka sisältää laktaasin, autolysoidaan jonka jälkeen se suodatetaan, mieluimmin käyttäen
15 suodatusapuaineita. Tarvittaessa suodos käsitellään aktiivihielellä ja lasketaan läpi mikrobeja vähentävästä suodattimesta (niin kutsuttu puhdistus-(polish) suodatin), jotta liuoksesta saadaan vähämikrobinen. Sen jälkeen
20 tapahtuu ultrasuodatus entsyymien konsentroimiseksi, jonka jälkeen lisätään glyseroli (noin 50 paino-%). Näin saatu liuos lasketaan taas läpi mikrobeja vähentävästä suodattimesta (SEITZ Supra EKS suodatustyyny), jonka jälkeen heti steriilisuodattimen läpi (membraanisuo-datin,
25 jonka huokoskoko 0,22 µm). Lopuksi liuos lasketaan steriilin säilytysastiaan, joka välittömästi suljetaan.

Eräessä toisessa sopivassa suoritusmuodossa lisätään noin
20 paino-% glyserolia suodokseen, edellä kuvattujen autolyysin, suodatuksen, puhdistussuodatuksen ja ultrasuodatuksen jälkeen. Sen jälkeen saatu liuos lasketaan
30 mikrobeja vähentävän suodattimen läpi ja lopuksi steriilisuodatetaan. Sen jälkeen liuoksen konsentraatio säädetään halutuksi (noin 1:1) steriilillä glyserolilla ja

pakataan steriileissä oloissa.

Edullisessa suoritusmuodossa lisätään noin 50 paino-% glyserolia edellä kuvattujen esisuodatus- ja steriilisuodatusvaiheiden jälkeen. Viimeksi mainitun menetelmän etu verrattuna edellä mainittuihin menetelmiin on, että liuos ennen steriilisuodatusta on vähemmän viskoosinen, jolloin suodatus voi tapahtua nopeammin.

Keksintö koskee myös menetelmää maidon ja maitotuotteiden valmistamiseksi, joissa laktoosipitoisuus on alennettu (mikä merkitsee myös makeampaa tuotetta) lisäämällä tämän keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettua laktoosia pilkkovan entsyymin mikrobivapaata liuosta.

Steriili entsyymiliuos voidaan säilyttää steriilissä säilytysastiassa ennen kuin sitä käytetään meijeriteollisuudessa. Steriilejä säilytysastioita, joissa nesteitä voidaan säilyttää, on kuvattu kirjallisuudessa hyvin usein. Mieluimmin käytetään säiliötä, joka voidaan helposti liittää annostuspumppuun maidontuotantolinjalla, esimerkiksi kuten on esitetty aikaisemmin mainitussa artikkelissa julkaisussa Voedingsmiddelentechnologie. Säiliön liittäminen annostuspumppuun täytyy tietysti suorittaa mikrobivapaissa oloissa. Steriilisuodatin, joka on steriilin entsyymiliuoksen ja tuotantolinjan välillä, tunnetuissa menetelmissä, voidaan jättää huomioonottamatta, kun käytetään keksinnön mukaisella menetelmällä saatua entsyymin mikrobivapaata liuosta. Saostuma, jota voi esiintyä, hajaantumisprosessien takia, ei tuki annostuspumppua ja on täysin harmitonta luonteeltaan. Lisäksi entsyymikonsentraatio maidossa on niin alhainen, että saostuman määrä lopullisessa tuotteessa on merkityksetön.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä.

Esimerkki 1:

Laktaasia sisältävän liuoksen steriilisuodatus

5 Maxilact[®], joka on kaupallinen, vesipitoinen Gist-Brocadesin tuottama käymistuote ja joka sisältää laktaasia, esisuodatettiin käyttäen SEITZ K 5, SEITZ EK ja MILLIPORE RAWP (huokoskoko 1,2 µm) suodatustyynyjä. Lopullisessa suodatuksessa liuos laskettiin läpi 10 Millipore GSWP membraanisuodattimesta (huokoskoko 0,22 µm) ja kerättiin steriiliin pulloon. Sen jälkeen liuos säädettiin haluttuun konsentraatioon steriilillä glyserolilla. Neljän pullon, joissa erilaiset glyserolipituudet (ja aktiivisuudet), steriilisyys on esitetty seuraavassa:

glyserolikonsentraatio (paino-%)	aktiivisuus (%)*	mikrobiluku/ml
0	91	<1
20	80	<1
50	49	<0,01
50	49	<0,01

* verrattuna lähtöaineen aktiivisuuteen

15 Koaguloitumistesti ja makupaneelitestit eivät ilmaisseet mitään lähtöaineesta poikkeavaa.

Esimerkki 2:

Steriilin Maxilact[®] in käyttö maidon tuotannossa

Liuosta, joka sisälsi 50 paino-% glyserolia, käytettiin eräässä testissä maidon tuotannossa. Tämä liuos injektoidi-

tiin annostuslaitteen kautta aikaisemmin steriloidun maidon tuotantolinjalla ja sekoitettiin sekoittimessa maidon kanssa. Lopuksi seos jaettiin ja pakattiin aseptisissä oloissa 1 litran pakkauksiin.

- 5 Maidon steriilisyyden 7 päivän varastoinnin jälkeen 30°C:ssa oli 100 %. Yli 85 % laktoosista oli hydrolysoitunut.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä laktaasin mikrobivapaan liuoksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että laktaasiliuos tehdään mikrobivapaaksi steriilisuodattamalla se 14 päivän kuluessa käymisellä tuotetun laktaasiliuoksen talteenoton ja puhdistamisen jälkeen.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymiliuos tehdään vähämikrobiseksi välittömästi talteenoton ja puhdistamisen jälkeen ja ennen steriilisuodatusta.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että steriilisuodatus suoritetaan edullisesti 5 päivän kuluessa talteenotosta ja puhdistamisesta.
4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymiliuokseen lisätään yksi tai useampi liuotin ja/tai apuaine.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisätään glyserolia.
6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymiliuokseen lisätään noin 50 paino-% glyserolia steriilisuodatuksen jälkeen.
7. Steriilisäiliö, t u n n e t t u siitä, että se sisältää jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukaisesti valmistetun mikrobivapaan laktaasiliuoksen.
8. Menetelmä alennetun laktoosipitoisuuden omaavan maidon tai maitotuotteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että lisätään ilman uudelleensuodatusta jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukaisella menetelmällä valmistettua mikrobivapaata laktaasiliuosta.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av en mikrobfri lösning av laktas, k ä n n e t e c k n a t därav, att laktaslösningen göres mikrobfri genom sterilfiltrering inom 14 dagar efter det att laktaslösningen, som framställts medelst förjäsning, tillvaratagits och renats.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymlösningen göres mikrobfattig omedelbart efter det att den tillvaratagits och renats och före sterilfiltrering.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att sterilfiltreringen företrädesvis utföres inom 5 dagar efter tillvaratagningen och reningen.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett eller flera lösningsmedel och/eller hjälpmedel tillsättes enzymlösningen.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att glycerol tillsättes.

6. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att cirka 50 vikt-% glycerol tillsättes enzymlösningen efter sterilfiltreringen.

7. Sterilbehållare, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller en mikrobfri laktaslösning, som framställts enligt något av patentkraven 1-6.

8. Förfarande för framställning av mjölk eller en mjölkprodukt med reducerad laktoshalt, k ä n n e t e c k n a t därav, att man utan omfiltrering tillsätter en mikrobfri laktaslösning, som framställts medelst förfarandet enligt något av patentkraven 1-6.