

PATENT-SCHRIFT 149 999

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

			Int. Cl. ³
(11) 149 999	(44) 12.08.81	3(51) A 23 C 19/032	C 12 N 9/99
(21) AP A 23 C / 220 285	(22) 08.04.80		
(31) 1456/79	(32) 09.04.79	(33) DK	

(71) siehe (73)

(72) Branner-Jørgensen, Sven, Dr.; Schneider, Palle, Dr.-Ing.;
Eigtved, Peter, Dr.-Ing., DK

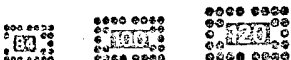
(73) NOVO INDUSTRI A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Internationales Patentbüro Berlin, 1020 Berlin,
Wallstraße 23/24

(54) Verfahren zur thermischen Destabilisierung von
mikrobiologischem Rennin

(57) Das destabilisierte Rennin wird angewandt zur Koagulation der Milch bei der Käseherstellung. Die dabei anfallende Molke wird verwendet zur Aufwertung von Milch, beispielsweise für Babynahrung. Ziel der Erfindung ist, die von der restlichen Renninaktivität stammenden Nachteile in pasteurisierter Molke zu überwinden. Erfindungsgemäß wird in der Weise verfahren, daß man das Rennin in einem wäßrigen Medium mit einem Oxydationsmittel aus der Gruppe der halogenhaltigen Verbindungen behandelt, wobei das Halogenatom eine Oxydationszahl von 0 bis 3 besitzt. Als Oxydationsmittel kann beispielsweise ein Hypochlorit verwendet werden. Die Behandlung erfolgt in einem wäßrigen Medium mit einem pH-Wert zwischen 5 und 9 bei einer Temperatur zwischen 0 und 30 °C bis zu einer Destabilisierung von mindestens 5 °C, vorzugsweise 7 bis 11 °C, bei einem Aktivitätsverlust von nicht mehr als 50%, vorzugsweise nicht mehr als 30%.

32 Seiten



Verfahren zur thermischen Destabilisierung von mikrobiologischen Rennin

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur thermischen Destabilisierung von mikrobiologischem Rennin. Rennin ist die Bezeichnung für ein milchkoagulierendes Enzymprodukt. Es wird verwendet zur Herstellung von Käse.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei der Herstellung von Käse wird die Milch koaguliert, um den Quark von der Molke zu trennen. Produkte, die Rennin bzw. Labferment enthalten, das ein aus Kälbermägen isoliertes milchkoagulierendes Enzym ist, wurden lange Zeit für diesen Zweck angewandt. In der Vergangenheit konnte der Bedarf an Rennin durch Labferment (aus Kälbermägen) gedeckt werden, aber in den letzten Jahren wurden verschiedene Austauschstoffe für Labferment entwickelt, wie insbesondere mikrobiologisches Rennin von *Mucor miehei* und *Mucor pusillus*. Rennin von *Mucor miehei* wird zur Käseherstellung bevorzugt aufgrund seiner geringen Kosten, seiner geringen unspezifischen proteolytischen Aktivität und seiner großen Ähnlichkeit mit Labferment bezüglich der Empfindlichkeit gegen Calciumionen.

Eine andere vorteilhafte Eigenschaft von Rennin von *Mucor miehei*, die zumindest teilweise seiner hohen thermischen Stabilität zugeschrieben wurde, ist seine ausgezeichnete Lagerbeständigkeit.

Ein Teil der pasteurisierten Molke wird als Zusatz zu Vollmilch angewandt, z. B. in Form von Molkenpulver, um eine angereicherte Milch herzustellen, z. B. als Babynahrung. Die pasteurisierte Molke, die bei der Herstellung von Käse mit Rennin von *Mucor miehei* anfällt, kann noch kleinere Mengen Renninaktivität enthalten aufgrund der hohen Stabilität von Rennin von *Mucor miehei*. Eine etwaige Restrenninaktivität im Molkenpulver ist unerwünscht, da eine Protein-koagulation nicht mehr auftreten soll. Eine solche könnte jedoch auftreten, wenn das Molkenpulver angewandt wird zur Herstellung von angereicherter Milch als Babynahrung. Die angereicherte Milch kann koagulieren, bevor sie in den Magen des Säuglings kommt, z. B. in der Flasche, wodurch der Milchfluß verstopft wird.

In Biochim. Biophys. Acta 271 (1972) 93 - 101 (W. S. Rickert, Structural and functional determinants of *Mucor miehei* protease, I. Modification of the NH_2 terminus and lysine residues by carbamylation) ist angegeben, daß Protease von *Mucor miehei* (die wirksame Komponente von Rennin von *Mucor miehei*) mit Kaliumcyanat carbamylt werden kann und daß das carbamylierte Produkt eine geringe thermische Destabilisierung zeigt. Praktische Versuche haben ergeben, daß die thermische Destabilisierung des carbamylierten Enzyms zu gering ist, um das oben erwähnte Problem der Renninaktivität in pasteurisierter Molke zu lösen. In der BE-Anmeldung 6/47048 (DE-OS 2 951 793) wird vorgeschlagen, das Enzym zur Destabilisierung zu acylieren.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der vorliegenden Erfindung, ein wirtschaftlich durchführbares Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe mikrobiologisches Rennin in einem solchen Ausmaß destabilisiert werden kann, daß die von der restlichen mikrobiologischen Renninaktivität stammenden Nachteile in pasteurisierter Molke wirtschaftlich überwunden werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Mittel und geeignete Reaktionsbedingungen für die Destabilisierung von Rennin aufzufinden.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur thermischen Destabilisierung von mikrobiologischem Rennin durch Behandlung in einem wäßrigen Medium mit einem Oxydationsmittel aus der Gruppe der halogenhaltigen Verbindungen, wobei das Halogen eine Oxydationszahl von 0 bis 3 besitzt.

Es hat sich gezeigt, daß mikrobiologisches Rennin, das erfindungsgemäß modifiziert worden ist, deutlich destabilisiert ist und daß die Destabilisierung ausreicht, um den Erfordernissen zu entsprechen, wie sie bei der Verwendung von Molke auftreten, ohne daß nachteilige Wirkungen die Lagerstabilität der Renninzubereitung auftreten. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß es erfindungsgemäß möglich ist, einen Destabilisierungsgrad (wie später näher erläutert) von mindestens 5 °C, vorzugsweise 7 bis 11 °C, zu erreichen, der in dem bevorzugten Bereich dazu führt, daß die thermische Stabilität des modifizierten Enzyms derjenigen von Kälberrennin (Labferment) entspricht, wobei die günstigen Eigen-

schaften des Kälberrennins kombiniert sind mit den günstigen Eigenschaften des mikrobiologischen Rennins.

Die Renninaktivität wird nach dem British Standard 3624, 1963 gemessen (Verfahren zur Bestimmung der Koagulationskraft von Rennin für Milch).

Da die Erfindung sich auf eine gesteuerte thermische Destabilisierung von mikrobiologischem Rennin bezieht, sind im folgenden die Verfahren zur Messung der thermischen Stabilität und zur Quantifizierung der Verringerung der thermischen Stabilität, d. h. der Destabilisierung, näher ausgeführt, wobei die Destabilisierung in °C angegeben ist.

Unter idealen Bedingungen kann ein Enzym bei einer entsprechenden (hohen) Temperatur so inaktiviert werden, daß die Restaktivität des Enzyms abnimmt als Funktion der Zeit entsprechend einer exponentiell abfallenden Kurve, d. h. mit einer gut definierten Halbwertszeit, die eine Funktion der Temperatur (°C) ist.

Die Halbwertszeit $T_{1/2}$ kann nach der folgenden Formel berechnet werden:

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

in der A_1 die Enzymaktivität nach dem Erhitzen auf eine bestimmte Temperatur für die Zeit t_1 bedeutet, während A_2 die Enzymaktivität nach dem Erhitzen auf die gleiche Temperatur für die Zeit t_2 angibt. Die Halbwertszeit ist kürzer, je

höher die Temperatur ist bei sonst gleicher Arbeitsweise. Bei vielen Enzymen wird die Halbwertszeit wesentlich verändert durch eine Veränderung des pH-Wertes der Enzymlösung und der Ionenstärke sowie das Vorhandensein bestimmter Salze. Außerdem kann die Halbwertszeit wesentlich verändert werden durch chemische Modifizierung des Enzyms. Wenn eine chemische Modifizierung eines bestimmten Enzyms zu einer thermischen Destabilisierung des Enzyms führt, ist der Grad der Destabilisierung $n^{\circ}\text{C}$, wenn das ursprüngliche (nichtmodifizierte) und das modifizierte Enzym die gleiche Halbwertszeit bei $N^{\circ}\text{C}$ und $(N-n)^{\circ}\text{C}$ besitzen.

Es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß die Destabilisierungswerte bis zu einem gewissen Grad nur Näherungswerte darstellen, da die Halbwertszeit immer nur ein Näherungswert ist. Alle Destabilisierungswerte dieser Beschreibung sind bei einem pH-Wert von 6,0 gemessen, da die Ergebnisse der Destabilisierungsmessungen pH-abhängig sind.

Normalerweise wird die erfindungsgemäße Behandlung von einem Aktivitätsverlust begleitet, und es hat sich gezeigt, daß aus wirtschaftlichen Gründen die Destabilisierung nicht weiter als bis zu einem Aktivitätsverlust von ungefähr 50 %, vorzugsweise ungefähr 30 %, und insbesondere weniger als 10 % durchgeführt werden sollte.

In einem typischen Fall scheint die Destabilisierung von 10°C mit einem Aktivitätsverlust, der auf weniger als 10 % begrenzt ist, ein annehmbarer Kompromiß zwischen den oben angegebenen, sich widersprechenden Faktoren zu sein.

Beispiele für geeignete Oxydationsmittel, die erfindungsgemäß angewandt werden können, sind ein Hypochlorit, z. B. Natriumhypochlorit, ein Hypobromit, z. B. Natriumhypobromit, freies Chlor, N-Chlorsuccinimid, Chloramin-T und Trichlorisocyanursäure.

Das Oxydationsmittel sollte in einer solchen Konzentration angewandt werden, daß die gewünschte Destabilisierung in einer annehmbaren Zeit erreicht wird, die irgendwo zwischen einigen Minuten bis zu 48 Stunden oder sogar darüber liegen kann, wenn die Reaktion nicht abgebrochen wird. Wenn die Konzentration an Oxydationsmittel zu gering ist, ist die Destabilisierung zu gering, und wenn die Konzentration an Oxydationsmittel zu hoch ist, wird der Aktivitätsverlust zu hoch. Die optimalen Konzentrationen entsprechen üblicherweise einem Gewichtsverhältnis zwischen Oxydationsmittel und Gesamtmenge an Protein in der Enzymzubereitung von ungefähr 3 bis 30 Teilen Oxydationsmittel auf 100 Teile Gesamtprotein. Wenn das mikrobiologische Rennin auf eine hohe Einheitsaktivität gereinigt worden ist, kann die Menge an Oxydationsmittel auf so geringe Mengen wie 1 g pro 100 g Gesamtprotein verringert werden.

Der pH-Wert, bei dem die Reaktion stattfindet, kann innerhalb weiter Grenzen variieren, d. h. zwischen einem pH-Wert von ungefähr 3 bis 10, wobei der bevorzugte Bereich hauptsächlich von dem angewandten Oxydationsmittel abhängt. So liegt der bevorzugte Bereich bei Verwendung von Hypochlorit als Oxydationsmittel bei 5 bis 9 und insbesondere bei 6 bis 8.

Die Reaktionstemperatur ist nicht kritisch, so lange sie auf Werten z. B. unterhalb ungefähr 30 °C gehalten wird, bei denen die Stabilität des Enzyms ausreichend ist. Die Stabilität des Enzyms kann jedoch verbessert werden durch Zugabe bekannter proteinstabilisierender Mittel, z. B. von NaCl in einer Menge von 5 bis 20 %, bezogen auf die Enzymzubereitung, oder Sorbit in den üblichen enzymstabilisierenden Mengen.

Der Reaktionsmechanismus (durch den die Destabilisierung eintritt) ist noch nicht vollständig aufgeklärt, und es ist auch noch nicht geklärt, ob das erhaltene destabilisierte Enzymmolekül Halogensubstituenten enthält oder nicht. Offensichtlich kann das Enzym wie alle Proteinmoleküle zahlreiche und unterschiedliche Reaktionen eingehen, z. B. Oxydations- und Chlorierungsreaktionen. Da im vorliegenden Falle die Destabilisierung von Interesse ist, sind Reaktionen, die zu einer Desaktivierung des Enzyms führen, unerwünscht, während solche Reaktionen, die zu einer thermischen Destabilisierung des Enzyms ohne Verringerung der Enzymaktivität führen, erwünscht sind.

Der Destabilisierungsgrad von mindestens 5 °C, vorzugsweise 7 bis 10 °C und der damit verbundene Aktivitätsverlust von nicht mehr als 30 %, vorzugsweise weniger als 10 %, werden für die praktische Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens als Grenzen angesehen. Die aktives Halogen enthaltenden Oxydationsmittel erfüllen diese Voraussetzung.

Freies Chlor disproportioniert, wenn es in ein wäßriges Medium eingeleitet wird, in Chlorid- und Hypochloritionen. Die oben angegebenen N-Chlorverbindungen wandeln sich entsprechend in Hypochloritionen um. Das bevorzugte Reagens ist Natriumhypochlorit, das bei einem pH-Wert von 5 bis 9, vorzugsweise 6 bis 8, angewandt wird.

Die in der BE-Anm. 6/47048 angegebene Acelierung führt zu einer Destabilisierung von ungefähr 3 °C. Die Oxydation mit Wasserstoffperoxid führt ebenfalls zu einer Destabilisierung.

Die direkte Behandlung des Enzyms mit einem aktives Halogen enthaltenden Reagens, z. B. Natriumhypochlorit, besitzt verschiedene Verfahrensvorteile gegenüber der Umsetzung mit Peroxid. Der Hauptvorteil liegt vermutlich darin, daß das Reagens mit aktivem Halogen vollständig in dem Reaktionsgemisch aufgebraucht werden kann, während die Reaktion mit Peroxid abgebrochen werden muß, z. B. durch Zugabe von Katalase.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Rennin mit einem Oxydationsmittel behandelt, das Chlor enthält. Außerdem ist es bevorzugt, die erfindungsgemäße Behandlung bis zu einem Destabilisierungsgrad von mindestens 5 °C, vorzugsweise 7 bis 11 °C, und einem Renninaktivitätsverlust von nicht mehr als 50 %, vorzugsweise nicht mehr als 30 %, durchzuführen. Günstig ist die Verwendung eines Oxydationsmittels, das ein Halogen mit einer Oxydationszahl von 0 bis 1 enthält, insbesondere von Hypochlorit. Ferner ist es besonders günstig, das erfindungsgemäße Verfahren auf Rennin anzuwenden, das von *Mucor miehei*

gebildet worden ist. Das Gewichtsverhältnis von Oxydationsmittel zu Gesamtprotein in der Enzymzubereitung liegt günstigerweise zwischen 0,01 und 1, vorzugsweise zwischen 0,03 und 0,3. Der pH-Wert des wäßrigen Mediums beträgt günstigerweise 5 bis 9, und die Temperatur liegt vorteilhafterweise bei 0 bis 30 °C.

Die Erfindung bezieht sich auch auf das erfindungsgemäß hergestellte bzw. modifizierte mikrobiologische Rennin sowie auf die Anwendung dieses Rennins zur Koagulation von Milch bei der Käseherstellung. Die bei diesem Käseherstellungsverfahren anfallende Molke kann nach Pasteurisierung als proteinhaltiger Zusatz zu Nahrungsmitteln, insbesondere Baby-nahrung, angewandt werden.

In der Praxis hat es sich gezeigt, daß die Anwendung von destabilisiertem Rennin zur Herstellung von haltbaren Käsesorten besonders günstig ist.

In zwei parallelen Behältern zur Käseherstellung mit einem Fassungsvermögen von 150 ml wurde jeweils ein Käse mit Hilfe von Rennin von *Mucor miehei* entsprechend Beispiel 16 und mit Hilfe von nichtmodifiziertem Rennin von *Mucor miehei* hergestellt. Es wurden 2mal 6 Versuche durchgeführt. Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, daß das erfindungsgemäße Rennin im Stande war, übliche dänische Käsearten, wie Samsø und Danbo, mit mindestens ebenso guten Eigenschaften zu erzeugen wie das nichtmodifizierte Rennin.

Das erfindungsgemäße Destabilisierungsverfahren kann und wird vorzugsweise durchgeführt als letzte Stufe bei der Herstellung von mikrobiologischem Rennin. Tatsächlich kann (handelsüblich) reines mikrobiologisches Rennin oder Renninkonzentrat für das erfindungsgemäße Verfahren angewandt werden. So wird z. B. der pH-Wert einer mikrobiologischen Renninlösung, die sonst für die üblichen Aufbereitungsstufen vor der Abgabe fertig ist, auf einen vorbestimmten Bereich für die Behandlung (z. B. pH 7) eingestellt und die Lösung dann unter Rühren bei Raumtemperatur mit einer Lösung des Oxydationsmittels vermischt, wobei die Menge an Oxydationsmittel in dem oben erwähnten Bereich von 3 bis 30 Teilen (beispielsweise 20 Teile Natriumhypochlorit) auf 100 Teile Gesamtprotein in der mikrobiologischen Renninlösung liegt. Das Gemisch wird dann einige Stunden stehen gelassen, bis der erwünschte Destabilisierungsgrad erreicht ist, z. B. 2 bis 3 Stunden. Die Reaktion kann abgebrochen werden durch Zugabe von Aktivkohle oder einem Reduktionsmittel wie Natriumsulfit, nach einer entsprechenden Zeit. Das destabilisierte Enzymprodukt kann dann den üblichen Aufarbeitungsschritten, z. B. Filtration, Einstellung von pH-Wert und Enzymaktivität auf Standardstärken usw., unterworfen werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Als Ausgangsmaterial wurde ein Rennin-Konzentrat angewandt, das hergestellt worden war entsprechend "2. Pilot plant experiment" in der GB-PS 1 108 287, wobei nur die Kultur-

flüssigkeit auf eine Aktivität entsprechend einer 1%igen Lösung des reinen Enzyms konzentriert worden war (Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Bd. 37, Nr. 14, 301 - 325) und 18 % NaCl zu dem rohen Konzentrat zugegeben worden waren (der Einfachheit halber im folgenden als "Rennilase 46" bezeichnet).

Beispiel 1

Zwei Versuchsreihen von je 3mal 25 ml eines Gemisches aus 12,5 ml Rennilase 46 und 12,5 ml Wasser wurden durch Zugabe von 1 n NaOH auf einen pH-Wert von 7,0, 8,0 bzw. 9,0 eingestellt und zu jedem Gemische 0,4 ml einer 2,25-m-Lösung von NaClO zugegeben, wobei der pH-Wert auf den oben angegebenen Werten konstant gehalten wurde.

Die erste Reihe aus drei Proben wurde über Nacht (ungefähr 18 Stunden) in den Kühlschrank gestellt. Die zweite Reihe aus drei Proben wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Abfallen des pH-Wertes wurde nach dieser Zeit gemessen und notiert. Dann wurden die Proben durch Vermischen von 0,2 ml Probe mit 50 ml Wasser verdünnt und gleichzeitig der pH-Wert mit Natriumacetat/Essigsäure auf 6,0 eingestellt.

Das Absinken des pH-Wertes und die Restaktivitäten nach Beendigung der Reaktion zwischen dem Rennin und dem Natriumhypochlorit sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Anfangs-pH	pH nach		Restaktivität (%)	
	2 h	18 h	nach 2 h	nach 18 h
7,0	6,9	6,9	86,3	83,1
8,0	7,6	7,6	86,1	81,7
9,0	8,2	8,2	78,4	75,4

Jetzt wurden die verdünnten Proben 30 Minuten bei einem pH von 6,0 auf 55 °C erwärmt, und anschließend wurde die Restaktivität gemessen. Man erhielt die folgenden Werte:

Anfangs-pH	Restaktivität (%) nach 30 min bei 55 °C	
	2-h-Probe	18-h-Probe
7	16,3	4,2
8	16,3	4,3
9	32,3	14,6
Vergleich	98,7	

Die oben angegebenen Restaktivitäten entsprechen den folgenden Werten für die Halbwertszeit und die Destabilisierung.

Anfangs-pH	$T_{1/2}$ (min); 30 min		Destabilisierung	
	55 °C, pH 6,0		°C	
	2-h-Probe	18-h-Probe	2-h-Probe	18-h-Probe
7	11,5	6,5	11	12
8	11,5	6,6	11	12
9	18,4	10,8	10	11
Vergleich	-	-	-	-

Beispiel 2

Der pH-Wert von drei 150 ml Proben Rennilase 46 wurde auf 5,0, 6,0 bzw. 7,0 eingestellt. Jede dieser drei Proben wurde in drei Teile aufgeteilt, zu denen jeweils 0,8, 1,2 bzw. 1,6 ml einer handelsüblichen 2,25m Lösung von NaOCl gegeben wurden, und der pH-Wert wurde konstant auf den angegebenen Werten gehalten.

Diese 9 Proben wurden dann 18 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur (22 °C) stehen gelassen und anschließend von jeder der neun Proben 10 ml entnommen. Zu diesen 10 ml Proben wurden jeweils 0,4, 0,6 bzw. 0,8 ml 1 m Na_2SO_3 -Lösung gegeben, je nach dem, wieviel NaOCl zu der jeweiligen Probe zugesetzt worden war, um überschüssiges Hypochlorit, soweit vorhanden, zu zerstören.

0,2 ml der so behandelten Proben wurden mit 50 ml Wasser verdünnt und der pH-Wert mit Essigsäure/Natriumacetat auf 6,0 eingestellt. Diese verdünnten Proben wurden 30 Minuten auf 55 °C erwärmt. Die Aktivitätsausbeute, die Restaktivität nach der Wärmebehandlung und die berechnete Halbwertszeit sowie die Destabilisierung gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

pH	zuge- setz- tes NaOCl (ml)	Aktivitäts- ausbeute (%)	Restakti- vität (%) 30 min bei 55 °C, pH 6,0	T _{1/2} (min) 30 min bei 55 °C pH 6,0	Destabi- lisie- rung (°C)
5,0	0,8	99,4	59,4	39,9	8
	1,2	95,3	57,6	37,7	9
	1,6	84,8	56,1	36,0	9
6,0	0,8	100	53,9	33,6	9
	1,2	91,6	50,5	30,4	9
	1,6	81,4	47,9	28,3	9
7,0	0,8	98,1	49,1	29,2	9
	1,2	87,7	42,7	24,4	10
	1,6	78,3	35,7	20,2	10

Beispiel 3

600 ml Rennilase 46 wurden bei einer Temperatur von ungefähr 10 °C mit Hilfe von 4 n NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Diese Probe wurde in 6 Teile von jeweils 100 ml aufgeteilt. Zu diesen 6 Proben wurden jeweils 0, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 bzw. 2,4 ml einer handelsüblichen 2,25m NaOCl-Lösung gegeben und der pH-Wert jeweils auf 7 eingestellt.

Nach ungefähr 15 Stunden bei ungefähr 5 °C wurden 2 ml 1m Na₂SO₃ zugegeben, um überschüssiges Hypochlorit, soweit vorhanden, zu zerstören. Durch die Sulfitzugabe wurde die Stabilität des Rennins nicht verändert. Die Aktivitätsänderung wurde gemessen. Es wurden auch 5 ml der Proben 10fach in 0,1m Acetatpuffer, pH 6,0, verdünnt und anschließend 5 ml der verdünnten Proben 15 Minuten auf 60 °C erwärmt. Die Restaktivität nach der Wärmebehandlung wurde bestimmt und die Halbwertszeit und die Destabilisierung berechnet. Man erhielt die folgenden Ergebnisse.

zugesezt- tes 2,25m NaOCl (ml)	Änderung der Gesamt- aktivität (%)	Restaktivi- tät nach Wärmebe- handlung (%)	T _{1/2} (min) 15 min bei 60 °C, pH 6,0	Destabili- sierung (°C)
0	-	99	-	-
0,8	+ 0,6	35	9,9	9
1,2	0	19	6,3	10
1,6	- 4,4	14	5,3	10
2,0	- 8,5	10	4,5	10
2,4	-14,9	7	3,9	11

Beispiel 4

In diesem Beispiel wurde nicht Rennilase 46 verwendet, sondern ein entsprechendes Produkt, zu dem kein NaCl zugegeben worden war.

Aus dem oben angegebenen Ausgangsmaterial wurden 5 Proben von 200 g mit 0, 5, 10, 15 bzw. 20 % NaCl hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 4n NaOH auf 6,0 eingestellt.

Von jeder der oben angegebenen 5 200 g Proben wurden 100 ml entnommen. Zu jeder dieser fünf Proben wurde 1 ml einer handelsüblichen 2,25n NaOCl-Lösung gegeben, wobei die Temperatur zwischen 5 und 10 °C gehalten wurde. Der pH-Wert aller fünf Proben wurde dann mit 4n NaOH auf 7,0 eingestellt und die Proben bei ungefähr 5 °C stehengelassen.

Nach ungefähr 20 Stunden langem Stehen wurde die Aktivitätsänderung bestimmt. Ferner wurden 5 ml dieser Proben auf das 10fache mit 0,1m Acetatpuffer, pH 6,0, verdünnt und anschließend 5 ml der verdünnten Proben 15 Minuten auf 60 °C erwärmt. Die Restaktivität wurde bestimmt. Eine nichtbehandelte Probe wurde als Blindprobe durchgeführt.

Die Versuchsparameter und die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben.

zugegebenes NaCl (%)	zugegebenes 2,25m NaOCl (ml)	Änderung der Gesamaktivität (%)	Restaktivität nach der Wärmebehandlung (%)	T _{1/2} (min) 15 min bei 60 °C pH 6,0	Destabilisierung (°C)
0	0	-	98	-	-
0	1	- 4,2	31	8,9	9
5	1	+ 7,8	32	9,1	8
10	1	+ 4,0	40	11,3	8
15	1	+ 6,8	46	13,4	8
20	1	+ 2,4	51	15,4	8

Beispiel 5

Es wurden 10 Versuchsreihen durchgeführt bei unterschiedlichen pH-Werten, nämlich 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 und 11,0. Jede Reihe bestand aus drei Proben, die hergestellt worden waren durch Verdünnen von jeweils 12,5 ml Rennilase 46 mit einem gleichen Volumen Wasser. Zu der ersten Probe jeder Reihe wurden 75 µl, zu der zweiten 150 µl und zu der dritten 300 µl handelsübliche 2,25m Natriumhypochloritlösung gegeben, entsprechend (ungefähr)

4, 8, bzw. 16 g Natriumhypochlorit auf 100 g Gesamtprotein in der Probe. Der pH-Wert der 10 Reihen wurde konstant auf den angegebenen Werten gehalten. Die Reaktionstemperatur war für alle Proben gleich (ungefähr 5 °C).

Nach einer Reaktionszeit von ungefähr 114, 66 bzw. 90 Stunden für die erste, zweite bzw. dritte Probe jeder Reihe wurden alle Proben auf 50 ml ergänzt. Proben zur Analyse wurden hergestellt durch entsprechende Verdünnung (ungefähr 1 : 125), wobei der pH-Wert gleichzeitig mit Hilfe von Essigsäure/Natriumacetatlösung auf 6,0 eingestellt wurde.

Diese Proben wurden dann 30 Minuten auf 55 °C erwärmt. Die Aktivitätsausbeute, Restaktivität nach der Wärmebehandlung, berechnete Halbwertszeit und Destabilisierung sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Anfangs- pH-Wert	zugesetz- tes NaClO (μ l 25ml Probe)	End- pH-Wert	Aktivi- tätsaus- beute (%)	Rest- akti- vität (%)	T _{1/2} (min)	Destabi- lisie- rung (°C)
2,5	75	2,52	93,0	77,3	80,8	6
	150	2,75	80,5	71,6	62,2	7
	300	2,50	16,2	40,7	23,1	9
3	75	3,00	101,3	76,9	79,2	6
	150	3,15	97,6	60,5	41,4	8
	300	3,00	32,4	70,0	22,7	9
4	75	3,96	106,1	71,8	62,8	7
	150	4,05	102,4	64,2	46,9	8
	300	3,94	69,8	41,3	23,5	9

Anfangs- pH-Wert	zugesetz- tes NaClO (μ l 25ml Probe)	End- pH-Wert	Aktivi- tätsaus- beute (%)	Rest- akti- vität (%)	T _{1/2} (min)	Destabi- lisie- rung (°C)
5	75	4,95	104,4	74,5	70,6	7
	150	4,99	99,4	62,2	43,8	8
	300	4,80	71,1	45,1	26,1	10
6	75	5,86	101,7	59,4	39,9	8
	150	5,98	94,8	40,8	23,2	9
	300	5,66	61,5	8,6	8,48	11
7	75	6,61	96,3	39,5	22,4	9
	150	6,64	90,2	7,1	7,86	11
	300	6,51	49,2	4,0	6,46	11
8	75	7,40	94,3	48,3	28,6	8
	150	7,26	87,1	6,4	7,57	11
	300	-	-	-	-	-
9	75	8,02	90,4	68,2	54,3	7
	150	7,79	77,7	17,5	11,9	10
	300	7,34	47,3	9,3 ⁺	2,92 ⁺	13
10	75	8,34	81,2	78,6	86,4	6
	150	8,23	68,5	34,0	19,3	9
	300	7,83	44,4	9,3 ⁺	2,92 ⁺	13
11	75	10,34	57,2	93,5	30,9	4
	150	10,02	42,2	74,4	70,3	7
	300	9,80	9,9	-	-	-

⁺ 10 min Wärmebehandlung

Diese Werte zeigen, daß die folgenden Bedingungen für die Destabilisierung mit Natriumhypochlorit optimal sind:

pH-Bereich 6 bis 8

Menge an Natriumhypochlorit: 150 μ l einer 2,55m Lösung pro Probe, entsprechend (ungefähr) 8 g Natriumhypochlorit pro 100 g Gesamtprotein.

Beispiel 6

Es wurden zwei Proben hergestellt durch Vermischen von 25 ml Rennilase 46 mit 20 g Eiswasser und der pH-Wert mit Hilfe von 4n NaOH auf 7,0 eingestellt. Zu diesen beiden Proben wurden 33 bzw. 66 mg N-Chlorsuccinimid, jeweils in 5 ml Eiswasser, zugegeben, wobei der pH-Wert gleichzeitig auf 7,0 eingestellt wurde.

Zwei Stunden später wurden 0,2 ml der Proben mit 50 ml Wasser verdünnt, wobei gleichzeitig der pH-Wert mit Hilfe von Natriumacetat/Essigsäure auf 6,0 eingestellt wurde.

Die Restaktivität nach der Umsetzung von Rennin mit N-Chlorsuccinimid betrug:

zugesetztes

<u>N-Chlorsuccinimid (%)</u>	<u>Restaktivität (%)</u>
33	99,0
66	96,5

Auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 wurde eine Wärmebehandlung 30 Minuten bei 55 °C, pH 6,0, durchgeführt. Anschließend wurde die Restaktivität bestimmt und die Halbwertszeit und Destabilisierung berechnet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben:

zugesetztes N-Chlorsuccin- imid (mg)	Restaktivität (%), 30 min bei 55 °C pH 6,0	T _{1/2} (min) 30 min bei 55 °C pH 6,0	Destabilisierung (°C)
33	41,5	23,6	10
66	26,4	15,6	10

Beispiel 7

Eine ungefähr 2m Lösung von NaOBr wurde hergestellt durch Zutropfen von 3 g Br₂ zu 10 ml 4n NaOH unter Rühren und Kühlen im Eis-Wasser-Bad.

25 ml Rennilase 46 wurden mit 25 ml Wasser vermischt und der pH-Wert mit 1n NaOH auf 7,5 eingestellt. Zu 25 ml dieser Lösung wurden 0,5 ml der wie oben hergestellten Natriumhypobromit-Lösung in ungefähr 1 Stunde zugegeben, wobei der pH-Wert zwischen 7,3 und 7,8 gehalten wurde durch Zugabe von 1n HCl.

Ungefähr 30 Minuten später wurden der Aktivitätsverlust und die Thermostabilität bestimmt. Es zeigte sich, daß der Aktivitätsverlust ungefähr 20 % betrug und die Restaktivität nach 20 Minuten langer Behandlung bei pH 6,0 und 60 °C 14 % betrug, entsprechend einer Halbwertszeit von ungefähr 7 Minuten oder einer Destabilisierung von ungefähr 8 °C.

Beispiel 8

50 ml Rennilase 46 wurden mit 50 ml Wasser verdünnt. Das Gemisch wurde im Eisbad gekühlt und der pH-Wert mit 1n NaOH auf 7,0 eingestellt. Dann wurden ungefähr 0,1 g freies Chlor eingeleitet, wodurch der pH-Wert auf ungefähr 3,8 sank und die Flüssigkeit trüb und heller wurde. Das Reaktionsgemisch wurde ungefähr 10 Minuten stehen gelassen und dann 4 ml 1m Na₂SO₃-Lösung zugegeben, um überschüssiges Chlor zu entfernen.

Vor und nach der Chlorzugabe wurden 0,2 ml Proben mit 50 ml Wasser verdünnt und der pH-Wert mit Natriumacetat/Essigsäure auf 6,0 eingestellt. Der bei der Reaktion zwischen Rennin und Chlor eintretende Aktivitätsverlust betrug 21 %.

Nach 30 Minuten langer Behandlung des mit Chlor behandelten Rennins bei 55 °C wurde eine Restaktivität von 63 % gefunden. Das entspricht einer Halbwertszeit von ungefähr 45 Minuten oder einer Destabilisierung von ungefähr 8 °C.

Beispiel 9

Es wurden 2 Proben durch Vermischen von 25 ml Rennilase 46 und 25 g Eiswasser hergestellt und der pH mit 4n NaOH auf 7,0 eingestellt. Zu diesen beiden Gemischen wurden 60 bzw. 120 mg Trichlorisocyanursäure gegeben und gleichzeitig der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Ungefähr 4 Stunden später wurden 0,2 ml der oben angegebenen Gemische mit 50 ml Wasser verdünnt und gleichzeitig der pH-Wert mit Natriumacetat/Essigsäure auf 6,0 eingestellt. Die so verdünnten Proben wurden 30 Minuten bei 55 °C behandelt.

Die Aktivitätsausbeuten, die Restaktivitäten nach der Wärmebehandlung und die berechneten Halbwertszeiten und Destabilisierungen gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

zugeetzte Trichloriso- cyanursäure (mg)	Aktivitäts- ausbeute (%)	T _{1/2} (min 30 min bei 55 °C, pH 6,0	Destabili- sierung (°C)
60	93,0	35	9
120	81,5	16	10

Beispiel 10

Es wurden zwei Anteile von je 25 ml Rennilase 46 mit je 20 g Eiswasser verdünnt und der pH-Wert mit 4n NaOH auf 7,0 eingestellt. Dann wurden 70 bzw. 140 mg Chloramin-T in 5 ml Eiswasser zu den beiden Proben gegeben und gleichzeitig der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Ungefähr 2 Stunden später wurden 0,2 ml der oben angegebenen Proben mit 50 ml Wasser verdünnt, wobei der pH-Wert gleichzeitig mit Natriumacetat/Essigsäure auf 6,0 eingestellt wurde. Die so erhaltenen Proben wurden 30 Minuten auf 55 °C erwärmt. Die Aktivitätsausbeuten und Restaktivitäten nach der Wärmebehandlung, die berechneten Halbwertszeiten und Destabilisierungen gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

zugewetztes Chloramin-T (mg)	Aktivitäts- ausbeute (%)	T _{1/2} (min) 30 min bei 55 °C, pH 6,0	Destabili- sierung (°C)
70	96,5	19,2	10
140	77,9	8,5	12

Beispiel 11

Der pH-Wert von 25 ml Rennilase 46 wurde mit 1n NaOH auf 10,0 eingestellt.

Das Gemisch wurde in Eiswasser gekühlt und einzelne Anteile von 2 ml einer Lösung, enthaltend 0,05m J₂ in 0,25m KJ, wurden zu der oben angegebenen Rennilaselösung gegeben, wobei gleichzeitig der pH-Wert mit 1n NaOH nach jeder Zugabe von 2 ml des Jodreagens auf 10 eingestellt wurde. Es wurde eine Vergleichsprobe entnommen sowie eine Probe von 0,5 ml vor jeder neuen Zugabe von 2 ml Jodreagens.

Zu Analysezzwecken wurden die 0,5 ml Proben verdünnt und der pH-Wert mit Essigsäure/Natriumacetat auf 6,0 eingestellt. Dann wurden die Proben 30 Minuten auf 60 °C erwärmt.

Die Versuchsergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

zugesezte Lösung von J_2 in KJ (ml)	Aktivitäts- ausbeute (%)	Restaktivi- tät, 60 °C, 30 min (%)	$T_{1/2}$ (min) 30 min, 60°C pH 6,0	Destabili- sierung (°C)
0	100	88	163	0
2	100	88	163	0
4	96	90	197	0
6	91	88	163	0
8	76	85	128	1
10	63	71	61	3

Beispiel 12

Rennilase 46 mit und ohne zugesetztes NaCl wurde auf das 3fache verdünnt. 20 ml der so verdünnten Rennilase 46 wurden auf einen pH-Wert von 8,5 gebracht und auf 0 °C gekühlt, woraufhin 0,7 ml einer Lösung von 0,05m J_2 in 0,25m KJ zugegeben wurden. Ungefähr 15 Minuten später wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0,1m $NaHSO_3$ auf 6 eingestellt.

Für Analysezwecke wurde diese Probe verdünnt und gleichzeitig der pH-Wert mit Essigsäure/Natriumacetat auf 6,0 eingestellt. Dann wurde die Probe 30 Minuten auf 60 °C erwärmt.

Die Aktivitätsausbeute betrug 42,6 %. Die Restaktivität nach der Wärmebehandlung betrug 35 %.

Die berechnete Halbwertszeit bei 60 °C und pH 6 betrug 20 Minuten.

Das entspricht einer Destabilisierung von ungefähr 5 °C, da eine Vergleichsprobe die gleiche Halbwertszeit von ungefähr 20 Minuten bei 65 °C zeigte.

Beispiel 13

3 g Protease von *Mucor pusillus* (Noury, 1 : 220 000) wurden in 30 ml 10%iger NaCl Lösung gelöst und der pH-Wert bei 5 bis 10 °C auf 6,5 eingestellt. 3mal 50 µl 15%ige NaOCl Lösung wurden in Intervallen von 30 Minuten zugegeben. Nach 3 Stunden langem Rühren wurde das Gemisch 16 Stunden bei 4 °C stehen gelassen und der pH-Wert anschließend auf 5,0 eingestellt. Es wurden Proben zur Bestimmung der Aktivität und Thermostabilität entnommen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Reaktionszeit der Probe	Aktivitäts- ausbeute (%)	Halbwertszeit (min)		Destabili- sierung (°C)
		bei pH 6,0 0 - 30 min bei 50 °C	bei 55 °C	
Vergleich	100	144 - 155	18 - 31	-
24 h	84 - 91	26 - 22	5 - 11	5

Beispiel 14

In diesem Beispiel wurde anstelle von Rennilase 46 ein ähnliches Produkt verwendet, bei dem anstelle von 18 % NaCl nur 6 % NaCl zugesetzt worden waren.

1 Liter dieses Ausgangsmaterials wurde in 4 Proben von jeweils 250 ml aufgeteilt. Die Temperatur wurde auf 5 bis 10 °C gehalten und der pH-Wert von 3 Proben mit 4n NaOH auf 6,5 eingestellt. Ferner wurden 1, 1,2 bzw. 1,4 Vol.-% einer Lösung von 13,5 Gew.-% NaOCl zu den 3 Proben gegeben und anschließend der pH-Wert mit 4n NaOH auf 7,5 eingestellt und die Proben bei ungefähr 5 °C inkubiert.

Nach einer Reaktionszeit von 3, 27 bzw. 53 Stunden wurden 50 ml der mit Hypochlorit behandelten Proben entnommen und zu jeder dieser 50 ml Proben 250 mg (0,5 % Gew./Vol) Aktivkohle (Carboraffin BGN) gegeben. Am Tag nach der Zugabe von Aktivkohle wurden die Proben filtriert und auf die Stabilität und Renninaktivität untersucht (1. Bestimmung). Die Proben wurden 9 Tage nach Zugabe des Hypochlorits auf 5 °C gehalten und anschließend erneut die Stabilität und Renninaktivität (Aktivitätsausbeute bzw. Endaktivität) bestimmt (2. Bestimmung). Nach weiteren 4 Tagen bei ungefähr 5 °C und 2 Tagen bei ungefähr 25 °C wurde die Renninaktivität erneut bestimmt und die Aktivitätsausbeute berechnet (3. Bestimmung).

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt, aus denen hervorgeht, daß keine deutliche Änderung der Destabilisierung oder Aktivitätsausbeute auftritt, wenn die Reaktionszeit von 3 auf 53 Stunden verlängert wird.

Tabelle 1

zugesetztes Hypochlorit (Vol.-%)	Bestimmung	Destabilisierung (°C) Reaktionszeit		
		3 h	27 h	53 h
1	1.	9,2	9,4	9,1
	2.	9,3	9,4	9,3
1,2	1.	10,0	10,1	9,8
	2.	10,0	10,1	10,1
1,4	1.	10,6	10,7	10,5
	2.	10,6	10,6	10,7

Tabelle 2

zugesetztes Hypochlorit (Vol.-%)	Bestimmung	Aktivitätsausbeute (%) Reaktionszeit		
		3 h	27 h	53 h
1	1.	96	99	97
	2.	97	99	95
	3.	97	97	98
1,2	1.	90	93	92
	2.	94	90	92
	3.	92	94	94
1,4	1.	89	91	90
	2.	92	89	91
	3.	91	89	88

Beispiel 15

Fünf 25-ml-Proben von Rennilase 46 wurden auf einen pH-Wert von 2, 2,5, 3, 3,5 bzw. 6,0 eingestellt.

Zu jeder dieser Proben wurden 0,04 g Natriumchlorit gegeben, wobei der pH-Wert jeweils konstant auf dem angegebenen Wert gehalten wurde.

Die Proben wurden 6 Tage bei 5 °C stehen gelassen und anschließend die Restaktivität und die Thermostabilität bei 55 °C und pH 6,0 untersucht.

Anfangs pH	Restaktivität (%)	Halbwertszeit (min) (nach 30 min langer Wärmebehandlung)	Destabili- sierung (°C)
2,0	23	122	5,5
2,5	73	63	6,7
3,0	90	53	7,0
3,5	97	48	7,3
6,0	94	49	7,2

Beispiel 16

In diesem Beispiel wurde anstelle von Rennilase 46 ein ähnliches Enzymprodukt verwandt, das in zwei Punkten modifiziert war: 1. Die Kulturbrühe war auf eine Aktivität entsprechend einer Lösung von ungefähr 1,6 % reinem Enzym konzentriert (im Gegensatz zu 1 % reinem Enzym), und 2. waren zu dem Rohkonzentrat 9 % NaCl (anstelle von 18 % NaCl) zugesetzt worden.

Auf diese Weise wurden in einer Technikumsanlage 5952 kg modifizierte Rennilase 46 hergestellt.

Der pH-Wert wurde mit 34 % NaOH bei 9 °C auf 6,4 eingestellt und 109 kg einer Lösung von 12,5 Gew.-% NaOCl zugegeben. Während dieser Behandlung stieg der pH-Wert auf 8,0 und wurde mit 37%iger HCl auf 7,4 eingestellt.

Nach 18 Stunden bei 9 bis 5 °C war der pH-Wert auf 6,9 gefallen. Dann wurde 1 % Aktivkohle bei 4 bis 5 °C zugegeben. 26 Stunden später wurde das Gemisch mit Hilfe einer Filterpresse filtriert und die Destabilisierung erneut gemessen. Schließlich wurde die überstehende Flüssigkeit unter vermindertem Druck bei 30 °C und einem pH-Wert von 6,7 eingeengt und NaCl auf eine Gesamtmenge von 18 % zugesetzt.

Es zeigte sich, daß die Halbwertszeit des Endproduktes 11 Minuten betrug und die Destabilisierung 10 °C.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur thermischen Destabilisierung von mikrobiologischem Rennin, gekennzeichnet dadurch, daß man das Rennin in einem wäßrigen Medium mit einem Oxydationsmittel aus der Gruppe der halogenhaltigen Verbindungen behandelt, wobei das Halogenatom eine Oxydationszahl von 0 bis 3 besitzt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Halogen Chlor ist.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß man die Behandlung bis zu einer Destabilisierung von mindestens 5 °C, vorzugsweise 7 bis 11 °C, bei einem Aktivitätsverlust von nicht mehr als 50 %, vorzugsweise nicht mehr als 30 %, durchführt.
4. Verfahren nach den Punkten 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß man als Oxydationsmittel eine halogenhaltige Verbindung verwendet, wobei das Halogenatom eine Oxydationszahl von 0 oder 1 besitzt.
5. Verfahren nach den Punkten 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, daß man als Oxydationsmittel ein Hypochlorit verwendet.
6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß man als mikrobiologisches Rennin ein solches von *Mucor miehei* verwendet.

220285 - 31 -

7. Verfahren nach den Punkten 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß man ein Gewichtsverhältnis in dem Reaktionsgemisch von Oxydationsmittel zur Gesamtmenge an Protein in der Enzymzubereitung zwischen 0,01 und 1, vorzugsweise zwischen 0,03 und 0,3, anwendet.
8. Verfahren nach den Punkten 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß man in einem wäßrigen Medium mit einem pH-Wert zwischen 5 und 9 arbeitet.
9. Verfahren nach den Punkten 1 bis 8, gekennzeichnet dadurch, daß man in einem wäßrigen Medium bei einer Temperatur zwischen 0 und 30° C arbeitet.
10. Verfahren zur Käseherstellung, gekennzeichnet dadurch, daß man das destabilisierte mikrobiologische Rennin, welches mit Hilfe eines Verfahrens nach einem der Punkte 1 bis 9 hergestellt wurde, zur Koagulation der Milch verwendet.