

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 153229 B

(21) Patentansøgning nr.: 1222/80

(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 9/00

(22) Indleveringsdag: 21 mar 1980

C 12 N 9/64

(41) Alm. tilgængelig: 10 okt 1980

(44) Fremlagt: 27 jun 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 09 apr 1979 DK 1456/79

(71) Ansøger: *NOVO INDUSTRI A/S; Patent- og Varemærkeafdelingen; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Sven *Branner-Jørgensen; DK, Palle *Schneider; DK, Peter *Eigtved; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Fremgangsmåde til termisk destabilisering af mikrobiel osteløbe**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1222-80

Den termiske stabilitet af mikrobiel osteløbe kan nedsættes ved behandling af enzymet i vandigt medium med oxidationsmidler indeholdende aktivt halogen. Den således modificerede, mikrobielle osteløbe kan anvendes til ostefremstilling i sådanne tilfælde, hvor man ønsker, at der ikke skal foreligge nogen osteløbeaktivitet i pasteuriseret valle. Foretrukne oxidationsmidler til den termiske destabilisering er hypochloritter.

DK 153229 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til termisk destabilisering af mikrobiel osteløbe. Osteløbe er en betegnelse for et mælkekoagulerende enzymprodukt.

Ved fremstilling af ost koaguleres mælken, hvorefter
5 ostemassen separeres fra vallen. Produkter, der indeholder rennin, som er et mælkekoagulerende enzym, der er isoleret fra kalvemaver, har i lang tid været anvendt til dette formål. Hidtil har behovet for osteløbe kunnet tilfredsstilles med kalve-osteløbe, men i de senere år har man udviklet adskillige
10 erstatninger for kalve-osteløbe, herunder især de mikrobielle osteløber fra *Mucor miehei* og *Mucor pusillus*. Osteløbe fra *Mucor miehei* foretrækkes ved ostefabrikationen på grund af dens lave pris, dens lave uspecifikke proteolytiske aktivitet og dens store lighed med rennin hvad angår calciumionfølsomhed. En anden
15 fordelagtig egenskab af *Mucor miehei* osteløbe er dennes fremragende opbevaringsstabilitet, der i det mindste delvist menes at hidrøre fra dens høje termiske stabilitet.

Pasteuriseret valle kan blandt andet anvendes som additiv til sødmælk, f.eks. i form af vallepulver, til fremstilling af
20 beriget mælk, f.eks. som næringsmiddel til spædbørn. Den valle, der fremkommer som biprodukt fra ostefremstillingen under anvendelse af *Mucor miehei* osteløbe, kan efter pasteuriseringen stadigvæk indeholde en mindre andel af osteløbeaktivitet, hidrørende fra den høje termiske stabilitet af *Mucor miehei* osteløbe. Enhver residual oste-
25 løbeaktivitet i vallepulveret er uønsket, fordi proteinkoagulation ikke længere er ønsket. En sådan kunne finde sted, hvis vallepulveret anvendes til fremstilling af beriget mælk som næringsmiddel til spædbørn. Den berigede mælk kan koagulere, før den når spædbarnets mave, f.eks. i sutteflasken, hvorved der frembringes en forstoppelse, som
30 forhindrer, at mælken kan komme ud af flasken.

Det beskrives i 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), at *Mucor miehei* protease (den aktive komponent af
35 *Mucor miehei* osteløbe) kan carbamyleres med kaliumcyanat, og at det carbamylerede produkt udviser en mindre grad af termisk destabilsere-

ring. Praktiske forsøg har vist, at den termiske destabilisering af det carbamylerede enzym er for lille til at løse det ovenfor angivne problem omfattende osteløbeaktivitet i pasteuriseret valle. En anden metode er beskrevet i belgisk patentansøgning nr. 6/47048, hvori
5 det foreslås, at man acylerer enzymet med henblik på destabilisering.

Det er opfindelsens formål at tilvejebringe en i økonomisk henseende hensigtsmæssig fremgangsmåde til termisk destabilisering af mikrobiel osteløbe i en sådan udstrækning, at de ulemper, der hidrører fra den residuale, mikrobielle osteløbeaktivitet i
10 pasteuriseret valle, i det væsentlige elimineres.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne. Herved opfyldes opfindelsens formål.

Det har vist sig, at den mikrobielle osteløbe, der er modificeret i henhold til opfindelsen, er destabiliseret i betydeligt omfang, og at destabiliseringsgraden er tilstrækkelig til at opfylde kravene i forbindelse med valleudnyttelsen uden at have en særlig skadelig virkning på lagerstabiliteten af osteløbepreparatet. Det har
15 overraskende vist sig, at det i henhold til opfindelsen er muligt at opnå en destabilisering (i henhold til den senere anførte definition) på mindst 5°C, fortrinsvis 7 - 11°C, hvilket for det foretrukne intervals vedkommende bevirker, at den termiske stabilitet af det modificerede enzym kommer til at svare til termostabiliteten af kalvemaveosteløbe, hvorved de favorable egenskaber af kalvemaveosteløben kombineres med de favorable egenskaber af den mikrobielle oste-
25 løbe.

Osteløbeaktiviteten måles i henhold til engelsk standard 3624: 1963 (Method for the determination of milk coagulating power of rennet).

30 Da opfindelsen angår en kontrolleret termisk destabilisering af mikrobiel osteløbe, er den metode, ved hvis hjælp man måler termisk stabilitet og kvantificerer reduktionen af den termiske stabilitet, altså destabiliseringen, angivet i det følgende, idet denne destabilisering er udtrykt i °C.

35 Under ideelle betingelser kan et enzym inaktiveres ved

et passende (højt) temperaturniveau på en sådan måde, at den residue aktive aktivitet af enzymet aftager som funktion af tiden langs en exponentiel henfaldskurve, d.v.s. med veldefineret halveringstid, idet halveringstiden er en funktion af temperaturen ($^{\circ}\text{C}$). Halveringstiden $T_{1/2}$ kan beregnes i henhold til formlen

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

hvor A_1 er enzymaktiviteten målt efter opvarmning til en specificeret temperatur i tiden t_1 , og A_2 er enzymaktiviteten målt efter opvarmning til den samme specificerede temperatur i tiden t_2 . Halveringstiden vil være kortere, jo højere temperaturen er, ceteris paribus. For mange enzymer vil en ændring af pH i enzymopløsningen og ionstyrken og tilstedeværelsen af visse salte påvirke halveringstiden i væsentligt omfang. Yderligere kan kemisk derivivering af enzymet ændre halveringstiden i betydeligt omfang. Hvis en kemisk derivivering af et bestemt enzym frembringer termisk destabilisering af enzymet, siges destabiliseringen at være $n^{\circ}\text{C}$, hvis det oprindelige (ikke modificerede) enzym og det modificerede enzym har den samme halveringstid ved henholdsvis $N^{\circ}\text{C}$ og $(N-n)^{\circ}\text{C}$.

Det bør imidlertid bemærkes, at destabiliseringsværdierne i et vist omfang er approximative på grund af den approximative karakter af halveringstiden. Alle destabiliseringsværdierne i denne beskrivelse er målt ved pH 6,0, da resultaterne af destabiliseringsmålingerne er pH-afhængige.

Normalt ledsages behandlingen ifølge opfindelsen af et aktivitetstab. Det har vist sig, at destabiliseringen af økonomiske årsager ikke bør drives længere end til et aktivitetstab på ca. 50%, fortrinsvis ca. 30%, især under 10%.

I et typisk tilfælde synes en destabilisering på ca. 10°C og aktivitetstab, der er begrænset til under 10%, at være et passende kompromis mellem de ovenfor anførte modstridende faktorer.

Eksempler på passende oxidationsmidler, som kan anvendes ifølge opfindelsen, er et hypochlorit, f.eks. natriumhypochlorit, et hypobromit, f.eks. natriumhypobromit, frit chlor, N-chlorsuccini-

mid, chloramin-T og trichlorisocyanursyre.

Oxidationsmidlet bør anvendes i en sådan koncentration, at den ønskede destabiliseringsgrad fremkommer i et rimeligt tidsrum, hvilket vil sige ethvert tidsrum mellem nogle få minutter og ca. 5 48 timer, eller endog længere i de tilfælde, hvor man lader reaktionen skride frem uden at afbryde den. Hvis koncentrationen af oxidationsmidlet er for lille, vil destabiliseringen blive for lille, og i tilfælde af, at koncentrationen af oxidationsmidlet er for højt, vil aktivitetstabet blive for højt. De optimale koncentrationer svarer 10 sædvanligvis til et vægtforhold mellem oxidationsmidlet og den totale mængde protein i enzympræparatet på mellem ca. 3 og 30 dele oxidationsmiddel pr. 100 dele totalt protein. Hvis det mikrobielle osteløbepræparat oprenses til en høj specifik aktivitet, kan mængden af oxidationsmiddel reduceres til så lidt som 1 g pr. 100 g 15 totalt protein.

Det pH, ved hvilket reaktionen forløber, kan variere indenfor brede grænser, nemlig mellem ca. 3 og 10, idet foretrukne intervaller hovedsageligt afhænger af oxidationmidlet. Med hypochlorit som oxidationsmiddel er det foretrukne pH-interval således mellem 20 5 og 9, fortrinsvis mellem 6 og 8.

Reaktionstemperaturen er ikke kritisk, når reaktionstemperaturen holdes på et niveau, f.eks. under ca. 30°C, hvor stabiliteten af enzymet er tilfredsstillende. Imidlertid kan enzymets stabilitet forbedres ved tilsætning af kendte proteinstabiliserende midler, f.eks. 25 NaCl i en mængde på 5 - 20% af enzympræparatet, eller sorbitol i de sædvanlige enzymstabiliserende mængder.

Den underliggende reaktionsmekanisme forstås ikke, og det er heller ikke sikkert, om der i det sluttelige, destabiliserede enzymmolekyle er inkorporeret nogen halogensubstituent. Det er 30 utvivlsomt, at enzymet, ligesom alle andre proteinmolekyler, kan undergå og undergår talrige og forskellige reaktioner, f.eks. oxidations- og chloreringsreaktioner. Da interessen her koncentrerer sig om destabilisering, er enhver reaktion, som deaktiverer enzymet, uønsket, medens de reaktioner, som destabiliserer enzymet termisk uden at reducere 35 enzymaktiviteten, er ønskværdige.

Destabiliseringsniveauet på mindst 5°C, fortrinsvis 7 - 11°C,

og det ledsagende aktivitetstab på ikke mere end 30%, fortrinsvis under 10%, betragtes som grænser ved udøvelsen af opfindelsen. Oxidationsmidlerne, som indeholder aktivt halogen, tilfredsstiller disse grænser. Frit chlor, som indføres i et vandigt medium, kon-
5 verteres til chlorid- og hypochloritioner. De N-chloro-reagenser, som tidligere er anført, konverteres på hensigtsmæssig måde til hypochloritioner. Det foretrukne reagens er natriumhypochlorit, anvendt ved pH 5 - 9, fortrinsvis ved pH 6 - 8.

Acylering, som beskrevet i belgisk patentansøgning
10 nr. 6/47048, resulterer i en destabilisering på ca. 3°C. Oxidation med hydrogenperoxyd resulterer også i en destabilisering.

Direkte behandling af enzymet med et aktivt halogenreagens, f.eks. natriumhypochlorit, har adskillige fremgangsmådefordele i sammenligning med peroxydreaktionen. Den hovedsagelige fordel anta-
15 ges at være, at det aktive halogenreagens kan konsumeres fuldstændig i reaktionsblandingen, medens reaktion med peroxyd må termineres, f.eks. ved tilsætning af katalase.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter behandling med et oxidationsmiddel, som er en
20 chlorholdig forbindelse.

En anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter behandling til et destabiliseringsniveau på mindst 5°C, fortrinsvis 7 - 11°C, med et osteløbeaktivitetstab på ikke mere 50%, fortrinsvis ikke mere end 30%.

25 En anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter behandling med et oxidationsmiddel, som er en halogenholdig forbindelse, hvis halogen udviser et iltnings-
trin på 0 eller 1.

En anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden
30 ifølge opfindelsen omfatter behandling med hypochlorit.

En anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter behandling af *Mucor miehei* osteløbe.

En anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter behandling med et oxidationsmiddel, hvorved vægtforholdet i reaktionsblandingen mellem oxidationsmidlet og den totale mængde protein i enzympræparatet ligger mellem 5 0,01 og 1, fortrinsvis mellem 0,03 og 0,3.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen har det vandige medium en pH-værdi på mellem 5 og 9.

10 Ved en anden foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen har det vandige medium en temperatur mellem 0 og 30°C.

I praksis har det vist sig, at anvendelsen af destabiliseret osteløbe foretrækkes til fremstilling af lagrede oste.

15 I to parallelle ostekar på hver 150 l fremstilledes ost ved hjælp af modificeret *Mucor miehei* osteløbe fremstillet i henhold til eksempel 16 i denne beskrivelse og ved hjælp af umodificeret *Mucor miehei* osteløbe. Der gennemførtes 2 x 6 forsøg. På basis af disse forsøg blev det konkluderet, at osteløben ifølge opfindelsen var i stand til at fremstille de traditionelle danske ostetyper som 20 Samsø og Danbo med mindst samme gode egenskaber som svarende til ikke modificerede osteløber.

Destabiliseringsprocessen kan gennemføres, og bliver faktisk gennemført som det sluttelige trin ved fremstillingen af den mikrobielle osteløbe. Faktisk kan (kommerciel) ren mikrobiel osteløbe eller 25 osteløbekoncentrat anvendes ved udøvelsen af opfindelsen. pH af en opløsning af mikrobiel osteløbe, som iøvrigt er parat til de sæd-

vanlige efterbehandlingsoperationer før leveringen, indstilles således f.eks. på et forudbestemt behandlingsniveau (f.eks. pH 7) og blandes derpå under omrøring ved omgivelsernes temperatur med en opløsning af oxidationsmidlet, hvorved mængden af dette oxidations-

5 middel ligger i det før angivne vægtforholdsinterval på 3 - 30 dele (idet en eksemplificerende mængde af natriumhypochlorit kan være 20 dele) pr. 100 dele totalt protein i opløsningen af mikrobiel osteløbe. Man overlader derpå blandingen til sig selv i nogle få timer, indtil man har opnået det ønskede destabiliseringsniveau, f.eks. i

10 2 - 3 timer. Reaktionen kan afbrydes ved tilsætning af aktivt kul eller et reduktionsmiddel, såsom natriumsulphit, efter en passende reaktionsperiode. Det destabiliserede enzymprodukt kan derefter udsættes for de sædvanlige efterbehandlingsoperationer, f.eks. filtrering, pH-indstilling og indstilling af enzymaktiviteten til en standardiseret værdi, o.s.v.

15

Opfindelsen skal nu beskrives mere detaljeret under henvisning til de følgende eksempler.

Udgangsmaterialet i de følgende eksempler er et osteløbe-koncentrat fremstillet som angivet i "2. Pilot plant experiment" i

20 engelsk patent 1.108.287, med undtagelse af, at kulturvæsken var koncentreret til en aktivitet, der omtrentlig svarer til en 1% opløsning af det rene enzym (Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Vol. 37, 1970, No. 14, 301 - 325), og at der til det rå koncentrat var tilsat 18% NaCl. For kortheds skyld vil dette kon-

25 centrat blive i det følgende blive benævnt "Rennilase 46".

Eksempel 1.

pH-værdien i to sæt af tre 25 ml portioner, fremstillet ved at blande 12,5 ml Rennilase 46 og 12,5 ml vand, blev indstillet på henholdsvis 7,0, 8,0 og 9,0 ved tilsætning af 1 N NaOH; til

30 hver af disse blandinger tilsattes 0,4 ml af en 2,25 M opløsning af NaClO, og pH-værdien blev holdt konstant på de ovenfor angivne værdier.

Det første sæt omfattende 3 portioner blev anbragt i et køleskab (ca. 18 timer) natten over. Det andet sæt omfattende tre

portioner blev sat til side ved stuetemperatur i 2 timer. pH-faldet blev målt ved slutningen af de angivne perioder. Derpå blev portionerne fortyndet ved at blande 0,2 ml deraf med 50 ml vand, og samtidigt blev pH-værdien indstillet på 6,0 med natriumacetat/5 eddikesyre.

pH-faldene og de residuale aktiviteter efter reaktionen mellem osteløbe og natriumhypochlorit fremgår af den følgende tabel.

10	Initialt pH	pH efter		Residual aktivitet (%) efter	
		2 timer	18 timer	2 timer	18 timer
	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

Derefter blev de fortyndede prøver varmebehandlet ved 55°C i 30 minutter ved pH 6,0, hvorefter de residuale aktiviteter blev målt.

20	Initialt pH	Residual aktivitet (%) efter 30 minutters varmebehandling ved 55°C	
		2 timers prøve	18 timers prøve
	7	16,3	4,2
	8	16,3	4,3
	9	32,3	14,6
	Reference	98,7	

25 De ovenfor angivne residuale aktiviteter svarer til de følgende værdier af halveringstiden og destabilisering.

Initialt pH	T _{1/2} , minutter, 30 minutter, 55°C, pH 6,0		Destabilisering, °C	
	2 timer	18 timer	2 timer	18 timer
5 7	11,5	6,5	11	12
8	11,5	6,6	11	12
9	18,4	10,8	10	11
Reference	-		-	

Eksempel 2.

- 10 pH-værdierne af tre 150 ml portioner af Rennilase 46 blev indstillet på henholdsvis 5,0, 6,0 og 7,0. Hver af disse 3 portioner blev delt i tre dele, hvortil man tilsatte henholdsvis 0,8 ml, 1,2 ml og 1,6 ml af en kommerciel 2,25 M opløsning af NaOCl, og pH blev holdt konstant på de ovenfor angivne værdier.
- 15 Disseni prøver blev derpå opbevaret ved stuetemperatur (22°C) i 18 - 20 timer, hvorefter en 10 ml prøve blev udtaget fra hver af de ni prøver. Til hver af disse 10 ml prøver blev der tilført henholdsvis 0,4, 0,6 eller 0,8 ml 1 M Na₂SO₃, i afhængighed af, hvor meget NaOCl der blev tilsat til den tilsvarende portion.
- 20 for at fjerne eventuelt foreliggende overskud af hydrochlorit.

0,2 ml af de således behandlede prøver blev fortyndet med 50 ml vand, og pH blev indstillet på 6,0 med eddikesyre/natriumacetat. De fortyndede og pH-indstillede prøver blev varmebehandlet ved 55°C i 30 minutter. Aktivitetsudbyttet, den residuale aktivitet efter varmebehandling og den beregnede halveringstid samt destabiliseringen fremgår af den følgende tabel.

	pH	Tilsat mængde NaOCl, ml	Aktivitets- udbytte %	Residual ak- tivitet, %, 30 minut- ter, 55°C, pH 6,0	T _{1/2} , minut- ter, 30 mi- nutter, 55°C, pH 6,0	Destabi- lisering, °C
5	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
10	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

Eksempel 3.

- 15 pH-værdien af 600 ml Rennilase 46 blev ved en temperatur på
ca. 10°C indstillet på 6,0 ved hjælp af 4 N NaOH. Denne portion blev
inddelt i seks dele, som hver havde et volumen på 100 ml. Til hver af
disse seks dele tilsattes henholdsvis 0, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 og 2,4 ml
af en kommerciel 2,25 m NaOCl opløsning, og pH blev indstillet på
20 7 i alle seks portioner.

- Efter ca. 15 timer ved ca. 5°C tilsattes 2 ml 1 M Na₂SO₃
for at fjerne eventuelt overskud af hypochlorit. Til-
sætning af sulfit ændrer ikke stabiliteten af osteløben. Man målte
aktivitetsændringen. 5 ml af prøverne blev også fortyndet 10 gange
25 i 0,1 M acetat-stødpude med pH 6,0 hvorefter man varmebehandlede
5 ml af de fortyndede prøver ved 60°C i 15 minutter. Den residuale
aktivitet efter varmebehandling blev bestemt, og halveringstiden
og destabiliseringen blev beregnet. Tallene fremgår af den føl-
gende tabel.

5	Tilsat mængde af 2,25 M NaOCl, ml	Ændring af den totale aktivitet, %	% residual aktivitet efter var- mebehand- ling	T _{1/2} : minut- ter; 15 minutter 60°C, pH 6,0	Destabili- sering, °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
10	2,0	- 8,5	10	4,5	10
	2,4	- 14,9	7	3,9	11

Eksempel 4.

Udgangsmaterialet i dette eksempel var ikke Rennilase 46, men Rennilase 46, hvortil der ikke var tilsat 18% NaCl.

15 På basis af det ovenfor angivne udgangsmateriale fremstilledes fem 200 g prøver med henholdsvis 0, 5, 10, 15 og 20% NaCl. pH-værdien blev indstillet på 6,0 ved hjælp af 4 N NaOH.

20 Fra hver af de ovenfor angivne fem 200 g prøver udtoges en 100 ml prøve. Til hver af de fem 100 ml prøver tilsattes 1 ml af en kommerciel 2,25 M NaOCl opløsning, hvorved temperaturen blev holdt mellem 5 og 10°C. pH-værdien af alle fem 100 ml prøver blev derpå indstillet på 7,0 med 4 N NaOH og opbevaret ved ca. 5°C.

Efter en opbevaringstid på ca. 20 timer bestemtes aktivitetsændringen. Man fortyndede også 5 ml af prøverne 10 gange med 0,1 M 25 acetat-stødpude med pH 6,0, hvorefter 5 ml af de fortyndede og pH-indstillede prøver blev varmebehandlet ved 60°C i 15 minutter. Man bestemte den residuale aktivitet. En ikke varmebehandlet prøve behandledes sideløbende som blindprøve.

De eksperimentelle parametre og forsøgsresultater er 30 sammenstillet i den følgende tabel.

5

0

10

25

30

Tilsat NaCl, %	Tilsatte mængder af 2,25 M NaOCl, ml	Ændring af total akti- vitet, %	Residual aktivitet efter varmebe- handling i 15 mi- nutter, %	T _{1/2} , mi- nutter, 15 minut- ter, 60°C, pH 6,0	Destab- ilise- ring, °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

Eksempel 5.

Ti forsøgsserier blev etableret ved forskellige pH-værdier, nemlig 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 og 11,0. Hver serie bestod af 3 prøver, fremstillet ved at fortynde alikvoter af 12,5 ml Rennilase 46 med et lige så stort volumen vand. Til den første prøve i hver serie tilsattes 75 µl af en kommerciel 2,25 M opløsning af natriumhypochlorit, til den anden 150 µl og til den tredje 300 µl, hvilke mængder svarer til (ca.) henholdsvis 4, 8 og 16 g natriumhypochlorit pr. 100 g total protein i prøven. pH i hver serie blev holdt konstant på de angivne værdier. Reaktionstemperaturen var den samme for alle serier (ca. 5°C).

Efter reaktionstider på ca. 114, 66 og 90 timer for henholdsvis den første, anden og tredje prøve i hver serie indstilledes volumenerne på alle prøver på 50 ml. Der fremstilles prøver til analyse ved passende fortynding (ca. 1:125), idet pH samtidigt blev indstillet på 6,0 ved hjælp af opløsninger af eddikesyre og natriumacetat.

Disse prøver blev derpå varmebehandlet ved 55°C i 30 minutter. Aktivitetsudbytte, residual aktivitet efter varmebehandling, den beregnede halveringstid og den på basis deraf beregnede destabilisering fremgår af den følgende tabel.

Initialt pH	Mængde af tilsat NaClO ul/25 ml prøve	Slutteligt pH	Aktivitets- udbytte, %	Residual aktivitet %	T _{1/2} min.	Destabili- sering, °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
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 ^{x)}	11,9	10
	300	7,34	47,3	9,3 ^{x)}	2,92 ^{x)}	13
10	75	8,34	81,2	78,6	86,4	6
	150	8,23	68,5	34,0 ^{x)}	19,3	9
	300	7,83	44,4	9,3 ^{x)}	2,92 ^{x)}	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	-	-	-

x) 10. min. varmebehandling.

Disse data viser, at følgende betingelser er optimale
hvad angår destabilisering med natriumhypochlorit:

pH interval: 6 - 8.

Mængde af natriumhypochlorit: 150 ul 2.25 opløsning pr. prøve svarende til (ca.) 8 g natriumhypochlorit pr. 100 g totalt protein.

5 Eksempel 6.

Man fremstillede to portioner af blandingen af 25 ml Rennilase 46 og 20 g isvand, hvori pH blev indstillet til 7,0 ved hjælp af 4 N NaOH.

10 Til disse to portioner tilsattes henholdsvis 33 og 66 mg N-chlor-succinimid, opløst i 5 ml isvand, hvorved pH samtidigt blev indstillet på 7,0.

To timer senere blev 0,2 ml af portionerne fortyndet med 50 ml vand, hvorved pH samtidigt blev indstillet på 6,0 ved hjælp af natriumacetat/eddikesyre.

15 Den residuale aktivitet efter reaktionen mellem oste-løben og N-chlor-succinimidet var som følger:

Tilsat mængde af N-chlor-succinimid mg	Residual aktivitet. %
33	99,0
66	96,5

20 På samme måde som i eksempel 1 gennemførte man en varme-behandling ved 55°C i 30 minutter ved pH 6,0. Derefter blev de residuale aktiviteter bestemt, og halveringstiderne og destabiliseringerne blev beregnet. Resultaterne er sammenstillet i den følgende tabel.

Tilsat mængde af N-chloro-succinimid, mg	Residual aktivitet, 55°C i 30 minutter, pH 6,0, %	$T_{\frac{1}{2}}$, minutter, 30 minutter, 55°C, pH 6,0	Destabilisering, °C.
33	41,5	23,6	10
66	26,4	15,6	10

Eksempel 7.

En NaOBr-opløsning med en molaritet på ca. 2 fremstilledes ved dråbevis tilsætning af 3 g Br_2 til 10 ml 4 N NaOH under omrøring og afkøling i et bad af isvand.

25 ml Rennilase 46 blev blandet med 25 ml vand, og pH-værdien blev indstillet på 7,5 med 1 N NaOH. Til 25 ml af denne opløsning tilsattes 0,5 ml af den ovenfor angivne natriumhypobromit-opløsning i løbet af ca. 1 time, hvorved pH-værdien blev holdt mellem 7,3 og 7,8 ved tilsætning af 1 N HCl.

Ca. 30 minutter senere bestemte man aktivitetstab og termostabiliteten. Aktivitetstab viste sig at være 20%, og den residuale aktivitet efter varmebehandling i 20 minutter ved 60°C og pH 6,0 var 14%, svarende til en halveringstid på 7 minutter eller en destabilisering på ca. 8°C.

Eksempel 8.

50 ml Rennilase 46 blev fortyndet med 50 ml vand. Blandingen blev afkølet i et isbad, og pH-værdien blev indstillet på 7,0 med 1 N NaOH. Derpå indførtes der ca. 0,1 g frit Cl_2 ; derved faldt pH til ca. 3,8, og væsken blev mere uklær og lysere. Reaktionsblandingen blev overladt til sig selv i ca. 10 minutter, og derpå tilsattes 4 ml 1 M Na_2SO_3 -opløsning for at fjerne overskud af Cl_2 .

0,2 ml prøver efter tilsætningen af Cl_2 blev fortyndet med 50 ml vand, og pH blev indstillet på 6,0 med natriumacetat/eddikesyre. Det aktivitetsstab, som ledsagede reaktionen mellem osteløbe og chlor, var 21%.

- 5 Efter varmebehandling af den chlorbehandlede osteløbe ved 55°C i 30 minutter fandt man en residual aktivitet på 63%. Dette svarer til en halveringstid på ca. 45 minutter eller en destabilisering på ca. 8°C .

Eksempel 9.

- 10 Man fremstillede 2 portioner, som hver bestod af 25 ml Rennilase 46 og 25 g isvand, og pH blev indstillet på 7,0 med 4 N NaOH.

- 15 Til disse to blandinger tilsattes henholdsvis 60 og 120 mg trichlorisocyanursyre, og samtidig indstilledes pH på 7,0.

Ca. 4 timer senere fortyndede man 0,2 ml af de ovenfor angivne blandinger med 50 ml vand, og samtidigt indstilledes pH-værdien på 6,0 med natriumacetat/eddikesyre. De således fortyndede prøver blev varmebehandlet ved 55°C i 30 minutter.

- 20 Aktivitetsudbytterne, de residuale aktiviteter efter varmebehandling og de beregnede halveringstider og destabiliseringer er sammenstillet i den følgende tabel.

25	Mængde af tilsat trichlorisocyanursyre, mg	Aktivitetsudbytte, %	$T_{\frac{1}{2}}$, minutter; 30 minutter, 55°C , pH 6,0	Destabilisering, $^\circ\text{C}$
	60	93,0	35	9
	120	81,5	16	10

Eksempel 10.

- 30 To portioner på hver 25 ml Rennilase 46 blev for hver portions vedkommende blandet med 20 g isvand, og pH-værdien blev indstillet på 7,0 med 4 N NaOH.

Derpå tilsatte man til de to ovenfor angivne portioner henholdsvis 70 og 140 mg chloramin T, opløst i 5 ml isvand, og samtidigt indstillede pH på 7,0.

Ca. 2 timer senere fortyndede man 0,2 ml af de ovenfor angivne prøver med 50 ml vand, idet pH samtidigt blev indstillet på 6,0 med natriumacetat/eddikesyre, og de blev således fortyndede og pH-indstillede prøver blev varmebehandlet ved 55°C i 30 minutter. Aktivitetsudbytter, residuale aktiviteter efter varmebehandling og beregnede værdier af halveringstiden og destabiliseringen er sammenstillet i den nedenfor angivne tabel.

Mængde af tilsat chloramin-T, mg	Aktivitetsudbytte, %	$T_{1/2}$, minutter, 30 minutter; 55°C, pH 6,0	Destabilisering, °C
70	96,5	19,2	10
140	77,9	8,5	12

Eksempel 11.

pH-værdien af 25 ml Rennilase 46 blev indstillet på 10,0 med 1 N NaOH.

Blandingen blev afkølet i isvand, og en opløsning indeholdende 0,05 M I_2 i 0,25 M KI tilsattes portionsvis til de ovenfor angivne 25 ml pH-indstillede Rennilase 46, idet hver portion havde et volumen af 2 ml, hvorved pH-værdien samtidigt blev indstillet på 10 med 1 N NaOH efter hver tilsætning af 2 ml af iod-reagenset. Der udtoges en blindprøve, og desuden udtoges der en prøve på 0,5 ml før hver ny tilsætning af en 2 ml portion af iod-reagenset.

Af analytiske grunde blev de 0,5 ml prøver fortyndet og pH-indstillet til 6,0 med eddikesyre/natriumacetat. Derefter blev de varmebehandlet ved 60°C i 30 minutter.

Forsøgsresultaterne fremgår af den følgende tabel.

	Mængde af tilsat opløsning af I_2 ; KI, ml	Aktivitetsudbytte %	Residual aktivitet 60°C , 30 minutter %	$T_{1/2}$, minutter; 30 minutter, 60°C , pH 6,0	Destabilisering, $^\circ\text{C}$
5	0	100	88	163	0
	2	100	88	163	0
	4	96	90	197	0
	6	91	88	163	0
10	8	76	85	128	1
	10	63	71	61	3

Eksempel 12.

Rennilase 46 uden tilsat NaCl blev fortyndet tre gange. pH i 20 ml af således fortyndet Rennilase 46 blev indstillet på 8,5, og der afkøledes til 0°C , hvorpå man tilsatte 0,7 ml af en opløsning af 0.05 M I_2 i 0,25 M KI. Ca. 15 minutter senere indstilledes pH på 6 ved tilsætning af 0,1 M NaHSO_3 .

Af analytiske grunde blev denne prøve fortyndet, og samtidig blev pH-værdien indstillet på 6,00 med eddikesyre/natriumacetat. Der blev prøven varmebehandlet ved 60°C i 30 minutter.

Aktivitetsudbyttet var 42,6%.

Den residuale aktivitet efter varmebehandlingen var 35%.

Den beregnede halveringstid ved 60°C og pH 6 var 20 minutter. Dette svarer til en destabilisering på ca. 5°C , da en referenceprøve viste samme halveringstid på ca. 20 minutter ved 65°C .

Eksempel 13.

3 g *Mucor pusillus* protease (Noury, 1:220.000) opløses i 30 ml 10% NaCl, og pH-værdien indstilles på 6,5 ved $5 - 10^\circ\text{C}$. 3 x 50 μl 15% NaOCl tilsættes med intervaller på 30 minutter. Efter omrøring i 3

timer holdes blandingen ved 4°C i 16 timer, og pH-værdien bliver derpå indstillet på 5,0. Der opsamles prøver med henblik på bestemmelse af aktivitet og thermostabilitet. Resultaterne fremgår af nedenstående tabel.

5	Prøve/reaktions- tid	Aktivitetsudbytte %	Halveringstid ved pH 6,0, 0 - 30 minutter ved: (min.) 50°C 55°C	Destabilise- ring (°C)
0	Reference	100	144 - 155 18 - 31	-
	24 timer	84 - 91	26 - 22 5 - 11	5

Eksempel 14.

Udgangsmaterialet i dette eksempel var ikke Rennilase 46, men Rennilase 46, hvortil man havde tilsat 6% NaCl istedet for

5 18% NaCl.

1 liter af udgangsmaterialet blev inddelt i 4 portioner, der hver var 250 ml. Temperaturen blev indstillet på 5 - 10°C, og pH i de tre portioner blev indstillet på 6,5 med 4 N NaOH. Man tilsatte også henholdsvis 1, 1,2 og 1,4% (v/v) af en 13,5% w/w NaOCl opløsning til de tre portioner, hvorefter pH blev indstillet på 7,5 med 4 N NaOH, og prøverne blev inkuberet ved ca. 5°C.

Efter en reaktionstid på henholdsvis 3, 27 og 53 timer udtages der 50 ml prøver af hver af de hypochloritbehandlede portioner, og til hver af de 50 ml prøver tilsættes 250 mg (0,5% w/v) 5 aktivt carbon (Carboraffin BGN). Dagen efter tilsætningen af aktivt carbon blev prøverne filtreret og undersøgt for stabilitet og osteløbeaktivitet (første bestemmelse). Prøverne blev holdt ved 5°C i ni dage efter at man havde tilsat hypochlorit, hvorefter stabilitet og osteløbeaktivitet (udbytte) blev bestemt igen (anden bestemmelse). 0 Efter yderligere 4 dages forløb ved ca. 5°C og 2 dage ved ca. 25°C bestemmes osteløbeaktiviteten igen, og udbyttet beregnes (tredje bestemmelse). Resultaterne er opstillet i de følgende tabeller, af hvilke det fremgår, at der ikke forekommer nogen betydende ændring

hvad angår destabilisering eller aktivitetsudbytte, når reaktionstider forlænges fra 3 timer til 53 timer.

Tabel 1

5	Hypochlorit-tilsætning % v/v	Bestemmelse	Destabilisering °C		
			Reaktionstid		
			3 timer	27 timer	53 timer
10	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

Tabel 2

15	Hypochlorit-tilsætning % v/v	Bestemmelse	Udbytte, %		
			Reaktionstid		
			3 timer	27 timer	53 timer
20	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
25	1,4	1.	89	91	90
		2.	92	89	91
		3.	91	89	88

Eksempel 15.

pH-værdien i fem 25 ml prøver "Rennilase 46" blev indstillet på henholdsvis 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 og 6,0. Til hver af disse prøver tilsatte man 0,04 g natriumchlorit, hvorved pH-værdierne blev holdt konstant på de angivne værdier.

Prøverne blev opbevaret ved 5°C i 6 dage, hvorefter de blev analyseret for residual aktivitet og thermostabilitet ved 55°C og pH 6,0.

Initialt pH	Residual aktivitet %	Halveringstid (min.) (efter 30 min. varmebehandling)	Destabilisering °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

Eksempel 16.

Udgangsmaterialet i dette eksempel var ikke "Rennilase 46", men "Rennilase 46", der er modificeret i to henseender: 1) kulturvæskens blev koncentreret til en aktivitet svarende til en opløsning af ca. 1,6% rent enzym (altså ikke 1% rent enzym) og 2) man tilsatte 9% NaCl (altså ikke 18% NaCl) til det rå koncentrat.

På denne måde fremstilledes 5952 kg modificeret "Rennilase 46" i en pilot plant.

pH blev indstillet på 6,4 ved 9°C med 34% NaOH, og der tilsattes 109 kg af en 12,5% (w/w) NaOCl opløsning. Under denne behandling forøgedes pH-værdien til 8,0, og pH-værdien blev indstillet på 7,4 med 37% HCl.

Efter 18 timer ved 9 - 5°C var pH faldet til 6,9. Derpå tilsattes

1% aktivt carbon ved 4 - 5°C. 26 timer senere gennemførtes en filtrering ved hjælp af en filterpresse, og destabiliseringen blev målt igen. Slutteligt blev den foreliggende supernatant koncentreret under reduceret tryk ved 30°C og pH 6,7, og der blev tilsat NaCl til

5 totalt 18%.

Det viste sig, at halveringstiden af det sluttelige produkt var 11 min., og at destabiliseringen var 10°C.

PATENTKRAV:

1. Fremgangsmåde til termisk destabilisering af mikrobiel osteløbe ved kemisk modifikation deraf, k e n d e t e g n e t v e d, at man modificerer den mikrobielle osteløbe ved behandling i et vandigt medium med et oxidationsmiddel, der udvalgt fra den gruppe, som består af halogenholdige forbindelser, hvis halogen udviser et iltningsstrin på mellem 0 og 3.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t v e d, at halogenet er chlor.
- 10 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t v e d, at behandlingen gennemføres til et destabiliseringsniveau på mindst 5°C, fortrinsvis 7 - 11°C, med et osteløbeaktivitetstab på ikke mere end 50%, fortrinsvis ikke mere end 30%.
- 15 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, k e n d e t e g n e t v e d, at oxidationsmidlet er en halogenholdig forbindelse, hvis halogen udviser et iltningsstrin på 0 eller 1.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 4, k e n d e t e g n e t v e d, at oxidationsmidlet er hypochlorit.
- 20 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 5, k e n d e t e g n e t v e d, at den mikrobielle osteløbe er *Mucor miehei* osteløbe.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 6, k e n d e t e g n e t v e d, at behandlingen gennemføres med et vægtforhold i reaktionsblandingen mellem oxidationsmidlet og den totale mængde protein i enzympræparatet på mellem 0,01 og 1, fortrinsvis mellem 0,03 og 0,3.
- 25 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 7, k e n d e t e g n e t v e d, at det vandige medium har en pH-værdi mellem 5 og 9.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 8, k e n d e t e g n e t v e d, at det vandige medium har en temperatur på mellem 0 og 30°C.