
Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8102994**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Verbeteringen in en met betrekking tot een proteolytisch middel en een werkwijze voor de hydrolyse van proteïne.**

⑤1 Int.Cl.³: C12N 9/54.

⑦1 Aanvrager: NOVO Industri A/S te Bagsvaerd, Denemarken.

⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8102994.

②2 Ingediend 22 juni 1981.

③2 Voorrang vanaf 23 juni 1980.

③3 Land van voorrang: Denemarken (DK).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 2674/80 .

⑥2 - -

④3 Ter inzage gelegd 18 januari 1982.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Verbeteringen in en met betrekking tot een proteolytisch middel en een werkwijze voor de hydrolyse van proteïne.

Het gebied, dat werkwijzen omvat voor de hydrolyse van proteïne, kan onderverdeeld worden in proteïne-hydrolyse-processen, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolytische graad van geen belang is en
5 proteïne-hydrolyse-processen, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad hinderlijk is.

Als voorbeelden van de eerste van de hiervoor vermelde categorieën kunnen de proteïne-hydrolyse vermeld worden uitgevoerd gedurende een
10 wasproces en een ontharingsproces. Er wordt geen schade gedaan, wanneer proteolytische activiteit nog aanwezig is in de was- of ontharingsoplossing na voltooiing van de proteïne-hydrolyse.

Als voorbeelden van de tweede van de hiervoor vermelde categorieën kunnen de proteïne-hydrolyse uitgevoerd bij plantaardige proteïnen,
15 bijvoorbeeld sojaproteïne, teneinde een plantaardige proteïne-hydrolysaat voort te brengen met verbeterde functionele eigenschappen, zoals aangegeven in de Amerikaanse octrooischriften 4.100.024 en 4.100.151, de proteïne-hydrolyse uitgevoerd bij dierlijke proteïnen, bijvoorbeeld de gehemolyseerde rode bloedlichaampjes fractie van bloed, teneinde een
20 dierlijk proteïne-hydrolysaat voort te brengen met verbeterde functionele eigenschappen, bijvoorbeeld zoals aangegeven in het Belgische octrooischrift 873.932 en de proteïne-hydrolyse, die afschrik-bestendig wordt genoemd, uitgevoerd bij bier, bijvoorbeeld zoals aangegeven in het Amerikaanse octrooischrift 3.366.483 vermeld worden. Wanneer prote-
25 olytische activiteit nog aanwezig is na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad bij de hiervoor aangegeven proteïne-hydrolyse-processen, zal de hydrolyse-graad toenemen tot boven de maximumwaarde van de hydrolyse-graad die de voorkeur verdient, waarbij bitter smakende produkten kunnen ontstaan of andere nadelen kunnen ver-
30 schijnen. Om die reden dient de proteolytische activiteit geïnactiveerd te worden, wanneer de beoogde hydrolyse-graad is bereikt. Deze inactivering wordt gewoonlijk uitgevoerd door een warmte-behandeling, evenwel kan helaas deze warmte-behandeling vergezeld gaan van een niet beoogde denaturatie van enkele proteïnen of proteïne-hydrolysaten, hetgeen op-
35 nieuw ernstig de functionele eigenschappen van de proteïnen of proteïne-hydrolysaten kan benadelen.

De uitvinding heeft uitsluitend betrekking op de tweede van de

81 02 994

hiervoor vermelde categorieën van proteïne-hydrolyse-processen.

Zoals uit het voorafgaande blijkt is er een behoefte aan een proteolytisch middel voor gebruik bij proteïne-hydrolyse-processen, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad hinderlijk is, de thermische stabiliteit van het middel lager is dan de thermische stabiliteit van de bekende proteolytische middelen, die voor dit doel worden gebruikt en voldoende laag om volledige inactivering bij een dergelijke voorzichtige warmte-behandeling te waarborgen, die niet eventueel proteïne of proteïne-hydrolysaat in het reactiemengsel zal denatureren, terwijl alle andere eigenschappen van het proteolytische middel ten minste niet zullen achteruitgaan.

Het eerste aspect van de uitvinding omvat een proteolytisch middel voor gebruik bij proteïne-hydrolyse-processen, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad hinderlijk is, waarbij het proteolytische middel een Bacillus serine protease is, dat geacetyleerd is door middel van een acyleringsmiddel en een gedestabiliseerd Bacillus serine protease is verkregen.

Bepaalde combinaties van specifieke Bacillus serine proteasen en specifieke acyleringsmiddelen resulteren niet in gedestabiliseerde Bacillus serine proteasen. Door middel van de werkwijzen, die later in deze beschrijving worden ontwikkeld, is het gemakkelijk uit te vinden of al of niet een specifiek Bacillus serine protease gedestabiliseerd is door middel van een specifiek acyleringsmiddel.

Verrassenderwijze is volgens de uitvinding gevonden, dat de thermische stabiliteit van Bacillus serine proteasen aanzienlijk verminderd wordt door de acylering. Dit is verrassend, aangezien uit Agric. Biol. Chem. 41 (11), (1977) 2163 - 2168 blijkt, dat acetylering van eiwit een thermische stabilisatie veroorzaakt.

Eveneens is verrassenderwijze gevonden, dat de geacyleerde Bacillus serine proteasen een hydrolyse kinetika vertonen, die identiek is aan de hydrolyse kinetika van de niet-gemodificeerde Bacillus serine proteasen en dat het proteïne-hydrolyseprodukt voortgebracht door middel van de geacetyleerde Bacillus serine proteasen niet kan worden onderscheiden van de proteïne-hydrolyseprodukten voortgebracht door middel van de niet-gemodificeerde Bacillus serine proteasen.

Enkele Bacillus serine proteasen, die geacetyleerd zijn tot een gespecificeerde acyleringsgraad worden als zodanig beschreven, zie bijvoorbeeld Carlsberg Res. Commun., 41, No. 5, (1976), 242 e.v., in het

8102994

bijzonder de blz. 243 en 244, waarin succinylering, glutarylering en maleylering van subtilisine Carlsberg en subtilisine BPN' worden beschreven en het Amerikaanse octrooischrift 3.886.042. Echter wordt niet beschreven, dat alle geacyleerde *Bacillus* serine proteasen een hogere thermolabiliteit vertonen dan de onbehandelde *Bacillus* serine proteasen.

De proteolytische activiteit wordt gemeten in Anson-eenheden en bepaald volgens de gemodificeerde Anson-methode beschreven in NOVO ENZYME INFORMATION IB no. 058 e-GB (de oorspronkelijke Anson methode is beschreven in J.Gen.Physiol., 22, (1939) 79 - 89).

10 Het *Bacillus* serine protease kan verkregen worden uit *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. alcalophilus* en de *Bacilli* geslachten beschreven in het Amerikaanse octrooischrift 3.723.250.

Aangezien de onderhavige uitvinding betrekking heeft op een gecon-
15 troleerde thermische destabilisatie van *Bacillus* serine proteasen, wordt hierna enige uitwerking verschaft over technieken voor het meten van thermische stabiliteit en om de vermindering in thermische stabiliteit te kwantificeren, dat wil zeggen de destabilisatie, welke destabilisatie wordt uitgedrukt in °C. Voor een beter begrip wordt verwezen
20 naar B. Stevens, Chemical Kinetics, London, Chapman & Hall, 1961.

De stabiliteit van het enzym wordt gewaardeerd door middel van een warmte-behandeling van het enzym na verdunning in 1/15 M fosfaatbuffer bij pH 7,5. Wanneer de warmte-behandeling wordt uitgevoerd bij twee verschillende temperaturen T_1 en T_2 kunnen de thermodynamische pa-
25 rameters A en E berekend worden door middel van de Arrhenius vergelijkingen

$$k_1 = A \cdot e^{-\frac{E}{RT_1}}$$

30 $k_2 = A \cdot e^{-\frac{E}{RT_2}}$

waarin R de gasconstante is ($1,9865 \text{ cal } ^\circ\text{C}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$), T de absolute temperatuur is ($^\circ\text{K}$), A de preexponentiële of frequentiefactor is, E de activeringsenergie voor het warmte inactiveringsproces is
35 (die kan worden uitgedrukt in cal/mol) en k de snelheidsconstante voor de warmte-inactivering is, waarbij k onder de veronderstelling van een desintegratiekromme van de eerste orde voor de warmte-inactivering berekend kan worden door middel van de formule

8102994

$$k = \frac{\ln a_0 - \ln a_t}{t}$$

waarin a_0 en a_t de protease-activiteit is in Anson-eenheden onder verwijzing naar dezelfde hoeveelheid voor en na warmtebehandeling gedurende de tijd t (die in minuten kan worden uitgedrukt).

Door oplossing van de beide voorafgaande Arrhenius vergelijkingen kunnen E en A berekend worden, dat wil zeggen volgens de vergelijkingen

$$E = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)^{-1} R \ln \frac{k_2}{k_1}$$

$$A = k_1 \cdot e^{\frac{T_2}{T_2 - T_1} \ln \frac{k_2}{k_1}}$$

Wanneer de snelheidsconstante k van het natuurlijke enzym berekend wordt voor een temperatuur van 60°C (de referentietemperatuur T_{ref}), en wanneer de waarden van A en E voor het gemodificeerde enzym worden bepaald volgens de hiervoor aangegeven vergelijkingen, kan de temperatuur T_D , waarbij het gemodificeerde enzym geïnactiveerd wordt met dezelfde snelheid waarmee het natuurlijke enzym geïnactiveerd wordt bij de temperatuur T_{ref} , berekend worden door middel van de vergelijking

$$T_D = \frac{E}{R (\ln A - \ln k)}$$

De destabilisatie van het gemodificeerde enzym wordt gedefinieerd als $(T_{\text{ref}} - T_D)^\circ\text{C}$.

Tenzij anders vermeld worden alle destabilisatiewaarden in de onderhavige beschrijving gemeten bij een pH van 7,5, aangezien de resultaten van de destabilisatie-meting pH afhankelijk zijn.

De behandeling volgens de uitvinding kan vergezeld gaan van een activiteitsverlies afhankelijk van het toegepaste acyleringsmiddel en van de hoeveelheid toegepast acyleringsmiddel. Gebleken is dat om economische redenen de destabilisatie niet moet worden uitgevoerd buiten de fase, die overeenkomt met een activiteitsverlies van ongeveer 50 %, bij voorkeur ongeveer 30 %, meer bij voorkeur minder dan 10 %.

Echter kan de behandeling volgens de uitvinding ook vergezeld gaan van een aanzienlijke activiteitstoename. Of een activiteitsverlies of een activiteitstoename verkregen wordt hangt af van het toegepaste specifieke acyleringsmiddel en de acyleringsgraad.

Zo wordt met azijnzuuranhydride als acyleringsmiddel een activi-

teitsverlies waargenomen, in het bijzonder gedurende de laatste stadia van de acylering. Echter wordt een activiteitstoename waargenomen met barnsteenzuuranhydride of maleïnezuuranhydride als acyleringsmiddelen. Met boterzuur wordt geen activiteitsverlies en geen activiteitstoename
 5 waargenomen, terwijl een destabilisatie van slechts 5°C kan worden verkregen, maar met azijnzuuranhydride wordt een groot activiteitsverlies waargenomen, terwijl een hoge stabilisatie, bijvoorbeeld van ongeveer 15°C, kan worden verkregen.

Bij een voorkeursuitvoeringsvorm van het proteolytische middel
 10 volgens de uitvinding is het Bacillus serine protease subtilisine Carlsberg. Subtilisine Carlsberg kan gemodificeerd worden tot een gestabiliseerd enzym met een zeer grote destabilisatie zonder enig activiteitsverlies, in het bijzonder door maleylering. Dit gemodificeerde produkt is goed geschikt voor proteïne-hydrolyse.

15 Bij een voorkeursuitvoeringsvorm van het proteolytische middel volgens de uitvinding is het acyleringsmiddel een actief maleïne-zuur-derivaat. Door middel van dit acyleringsmiddel kunnen vrijwel alle Bacillus serine proteasen gemodificeerd worden tot sterk gedestabiliseerd derivaten.

20 Bij een voorkeursuitvoeringsvorm van het proteolytische middel volgens de uitvinding is het acyleringsmiddel een actief derivaat van een monocarbonzuur met 1 - 6 koolstofatomen. Dit proteolytische middel is goed geschikt voor proteïne-hydrolyse.

Bij een voorkeursuitvoeringsvorm van het proteolytische middel
 25 volgens de uitvinding wordt de acylering uitgevoerd juist tot de acyleringsgraad, waarbij geen verdere destabilisatie verkregen wordt. Gebleken is, dat een toenemende acyleringsgraad vergezeld gaat van toegenomen destabilisatie tot een bepaalde acyleringsgraad, van waaraf geen verdere destabilisatie-toename kan worden verkregen. Ook werd gevonden,
 30 dat een toenemende acyleringsgraad voor sommige acyleringsmiddelen vergezeld gaat van een toegenomen activiteitsverlies. Gewoonlijk wordt het beste totaalprodukt daarvan verkregen, wanneer de acylering wordt uitgevoerd tot juist de acyleringsgraad, waarbij geen verdere destabilisatie wordt verkregen.

35 Het tweede aspect van de uitvinding omvat een proteïne-hydrolyse-proces, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad hinderlijk is, waarbij de proteïne-hydrolyse wordt uitgevoerd door middel van het proteolytische middel volgens het eerste aspect van de uit-
 40 vinding.

8102994

Teneinde de chemische stabiliteit van de derivaten te waarderen werd een ALCALASE[®] concentraat gemaleyleerd, gecitraconyleerd en gedimethylmaleyleerd op een soortgelijke wijze als de destabilisatiemethoden aangegeven in de volgende voorbeelden. Alleen de gemaleyleerde en gecitraconyleerde derivaten werden gedestabiliseerd met een destabilisatie van ongeveer 20°C. Deze twee derivaten werden behandeld met fosfaatbuffers, die 2 molair hydroxylamine bevatten, met een pH van 5, 7 en 9 gedurende 24 uren bij ongeveer 25°C.

Gebleken is, dat alleen het gecitraconyleerde derivaat behandeld bij pH 5 de oorspronkelijke stabiliteit herkeeg. Deze bevinding is in overeenstemming met het feit, dat gecitraconyleerde α - en ϵ -aminogroepen in proteïnen meer zuur labiel zijn dan gemaleyleerde α - en ϵ -aminogroepen. Wanneer de destabilisatie een gevolg was van verestering van tyrosyl-, seryl- of treonyl-zijketens dient de hydroxylaminebehandeling bij een pH 9 de oorspronkelijke stabiliteit te regenereren; dit was echter niet het geval.

Het proteolytische middel en de proteïne-hydrolyse-werkwijze volgens de uitvinding zullen worden toegelicht door de volgende voorbeelden, waarbij de voorbeelden I tot VIII het proteolytische middel volgens de uitvinding toelichten en de voorbeelden VIII en IX de proteïne-hydrolyse-werkwijze volgens de uitvinding toelichten.

In sommige voorbeelden is het uitgangsprодукт een subtilisine Carlsberg concentraat, dat wordt aangeduid als ALCALASE[®] concentraat. Dit concentraat wordt voortgebracht door middel van een stam van *B. licheniformis*. De algemene bereidingsmethode blijkt uit het boekje "Enzymer hvorfor det?" van Knud Lundberg, 1972, blz. 108. Het poeder aangegeven in regel 15 is het ALCALASE[®] concentraat. De produktie van een soortgelijk ALCALASE[®] concentraat is aangegeven in voorbeeld I van het Belgische octrooischrift 877.435 of in het Amerikaanse octrooischrift 3.723.250, kolom 12, regels 9 - 16, waarbij het poeder aangegeven op regel 16 overeenkomt met het ALCALASE[®] concentraat. Het ALCALASE^R concentraat is een tussenprodukt voor het in de handel gebrachte protease verkocht onder de naam ALCALASE^R, zie Brits octrooischrift 1.362.365 of Amerikaans octrooischrift 4.106.991, die de produktie van ALCALASE[®] met ALCALASE[®] concentraat als uitgangsprодукт beschrijven.

Voorbeeld I

10 g van een ALCALASE[®] concentraat met proteolytische activiteit van 10,3 Anson-eenheden/g werden gesuspenderd in 250 ml van een 0,1 molaire fosfaatbuffer met een pH van 9,5. Aan de suspensie werd een

8102994

oplossing van 2,5 g maleïnezuuranhydride in 12,5 ml tetrahydrofuran druppelsgewijze gedurende 50 minuten toegevoegd. De pH werd gedurende de druppelsgewijze toevoeging constant op 9,5 gehouden door toevoeging door middel van een pH-staat met 4 N NaOH. Het base-verbruik was 11,3 5 ml. Het gemaleyleerde protease werd nu neergeslagen door toevoeging van 140 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en gelijktijdig werd de pH op 7,5 ingesteld. Het neersgeslagen, gemaleyleerde protease werd afgefiltreerd met 5 g diatoméeënaarde en gedroogd. De opbrengst aan gedroogd produkt was 16,4 g met een activiteit van 7,8 Anson-eenheden/g. Derhalve was de activi- 10 teitsopbrengst ongeveer 124 %.

Voor de bepaling van de activiteit en thermostabiliteit werden oplossingen van onbehandeld en gemaleyleerd protease bereid, waarbij deze oplossingen ongeveer 0,2 Anson-eenheden/l in 1/15 molaire fosfaatbuffer bij een pH van 7,5 bevatten. De aldus verdunde monsters van gemale- 15 yleerd protease werden warm bij 45 respectievelijk 50°C behandeld gedurende 30 minuten, terwijl het monster van onbehandeld protease bij 60°C warm werd behandeld en de residu-activiteit in de met warmte behandelde oplossingen werd bepaald, zie de volgende tabel.

20	protease	warmtebehan- delingstempe- ratuur, °C	residu-activi- teit na 30 mi- nuten, %	destabilisatie, °C (referentietempera- tuur, 60°C)
	gemaleyleerd	45	49,6	
	ALCALASE®	50	4,2	18
25	concentraat			
	onbehandeld			
	ALCALASE®	60	74,8	0
	concentraat			
30				

8102994

Voorbeeld II

Een concentraat van ALCALASE[®] met een activiteit van 9,4 Anson-eenheden/g werd gebruikt voor de bereiding van een 4-procents suspensie in een 1,0 molaire fosfaatbuffer bij een pH-waarde van 9. De 5 Ph van de suspensie was ongeveer 7,5.

Aan drie porties van 50 ml van deze suspensie werden respectievelijk 0,25, 0,3 en 1 g maleïnezuuranhydride opgelost in 1 ml tetrahydrofuran toegevoegd. Deze toevoeging werd uitgevoerd gedurende 1 uur bij een pH-staat regeling (pH 8,5) met 4 N NaOH.

10 Op overeenkomstige wijze werden aan drie andere porties van 50 ml van deze suspensie respectievelijk 0,25, 0,5 en 1 g vast barnsteenzuuranhydride toegevoegd.

De aldus bereide protease-derivaten werden tezamen met een onbehandelde referentie-portie verdund met 1/15 molaire fosfaatbuffer 15 bij een pH van 7,5. Vervolgens werden de verdunde protease-derivaten warm bij 50 en 55°C behandeld, terwijl de verdunde referentie warm bij 60°C werd behandeld. Na de activiteitsbepalingen werden de activiteitsopbrengst, de residu-activiteit na warmtebehandeling en de destabilisatie in °C berekend.

20	protease	dosering van het- acylerings- middel g/g ALCALASE ®	activi- teits- rende- ment, %	Behandeling tempe- ratuur, minu- ten °C	residu- activi- teit,%	destabi- lisatie, °C referen- tietempe- ratuur 60°C	
25		0,125	134	50	30	23,8	14
	gemaleyleerd			55	10	2,5	
	ALCALAE ®			50	30	6,8	17
	concentraat	0,125	137	55	10	0,9	
30				50	30	15,6	
		0,50	114	55	10	0,6	15
	gesuccinylerd	0,125	107	50	30	85,4	4
	ALCALASE ®			55	30	68,1	
	concentraat	0,250	109	50	30	78,9	7
35				55	30	54,6	
				50	30	47,8	
		0,500	122	55	30	15,2	13
	onbehandeld						

8102994

ALCALASE [®]	-	100	60	30	64,2	0
concentraat						

Voorbeeld III

1 g van een ALCALASE[®] concentraat met een activiteit van 10,1 Anson-eenheden/g werd gesuspenderd in 10 ml ionen uitgewisseld water en gefiltreerd. Het filter werd gespoeld met een verzadigde oplossing van natriumacetaat en het volume van het filtraat werd met een verzadigde oplossing van natriumacetaat op 25 ml gebracht.

Aan 20 ml van deze oplossing werden bij ongeveer 5°C 4 x 50 ul azijnzuuranhydride gedurende ongeveer 1 uur toegevoegd. De pH-waarde werd op 8 - 9 ingesteld door middel van vast kaliumcarbonaat gedurende de reactie. Vervolgens werd het reactiemengsel overgebracht naar een meetkolf van 50 ml en het volume werd op 50 ml gebracht door middel van ionen uitgewisseld water.

Monsters geacyleerd protease en van de referentie-oplossing werden met 1/15 molaire fosfaatbuffer (pH 7,5) verdund. De activiteit werd voor en na de warmtebehandeling bepaald, zoals aangegeven in de volgende tabel, waaruit ook activiteitsrendement en destabilisatie bleken.

protease	activiteitsrendement, %	Warmtebehandeling		residu-activiteit na warmtebehandeling, %	destabilisatie, °C (referentietemperatuur 60°C)
		temperatuur, °C	tijd, minuten		
25 geacetyleerd ALCALASE [®] concentraat	71,2	45	30	49,2	17
		50	30	14,4	
onbehandeld ALCALASE [®] concentraat	100	60	30	60,3	0

Voorbeeld IV

3 g *Bacillus pumilus* protease met een activiteit van 1,3 Anson-eenheden/g (NOVOZYM 226, dat verkregen kan worden bij Novo Industri A/S, Novo Allé, 2880, Bagsvaerd, Denemarken) werden gesuspenderd in 75 ml van een 0,1 molaire fosfaatbuffer met een pH van 9,0. Hierbij daalde de pH-waarde tot 5,9. Onder pH-staat regeling bij 8,5 onder toevoeging van 4 N natriumhydroxide werd 0,98 g maleïnezuuranhydride opgelost in 2 ml tetrahydrofuran toegevoegd. De toevoeging werd gedurende 45 minuten

8102994

uitgevoerd. Het mengsel werd 15 minuten bewaard en vervolgens werd de pH-waarde op 7,5 ingesteld.

8102994

Vervolgens werd het reactiemengsel overgebracht naar een meetkolf van 100 ml, die tot de merkstreep werd aangevuld met 1/15 molaire fosfaatbuffer van een pH van 7,5. Vervolgens werden dit monster en een overeenkomend referentiemonster, dat niet met maleïnezuuranhydride was behandeld, verdund tot ongeveer 0,2 Anson-eenheden/l en met warmte behandeld.

Verwezen wordt naar de volgende tabel.

enzym	activiteits- rende- ment, %	Warmtebehandeling		residu-acti- viteit na warmte- behande- ling, %	destabilisa- tie, °C (referentie- temperatuur 60°C
		tempera- tuur, °C	tijd, minuten		
gemaleyleerd					
Bac.pumilus	41,9	45	10	34,4	11
15 protease		50	10	4,0	
onbehandeld					
Bac.pumilus	-	60	10	8,1	-
protease					

20 Voorbeeld V

Overeenkomstig voorbeeld IV werden 3 g van een enzym-concentraat met een activiteit van 8,0 Anson-eenheden/g en bereid door middel van het microorganisme NCIB 10309 volgens het Amerikaanse octrooischrift 3.723.250 gemaleyleerd.

25 Het enzym-concentraat werd op de volgende wijze bereid. De fermentatie werd geïnitieerd bij een pH van 10,1 en na de begingroefase werden de pH-waarde tussen 8,1 en 8,35 en de temperatuur op ongeveer 34°C gehouden. De fermentatie werd gedurende 99 uren aangevoerd. De fermentatie-vloeistof werd gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof werd
30 steriel gefiltreerd en de enzymen werden door toevoeging van Na₂SO₄ neergeslagen. De filterkoek werd aan een sproeidroogbehandeling onderworpen, en gaf het hiervoor vermelde enzym-concentraat met een activiteit van 8,0 Anson-eenhedenm/g.

Verwezen wordt naar de volgende tabel.

8102994

enzym	activi- teits- rende- ment, %	Warmtebehandeling		residu-ac- tiviteit na warmte- behande- ling, %	destabilisa- tie, °C (referentie- temperatuur 60°C
		tempera- tuur, °C	tijd, minuten		
5	gemaleyleerd	31,3	50	30	70,8
	enzym	60	10	8,0	5,2
	onbehandeld				
10	enzym	-	60	30	21,3
					-

Voorbeeld VI

Op soortgelijke wijze als in voorbeeld IV werden 3 g van een ALCA-
LASE[®] concentraat met een activiteit van 10,6 Anson-eenheden/g geci-
15 traconyleerd met 1,12 g citraconzuuranhydride opgelost in 2 ml tetrahy-
drofuran.

Verwezen wordt naar de volgende tabel.

enzym	activi- tiets- rende- ment, %	Warmtebehandeling		residu-ac- tiviteit na warmte- behande- ling, %	destabilisa- tie, °C (referentie- temperatuur 60°C
		tempera- tuur, °C	tijd, minuten		
20	gecitracony- leerd	79,2	45	30	20,5
	ALCALASE [®]	50	10	23,6	20
	concentraat				
	onbehandeld				
25	ALCALASE [®]	-	60	30	56,5
30	concentraat				-

Voorbeeld VII

1 g subtilisine Carlsberg werd opgelost in 50 ml ijskoude 0,1 mo-
laire fosfaatbuffer met een pH van 9,0. Een oplossing van 1,25 g maleï-
35 nezuuranhydride in 10 ml tetrahydrofuran werd bereid. 2 ml van deze op-
lossing werden aan de hiervoor vermelde oplossing van subtilisine
Carlsberg in 35 minuten toegevoegd. De pH-waarde werd constant op 9,5
gehouden met 1 N NaOH door middel van een pH-staat (een totale hoeveel-
heid van 6,0 ml 1 N NaOH werd toegevoegd). De reactietemperatuur was
40 ongeveer 5°C (ijsbad).

8102994

Na een verdere reactietijd van 22 minuten bij pH 9,0 werd de pH-waarde op 7,5 ingesteld met 1 N waterstofchloride. Vervolgens werden 32,5 g ammoniumsulfaat toegevoegd en het neergeslagen enzym werd door filtratie afgescheiden met 0,58 g kiezelgoer als filterhulpstof. Na 5 drogen in een vacuum-exsiccator was het gewicht van het enzym 3,2 g.

Het enzym werd nu geanalyseerd op activiteit en stabiliteit. De resultaten blijken uit de volgende tabel.

Enzym	Activiteit	Warmtebehandeling	Residu-	Destabilisa-
10	Ae/g rende-	temp.°C	activi-	tie, °C
	ment, %	tijd, minuten	teit, %	
gemaley-				
leerd		40	30	37
subtili-	10,0 101			18
15 sine		45	12	27
Carlsberg				
onbehan-				
deld				
subtili-	31,3 -	60	40	15 -
20 sine				
Carlsberg				

Voorbeeld VIII

Dit voorbeeld licht de maleylering toe zonder enig gebruik van te-
25 trahydrofuran.

100 g ALCALASE[®] concentraat werden gesuspenderd in 2500 ml van een 0,1 molaire fosfaatbuffer met een pH van 9,5. Vervolgens werd een totaal van 25 g kristallen van maleïnezuuranhydride in ongeveer 70 mi-
nuten toegevoegd. De pH-waarde werd constant op 9,5 gehouden tijdens de
30 reactie door toevoeging van 117,8 ml 4 N NaOH.

Na voltooiing van de reactie werd de pH-waarde op 7,5 ingesteld door middel van 1 N HCl en het enzym werd neergeslagen met 1500 g ammoniumsulfaat. Het enzym werd door filtratie afgescheiden met 50 g kie-
zelgoer als filterhulpmiddel en werd in een vacuumexsiccator gedroogd.

35 Na drogen was het gewicht van het enzym 168,3 g.

Vervolgens werd het enzym geanalyseerd op activiteit en stabili-
teit. De resultaten blijken uit de volgende tabel.

8102994

Enzym	Activiteit Ae/g	rende- ment, %	Warmtebehandeling temp. °C	tijd, minuten	Residu- activi- teit, %	Destabilisa- tie, °C
5 gemaley- leerd			40	20	32	
ALCALASE®	5,7	89				23
concen- traat			45	12	20	
10 onbehan- deld	10,7	-	60	60	15	-
ALCALASE®						
concen- traat						
15	Dit gedestabiliseerde protease is voor proteïne-hydrolyse met uitstekende resultaten gebruikt. <u>Voorbeeld IX</u> A. Isoëlektrisch oplosbaar sojaproteïne-hydrolysaat werd in het laboratorium bereid volgens de in de voorbeelden I en II van het Amerikaanse octrooischrift 4.100.024 beschreven principes en de experimentele bijzonderheden waren als volgt: 800 ml van een suspensie, die 8,0 % (N x 6,25) sojaproteïne-isolaat (Purina 500 E) bevatte, werden gehydrolyseerd met een subtilisine Carlsberg preparaat, dat onder het handelsmerk ALCALASE® 0,6 L wordt verkocht, bij pH 8,0 onder toepassing van de pH-staat techniek. De enzymdosering was 20 Al/kg substraat en de temperatuur was 40°C. Het base-verbruik werd tijdens de hydrolyse geregistreerd en gebruikt voor het uitzetten van de hydrolyse-kromme, zoals beschreven in Adler-Nissen en Sejr Olsen, ACS Symposium Series, No. 92, blz. 125 - 146, Functionality and Protein Structure, 1979, korthedshalve in het volgende aangeduid als Ref. I. Wanneer een DH-waarde van 10 % was bereikt, werd appelzuur toegevoegd tot een pH van 4,0. Na 30 minuten bij 50°C en pH 4,0 (voor het waarborgen van een volledige inactivering van het enzym) werd de suspensie gecentrifugeerd bij 3000 x g gedurende 15 minuten en de bovenstaande vloeistof werd gefiltreerd en met kool bij pH 5,0 behandeld (pH-regeling met NaOH), zoals beschreven in het Amerikaanse octrooischrift 4.100.024. Het afgewerkte hydrolysaat werd organoleptisch gewaardeerd door ervaren personen onder twee stel verschillende omstandigheden:					

8102994

- a) 4 % (N x 6,25) en pH 6,5
- b) 3 % (N x 6,25), pH 4,5 en 8 % sucrose.

Het eerste stel omstandigheden is optimaal gebleken met betrekking tot de waardering van bitterheid (Ref. I), waarbij het tweede stel omstandigheden een met proteïne verrijkte niet-alcoholisch drank simuleert en optimaal is voor het waarderen van de algemene kwaliteit van het hydrolysaat.

B. Een hydrolyse werd uitgevoerd zoals in deel A van dit voorbeeld, behalve dat het gedestabiliseerde subtilisine Carlsberg van voorbeeld III werd gebruikt in plaats van ALCALASE 0,6 L in een dosering van 15 Ae/kg substraat.

Door middel van de organoleptische waarderingen beschreven in deel A van dit voorbeeld, bleek het hydrolysaat voortgebracht in deel B van dit voorbeeld niet te onderscheiden te zijn van het hydrolysaat in deel A van dit voorbeeld. Beide hydrolysaten bleken als gewenst te zijn, dat wil zeggen zacht, niet bitter en helder. Ook met betrekking tot de proteïne-opbrengst (68 % oplosbaar gemaakt proteïne in deel A van dit voorbeeld en 67 % oplosbaar gemaakt proteïne in deel B van dit voorbeeld) en appelzuur-verbruik (18,6 g tegenover 18,8 g) moeten de twee hydrolysaten als identiek worden beschouwd.

C. Een hydrolyse werd uitgevoerd zoals beschreven in deel B van dit voorbeeld, behalve dat de enzym-dosering 45 Ae/kg substraat was.

De hydrolyse-kromme kan vergeleken worden met de hydrolyse-kromme van voorbeeld VII A, zie fig. 1. Voor elke gegeven waarde van de ordinaat h (Adler-Nissen en Sejr Olsen, Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food, Ann. Nutr. Alim. 32, (1978), 205 - 216, korthedshalve in het volgende aangeduid als Ref. II) ($DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \%$, waarin $h_{tot} = 7,75 \text{ meqv./g}$) kan de verhouding van de hydrolyse-tijden (t) voor de twee krommen berekend worden en gebleken is, dat deze verhouding constant is (dat wil zeggen de variatie is statistisch niet van betekenis indien vergeleken met herhalingen van hydrolysen onder identieke omstandigheden). Dit betekent dat de reactiesnelheid voor elke h -waarde met betrekking tot de oorspronkelijke reactiesnelheid dezelfde is voor de twee experimenten en dit houdt identiteit in met betrekking tot de hydrolyse kinetica, zie de discussies in Ref. II. In vergelijking zullen twee verschillende proteasen vaak aanzienlijk verschillende hydrolyse-krommen laten zien zoals bijvoorbeeld volgens fig. 1 in Ref. I.

CONCLUSIES

1. Proteolytisch middel voor gebruik bij proteïne-hydrolyse-processen, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad hinderlijk is, met het kenmerk, dat het proteolytische middel een Bacillus
5 serine protease is, dat geacyleerd is door middel van een acyleringsmiddel, waarbij een gedestabiliseerd Bacillus serine protease verkregen.

2. Proteolytisch middel volgens conclusies 1, met het kenmerk, dat het Bacillus serine protease subtilisine Carlsberg is.

10 3. Proteolytisch middel volgens conclusies 1 en 2, met het kenmerk, dat het acyleringsmiddel een actief maleïnezuurderivaat is.

4. Proteolytisch middel volgens conclusies 1 en 2, met het kenmerk, dat het acyleringsmiddel een actief derivaat van een monocarbonzuur met 1 tot 6 koolstofatomen is.

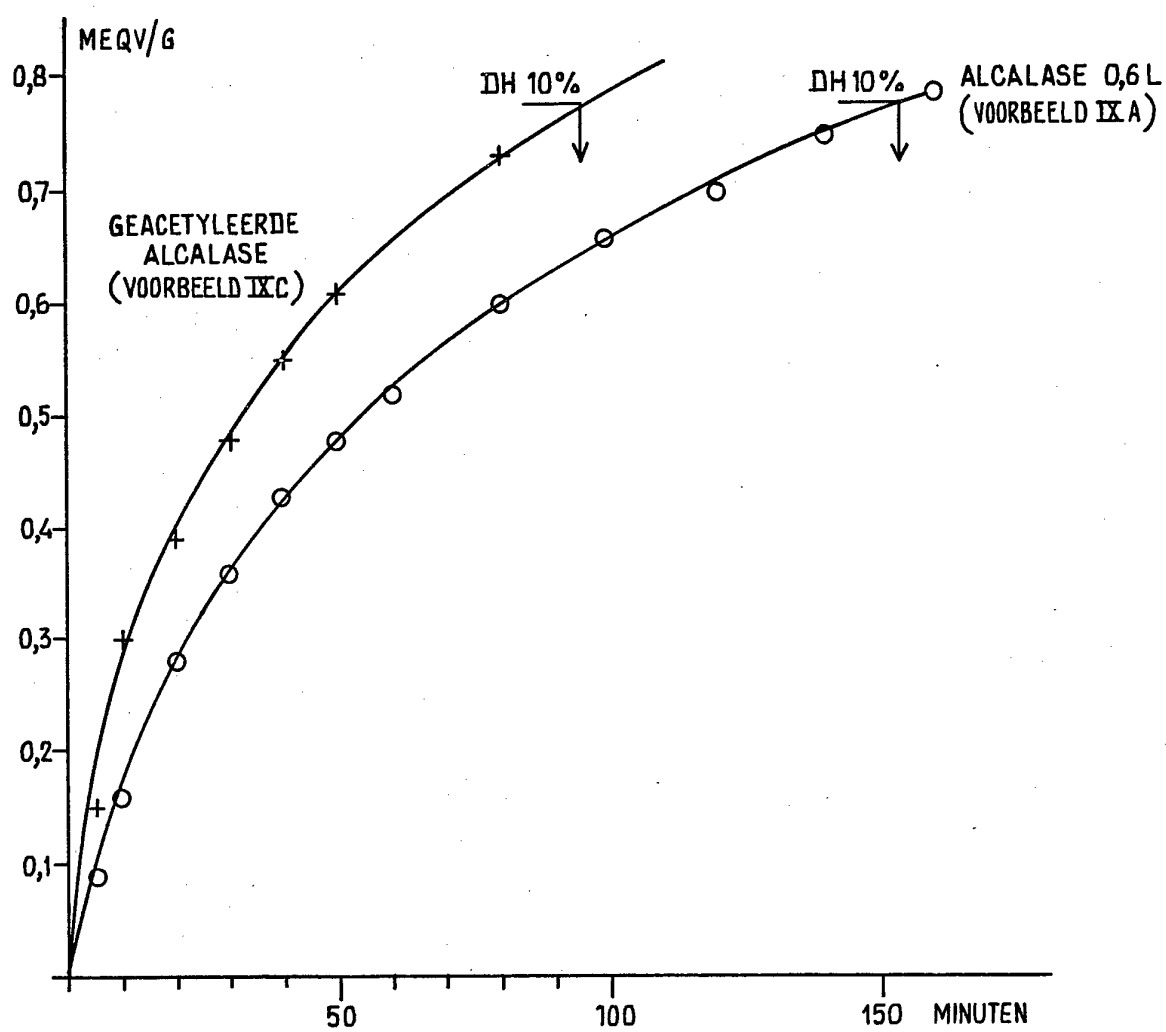
15 5. Proteolytisch middel volgens conclusies 1 tot 4, met het kenmerk, dat de acylering wordt uitgevoerd juist tot de acyleringsgraad, waarbij geen verdere destabilisatie wordt verkregen.

6. Werkwijze voor het hydrolyseren van proteïne, waarbij de aanwezigheid van proteolytische activiteit na beëindiging van de proteïne-
20 ne-hydrolyse tot de beoogde hydrolyse-graad hinderlijk is, met het kenmerk, dat men de proteïne-hydrolyse uitvoert door middel van het proteolytische middel volgens conclusies 1 tot 5.

=====

8102994

Fig.



8102994