



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 148096

(51) Int. Cl.³ A 23 C 7/04

(21) Patentsøknad nr. 781464

(22) Inngitt 26.04.78

(24) Løpedag 07.10.77

(62) Avdelt fra søknad nr. 773432

(41) Alment tilgjengelig fra 10.04.79

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 02.05.83

(30) Prioritet begjært Ingen

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte for smaksforbedrende behandling av melk som er sterilisert ved oppvarming.

(71)(73) Søker/Patenthaver BRIK PAK INC.,
2775 Villa Creek Drive,
Dallas, TX 752349,
USA.

(72) Oppfinner HAROLD E. SWAISGOOD,
Raleigh, NC,
USA.

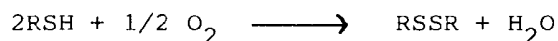
(74) Fullmektig Siv.ing. Audun Kristensen,
J.K. Thorsens Patentbureau, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Svensk (SE) patent nr. 322678 (A23C 3/08)
Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und
-forschung, 134, 1967, s. 97-102
J. of Biol. Chem, Vol. 250, 1975, s. 2532-8.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for behandling av melk som er sterilisert ved oppvarming til omtrent 120°C i omtrent 4 sekunder, hvorved de tiol-grupper som er dannet ved varmebehandlingen fjernes ved sammenføring av den varmebehandlende melk med sulfhydryl-oksidasenzymer som er immobilisert på faste legemer, og det særegne ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er at en sulfhydryl-oksidasenzymsfraksjon, som er oppnådd fra skummet-melk ved fraseparering av material med større, henhv. mindre molekyler og som er immobilisert på faste legemer i form av glasskuler, som før eller etter immobiliseringen og uten vesentlig temperaturforhøyelse er sterilisert ved hjelp av en væske eller en gass, særlig etylalkohol eller etylenoksyd, bringes i kontakt med melken ved at denne ved en temperatur på mellom 20 og 45°C og fortrinnsvis 30 til 35°C får renne over de faste legemer.

Disse trekk ved oppfinnelsen fremgår av patentkravet.

En enzymatisk aktivitet i melk karakterisert ved oksydasjon av sulfhydryl-grupper i cystein, glutation (GSH), og melkeproteiner til tilsvarende disulfider er påvist av Friedrich Kiermeier og Ernst Petz (Z. Lebens.-Unters.-Forsch, bind 132, sider 342-351 (1967); og bind 134, sider 97-102 og 149-156 (1967)). De reaksjoner som katalyseres av de rå preparater ble forslagsvis gitt ved ligningen:



I samsvar med de generelle regler for systematisk og vanlig nomenklatur betegnet de enzymet sulfhydryloksidase.

Det rå enzym ble oppnådd av Kiermeier og Petz fra vallefraksjonen av skummet melk. Deres forsøk på å rense og isolere sulfhydryloksidasenzymer lyktes ikke.

Den foreliggende oppfinnelse er nær knyttet til at det er blitt utviklet en fremgangsmåte for isolering og rensing av sulfhydryloksidaseenzym fra melk som reproduserbart gir preparater med mer enn 3000 ganger så sterk aktivitet som for skummet melk. Sulfhydryloksidase i en vesentlig rensset form er funnet å katalysere oksydasjonen av sulfhydryl-grupper i både mindre kompliserte forbindelser og proteiner under anvendelse av oksygen som oksydasjonsmiddel. Enzymet i en vesentlig rensset såvel som fiksert form er funnet nyttig for behandling av melk for å fjerne den "kokte" smak.

Det er et hovedformål for oppfinnelsen å anvende sulfhydryloksidaseenzymet for behandling av melk med den nevnte "kokte" smak.

Det oppnådde i vesentlig grad rensede sulfhydryloksidaseenzym har en spesifikk aktivitet som er vesentlig og overraskende større enn den som finnes i tidligere rå enzympreparater, og enzymet kan lett anordnes i fiksert tilstand på vilkårlig underlag hvor enzymaktiviteten kan opprettholdes og fornyes.

Som nevnt kan det ved forholdsvis nye prosesser tilveiebringes et sulfhydryloksidaseenzym med en spesifikk aktivitet som er mer enn 1000 ganger større enn for skummet melk, slik at sulfhydryloksidaseenzymet kan isoleres i en vesentlig rensset form ved hjelp av en fremgangsmåte omfattende:

- a) det isoleres en rå uren enzymfraksjon av sulfhydryloksidase fra rå melk
- b) den rå, urene enzymfraksjonen oppløses i en fortynnet nøytral bufferløsning
- c) oppløsningen av uren enzymfraksjon underkastes en modning

- d) den urene enzymfraksjonen underkastes en separasjonsbehandling for å separere en første enzymfraksjon fra materialer med større molekyler.
- e) den første enzymfraksjonen konsentreres for å oppnå en annen enzymfraksjon
- f) den annen enzymfraksjon separeres for å fjerne materialer med mindre molekyler og isolere enzymet derfra.

Det sulfhydryloksidaseenzym som isoleres på denne måte er i en vesentlig rensset form. Betegnelsen "vesentlig rensset form" som anvendt heri betegner sulfhydryloksidase med en spesifikk aktivitet som er minst 50 ganger større enn for den rå enzymfraksjonen som oppnås i vallefraksjonen separert fra skummet melk oppnådd fra rå helmelk. Spesifikk aktivitet som anvendt heri defineres som katalysetakten pr. vektenhet enzym. Den rå enzymfraksjonen kan oppnås på en måte tilsvarende den som er omtalt av Kiermeier og Petz. Rå helmelk behandles for oppnåelse av skummet melk (dvs. fettet separeres fra ikke-fettholdige tørrstoffer). Skummetmelken behandles så for å oppnå vallen ved koagulering av kaseininnholdet deri med rennin. Vallen avkjøles og ammoniumsulfat tilsettes i en mengde tilstrekkelig til å oppnå halvveis metning. Det bunnfall som deretter dannes omhandles heri som den rå urene enzymfraksjonen.

Det rå urene enzym behandles for å gi en vesentlig rensset form av sulfhydryloksidase som kan behandles ytterligere for å oppnå en spesifikk aktivitet som er minst 100 ganger større enn for den rå enzymfraksjonen. Det isolerte enzym oppnådd som angitt ovenfor oppløses i en nøytral bufferløsning for å danne en tredje enzymfraksjon. Enzymet separeres deretter fra materialer med mindre molekyler og isoleres derfra og fremviser økt spesifikk aktivitet i forhold til den ovennevnte isolerte form.

148096

Isolering av i det vesentlige ren sulfhydryl-oksidasen gir et enzym som overraskende har minst 1400 ganger så stor spesifikk aktivitet som den som finnes i skummet melk.

Som et første trinn behandles rå helmelk for å separere fettstoffet fra ikke-fettholdige tørrstoffer ved oppnåelse av skummet melk. Vallen oppnås fra skummet melk ved koagulering av kaseinfraksjonen med rennin. Vallen fjernes, avkjøles og tilsettes til en halvveis mettet løsning av ammoniumsulfat for å fjerne det rå enzym. Tidligere forsøk foretatt av andre for å isolere enzymet ved hjelp av f.eks. gel-kromatografering har ikke lyktes, men behandling i samsvar med det foregående har derimot ført til gode resultater.

Den rå enzymfraksjonen oppnådd som angitt ovenfor oppløses i en fortynnet nøytral bufferløsning (f.eks. en fosfatbuffer) for å holde enzymet stabilt. Enzymet i løsning gis så anledning til å modne (en tidsperiode som muliggjør dissosiasjon av enzymet) foretrukket under avkjølte betingelser.

Oppløsningen underkastes deretter en separasjonsbehandling (f.eks. sentrifugering) for å separere enzymfraksjonen fra materialer med større molekyler. Etter sentrifugering av oppløsningen fjernes enzymfraksjonen sammen med det overliggende væskeskikt. Det overliggende væskeskikt konsentreres så til 2,5 - 3,5% proteinkonsentrasjon ved hjelp av innretninger som f.eks. et ultrafilter. Andre innretninger kan imidlertid anvendes, f.eks. synes tilsetning av tørre molekylsikter, eller vakuum-inndamping å være like godt egnet. En konsentrasjon på minst 2,5% synes å være nødvendig for å øke enzymmolekylstørrelsen ved reassosiering. Enzymfraksjonen gjenvinnes i pelletform (f.eks. ved sentrifugering) hvorved det oppnås separering fra materialer med mindre molekyler. Den aktive enzymfraksjon isolert i den resulterende pellet har en spesifikk aktivitet som er minst 1400 ganger større enn for skummet melk.

Økt spesifikk aktivitet av enzymet oppnås ved å oppløse pelleten inneholdende den ovennevnte enzymfraksjon i en nøytral bufferløsning med omtrent to ganger fortynning (væskevolum) og å utsette den resulterende oppløsning for en separasjonsbehandling for å oppnå en enda renere form av enzymet med så mye som en 3000 gangers økning i den spesifikke aktivitet i forhold til skummet melk.

Den isolerte, vesentlig rensede sulfhydryloksidase kan lagres under avkjøling ved omtrent 4°C uten særlig tap i aktivitet. Den isolerte, vesentlig rensede sulfhydryloksidase fikseres idet den ellers blir en del av reaksjonsblandingen og ikke kan gjenvinnes etter fullført reaksjon. Enzymfikseringer er en fremgangsmåte for å modifisere enzymmolekylet til å begrense sin bevegelse og holde det innenfor et begrenset område. Dette kan ellers oppnås ved en rekke forskjellige metoder som f.eks. adsorpsjon av enzymet på en uoppløselig bærer, videre inneslutning eller inklusjon av enzymet i gel-grunnmasser, eller kovalent kjemisk binding til uoppløselige bærere eller intermolekylær fornetting av enzymmolekylet.

Ved den foreliggende oppfinnelse anvendes en fikseringsmetode for isolert sulfhydryloksidase hvor enzymet fikseres til glasskuler og en egnet metode er beskrevet i Biochem. Biophys. Acta, sidene 243-256 (1974). Da således fiksert sulfhydryloksidase er aktivitetsfølsomt overfor bakterier, varme, pH og tørrhet, er det vesentlig at enzymet under lagring forhindres fra å tørke ut. Foretrukket holdes den fikserte sulfhydryloksidase i en nøytral buffer-løsning (fosfatbuffer) under avkjøling inntil den skal brukes.

Det etterfølgende skal illustrere oppfinnelsen, idet det først forklares nærmere vedrørende oppnåelse og analyse

av sulfhydryloksidasepreparater til bruk ved fremgangsmåten til behandling av melk i henhold til oppfinnelsen.

Rensing av sulfhydryloksidase fra kumelk som reproduserbart gir mer enn 1400 gangers rensing i forhold til skummet melk oppnås ved hjelp av den følgende fremgangsmåte. En konstrasjonsavhengig assosiasjon-dissosiasjon av enzymet ble tilpasset den følgende isolasjonsmetode.

Frisk råmelk ble samlet i glassbeholdere direkte fra kuene ved kveldsmelkingen og øyeblikkelig avkjølt og lagret ved 4°C. Sukrose og ammoniumsulfat med enzymrenhet ble oppnådd fra Schwarz/Mann og akrylamid, NN'-metylen-bisakrylamid, samt N,N,N', N'-tetrametylenetylendiamin, 2-merkapttoetanol og natrium-dodecylsulfat ble erholdt fra Eastman (Rochester, N.Y.). D-galaktose, D-galaktosamin (renhetsgrad I), L-fucose, N-acetylneuraminsyre, EDTA, o-dianisidin, GSH (5,5'-ditiobis - 2-nitro-benzoesyre) og glutathionreduktase (type III) ble erholdt fra Sigma (St. Louis, Mo.). Pepperrot-peroksidase (Worthington peroksidase D), RNase A (krystallisert 5 ganger), og gjær-RNA ble erholdt fra Worthington (Freehold N.J.), og krystallinsk rennin ble erholdt fra Pierce (Rockford, Ill.). Alle metall- og buffersalter var produkter fra Baker med reagensrenhet.

En rå, uren enzymfraksjon fremstilt på en måte tilsvarende den som er beskrevet tidligere av Kiermeier og Petz ble anvendt som et utgangsmaterial. Følgelig ble skummet melk fremstilt fra den rå helmelk ved sentrifugering ved 4080 g i 30 min. v/30°C. Valle (fraksjon B) ble oppnådd fra skummetmelken ved koagulering av kaseinfraksjonen med rennin. Det ble tilsatt omtrent 2 mg. rennin pr. 100 ml skummet melk og reaksjonen fikk foregå i 30 min. ved 30°C. Under disse betingelser hydrolyseres bare Phe 105-Met 106-bindingen i kaseinet. Den resulterende masse ble fjernet ved sentrifugering ved 16300 g i

45 minutter ved 30°C. Vallen ble avkjølt og med en gang innstilt til halvveis metning i ammoniumsulfat ved 4°C. Etter henstand over natten ved 4°C ble bunnfallet (rå-enzym, fraksjon C) fjernet ved sentrifugering ved 16300 g i 60 minutter ved 4°C.

Rått enzym (fraksjon C) ble oppløst i 0,047 M natriumfosfat ved pH 7,0 til å gi en konsentrasjon av 3% protein, og dialysert mot den samme buffer ved 4°C. Denne oppløsning ble fortynnet med bufferen til 0,15% proteininnhold og fikk stå over natten ved 4°C. Hurtigsedimenterende forurensninger (fraksjon D) ble fjernet ved sentrifugering ved 2000 g i 30 minutter ved 4°C, og den resulterende overliggende væskemengde (fraksjon E) ble konsentrert i et 4°C kaldt rom til omtrent 3% proteininnhold med et ultrafiltreringssystem "Amicon TCF-10" under anvendelse av en "Amicon PM-10" membran. Oppløsningen ble på nytt sentrifugert ved 2000 g i 30 minutter ved 4°C, men denne gang viste den enzymatiske aktivitet seg i pelleten (fraksjon F).

Pelleten representerte sulfhydryl-oksidasen i en vesentlig renses form.

Proteiner med mindre molekyler til stede i fraksjon F ble fjernet ved oppløsning av pelleten i det dobbelte volum av den tidligere nevnte løsning, løsningen fikk stå over natten ved 4°C for å fremme dissosiasjon, og sentrifugeringen ble gjentatt ved 2000 g i 30 minutter ved 4°C. Den resulterende pellet (fraksjon H) ble betraktet som det rensede enzym.

Egenskaper av fraksjoner oppnådd ved de forskjellige trinn i denne metode er gjengitt i den etterfølgende tabell I. Aktiviteten ble bestemt fra takten av O₂-forbruk målt ved hjelp av en oscillerende platinaelektrode under anvendelse av 0,8 mM GSH som substrat. En aktivi-

tetsenhet er definert som 1 mikromol O_2 forbrukt pr. minutt i fosfatbuffer ved pH 7,0 og 35°C.

Aktivitetsbedømmelse To bedømmelsesmetoder ble utviklet, den ene basert på forsvinning av sulfhydrylgrupper, og den annen ved O_2 -forbruk. I den første ble konsentrasjonen av sulfhydrylgrupper målt ved reaksjon med DTNB. Med et typisk forsøk inneholdt reaksjonsblandingen 1,5 ml 0,8 mM GSH i 0,047 M natriumfosfat ved pH 7,0 (0,1 ione-styrke) og 0,2 ml enzymløsning. Kontrollen var identisk med unntagelse av at det native enzym var erstattet med 0,2 ml på forhånd kokt enzymløsning. Etter inkubering ved 35°C ble like store prøver på 0,3 ml fjernet ved forskjellige tidspunkter og tilsatt til 9,7 ml 0,017 M natriumfosfat ved pH 8,0. Fra de resulterende løsninger ble 3 ml fjernet og blandet med 20 μ l 0,01 M DTNB i 0,047 M natriumfosfat, pH 7,0. Absorpsjon av denne løsning ble målt ved 412 nm etter 2 minutter. Hastigheten av den enzymkatalyserte reaksjon ble bestemt fra den lineære del av en grafisk fremstilling av sulfhydrylkonsentrasjonen i forhold til tiden.

Ved den andre prøvemethode ble takten for O_2 -forbruket målt ved hjelp av en oscillerende platinaelektrode under anvendelse av en Gilson model K "Oxygraph". Ved et typisk forsøk ble 0,2 ml enzymløsning tilsatt til 1,5 ml 0,8 mM GSH som var blitt modnet ved 35°C i elektrodecellen. Kontrollene inneholdende kokt enzym fremviste intet O_2 -forbruk. Enzymatiske reaksjonshastigheter ble beregnet fra de først oppnådde hellende kurvedeler.

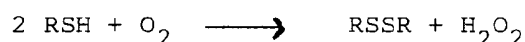
TABELL I
Rensing av sulfhydryl-oksidadase fra kumelk

Fraksjon	Volum	Total aktivitet	Spesifikk aktivitet	Gjenvinning
	ml	enheter	enheter/ mg N	%
Skummet melk	1000	160,0	0,032	100
Rennin -valle	930	153,9	0,174	96
Rått enzym (fraksjon C)	40	151,4	0,756	95
Første sentrifugal-pellet (fraksjon F)	80	96,0	47,1	60
Annen sentrifugal-pellet (fraksjon H)	24	65,1	103,8	41

Fraksjon F fremviste betraktelig høyere aktivitet enn fraksjon C. Gel-kromatografering av fraksjon F ga bare en fraksjon som eluerte i det tomme volum. Prøver av protein eluert fra posisjonene i hvert av båndene i en ufarget gel viste at enzymaktiviteten forekom bare ved toppen av avstandsgelen og ved grenseflaten mellom avstands- og separeringsgelene. De proteiner fra fraksjon F som kom til syne i separasjonsgelen ble effektivt fjernet ved sentrifugering av en noe mer fortynnet løsning. Bare to bånd, som begge var enzymaktive, var påvisbare etter gelelektroforese av fraksjon H. Videre var bare et protein-fargende bånd synlig etter skivegelelektroforese av denne fraksjon i natriumdodecylsulfat. Denne metode til rensing er beskrevet i en artikkel av Janolino og Swaisgood benevnt "Isolation and Characterization of Sulfhydryl Oxidase from Bovine Milk", J. of Biol. Chem., bind 250, nr.7, sidene 2532-2538 (10.april, 1975).

Det synes som om jern er en integrert del av enzymet. Behandling av enzymet med EDTA resulterte i fullstendig tap av aktivitet som deretter kunne etableres på nytt ved dialyse mot 1 μ M ferrosulfat. Videre viste atom-absorbsjonsanalyse og nøytron-aktiveringsanalyse av separate enzym-preparater begge 0,5 atom jern pr. subenhet.

I motsetning til forslagene til Kiermeier og Petz som omtalt tidligere, ble det fra studier vedrørende støkiometrien av reaksjoner katalysert med sulfhydryl-oksidasen funnet at reaksjonen som virkelig katalyseres er reaksjonen med "aerob oksidase" i henhold til ligningen:



Metodene i eksemplene 1 og 2 er blitt gjentatt mange ganger resulterende i et reproduserbart produkt som representerer mer enn en 1400-3000 gangers økning i den spesifikke aktivitet i forhold til skummet melk.

Avhengigheten av temperatur og pH for aktiviteten av det rensede enzym oppnådd i det foregående ble undersøkt under anvendelse av GSH som substrat. Maksimal aktivitet ble iaktatt ved en temperatur på 35°C. En symmetrisk klokkeformet avhengighetskurve for aktiviteten i forhold til pH ble iaktatt, med pH-optimum på 6,8 til 7,0 og tilsynelatende pK_a-verdier på 5,5 og 8,1 som styrte henholdsvis de oppstigende og synkende kurvedeler. 0,2 ml enzym-løsning ble tilsatt til 1,5 ml 0,8 mM GSH som var blitt modnet ved 35°C i elektrodecellen. Kontroller inneholdende kokt enzym fremviste intet O₂-forbruk. Enzym-reaksjonshastigheter ble beregnet fra de oppnådde initial skrå deler av kurven.

Undersøkelser vedrørende molekylvekten av sub-enhetene ble gjennomført for det rensede enzym oppnådd i henhold til det foregående. De rensede preparater fremviste to soner, som begge fremviste aktivitet, etter polyakrylamid-skivegel-elektroforese, men bare en sone etter skivegel-elektroforese i natriumdodecylsulfat. Sulfhydryloksidase ble undersøkt under anvendelse av en rekke akrylamid-konsentrasjoner. Tilsynelatende gjennomsnittlige molekylvekter fra et antall forsøk med det rensede enzym ble bestemt å være 91200 ± 1200, 89800 ± 800, 89800 ± 400, og 89000 ± 1400

ved akrylamidkonsentrasjoner på henholdsvis 5,0, 7,5, 10,0 og 12,5%. For hver konsentrasjon var kalibreringskurven for logaritmen av molekylvekten avsatt mot mobiliteten hovedsakelig lineær. Ved akrylamidkonsentrasjoner på 10 og 12,5% var verdiene oppnådd for fire uavhengige preparater av enzymet meget godt i samsvar med hverandre, og ga en gjennomsnittlig sub-enhetsvekt på 89.000 ± 900 . I hvert tilfelle ble det iakttatt et enkelt proteinbånd ved varierende gel-konsentrasjoner og enzyminnhold.

Undersøkelser vedrørende denne kjemiske sammensetning ble også gjennomført ved bruk av aminosyreanalyse såvel som karbohydratanalyse. Aminosyreanalysen ble gjennomført ved å veie frysetørkede prøver av det rensede enzym i tykkveggede gløderør, og HCl med konstant kokepunkt (omtrent 6N) ble tilsatt. De resulterende oppløsninger ble frosset, avluftet og rørene evakuert og forseglet. Prosentvis fuktighet i de frysetørrede prøver ble bestemt ved tørking til konstant vekt ved 75°C i vakuum over P_2O_5 . Hydrolyse ble gjennomført i et toluenbad ved tilbakeløpstemperatur i 16, 24, 48 og 72 timer og hydrolysaten ble analysert under anvendelse av en aminosyre-analysator av type "Beckman Model 116".

Analyse på såkalt halv-cystininhold ble gjennomført uavhengig som cysteinsyre etter oksydasjon med permaursyre. Tryptofan ble bestemt ved kromatografisk analyse etter enzymatisk hydrolyse med pronase.

I samsvar med karbohydratanalysen ble totalt heksoseinnhold bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyremetoden. Etter hydrolyse i 0,1 N HCl ved 80°C i en time ble sialinsyre ("sialic acid") målt ved hjelp av Aminoff's metode under anvendelse av N-acetylneuraminsyre-standard. Heksosamin ble kvantitativt bestemt etter hydrolyse i 2 N HCl ved 100°C i 16 timer. Galaktosamin ble anvendt som en standard og verdiene gjengitt som N-acetylheksosamin. Fucose

(6-deoksy-L-galaktose) ble bestemt ved hjelp av tioglykolsyre-svovelsyremetoden med fucose som en standard.

Resultatene av analysene på aminosyre og karbohydrat er gjengitt i den etterfølgende tabell II. Disse data viser at omtrent den hele vekt av prøven (97%) utgjøres av aminosyre- og karbohydrat-rester, hvorav 89% representeres av aminosyre-rester og 11% av karbohydrat.

Fiksering av den rensede sulfhydryl-oksidase ble oppnådd ved fiksering av enzymet til glasskuler. Ravfargede glasskuler ble fremstilt fra gammaaminopropyl-glasskuler (40-60 mesh, 2000Å porediameter) levert fra Corning Glass Works, som så ble vasket med destillert vann og modnet i 24 timer i en 0.2 M fosfatbuffer ved pH 4.75. Kulene ble avgasset og 0.5 g av kulene ble det tilsatt krystallinsk 1-etyl-3-dimetylaminopropylkarbodiimid (EDC) og reaksjonen ble gjennomført i 20 minutter ved 25°C og konstant pH på 4,75. Kulene ble så vasket med destillert vann og kald nøytral fosfatbuffer-løsning for å fjerne overskudd av EDC. Det isolerte enzymet (0,1% vekt/volum) i en fosfatbuffer-løsning ble så bragt i kontakt med de gulaktige kuler i mellom 16 og 24 timer hvor-etter kulene ble vasket med 0.1 M fosfatbuffer ved pH 7. Dette resulterte i kovalent binding av det isolerte enzym til glasskulene og dette ga en fiksert sulfhydryl-oksidase. Som tidligere bemerket bør det fikserte enzym når det ikke er i bruk forhindres fra å tørke ut eller utsettes for ekstreme temperaturer ved lagring ved kjøling i en fosfatbuffer-løsning på pH 7.

Reaktivering av fiksert sulfhydryl-oksidase oppnås ved å bringe det deaktiverte fikserte enzym i kontakt med en vandig løsning av ferrosulfat. Som tidligere angitt synes jern å være en integrert del av sulfhydryl-oksidasen. Behandling av enzymet med EDTA resulterte i fullstendig tap av aktivitet som påvist ved hjelp av data i tabell III. Dialyse mot 1 μM Fe^{2+} gjeninnfører 70% av den opprinnelige

TABELL II

Aminosyre- og karbohydrat-sammensetning av renset sulphydryl-oksidase.

Aminosyreverdiene som gjengis er gjennomsnitt for hydrolysetider på 16, 24, 48, og 72 timer, med unntagelse av Thr, Ser, Val, Ile, Leu, Tyr, og Trp. Verdiene for Thr, Ser, og Tyr ble oppnådd ved ekstra-polering til 0 hydrolysetid; verdiene for Val, Ile, og Leu ble bestemt ved ekstra-polering til uendelig hydrolysetid. Verdiene for cys-halvinholdet ble korrigert for antatt 95% gjenvinning av cysteinsyre etter per-maursyreoksydasjon. Trp ble bestemt etter pronase-oppslutning.

Komponent	Rest		Nærmeste hele tall
	μmol/mg	g/100 g antall/89000 g	
Amino-syrer			
Lys	0.504 ± .014	6.46	44.9
His	0.124 ± .004	1.70	11.0
Arg	0.332 ± .012	5.19	29.5
Asp	0.698 ± .001	8.03	62.1
Thr	0.475	4.80	42.3
Ser	0.519	4.52	46.2
Glu	0.811 ± .018	10.47	72.2
Pro	0.416 ± .010	4.04	37.0
Gly	0.845 ± .035	4.83	75.2
Ala	0.967 ± .026	6.88	86.1
Halv-Cys	0.061 ± .001	0.63	5.4
Val	0.630	6.24	56.1
Met	0.082 ± .044	1.08	7.3
Ile	0.360	4.08	32.0
Leu	0.680	7.70	60.5
Tyr	0.203	3.32	18.1
Phe	0.326 ± .012	4.80	29.0
Trp	0.058 ± .005	1.08	5.2
Karbohydrater			
Fucose	0.030	0.44	2.7
Total hekose	0.444 ± .002	7.19	39.5
N-acetylheksosamin	0.143 ± .002	2.90	12.7
N-acetylneuraminsyre	0.013	0.41	1.2

aktivitet. Noen aktivitet kunne også gjenvinnes ved hjelp av Cu^{2+} (30%) eller Mn^{2+} (20%). Det elektroniske absorpsjonsspektrum av det native enzym viste et typisk proteinmaksimum med 278 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 7,41$), men ingen maksima ved lengre bølgelengder; det synes således som om jern ikke er tilstede i form av en heme-prostetisk gruppe. Beregninger basert på atom-absorpsjonsspektral-analyse indikerte nærvær av 0,48 g atom jern og omtrent 0,15 g atom kobber pr. 89000. Nøytronaktiveringsanalyse av et separat preparat ga $11,1 = 0,3 \mu\text{g}$ jern for en 38,5 mg prøve, som tilsvarende 0,46 g atom jern pr. 89000. Kobber kunne ikke bestemmes under de anvendte forsøksbetingelser, og analyse på andre metaller indikerte bare spor av sink og kobolt. Intet molybden eller mangan kunne påvises. Således synes jern å være nødvendig for den enzymatiske aktivitet av sulfhydryl-oksidasen.

Fra den foregående drøftelse og eksemplene sees det at en heldig isolasjonsprosess av enzymproduktet utnytter egenskapene med den konsentrasjonsavhengige assosiasjons-dissosiasjon til å gi et uventet nesten rent enzym med en uvanlig høy grad av spesifikk aktivitet.

Oppfinnelsen har til formål å fjerne den "kokte" smak fra varmebehandlet melk.

Melk oppvarmet til temperaturer over 68°C i forskjellige tidsrom vil få en "kokt" smak. For tiden pasteuriseres eller ultrapasteuriseres melk ved varmebehandling av helmelk ved temperaturer fra $60-74^{\circ}\text{C}$ i tidsrom på fra 30 min. til så lite som 2 sek. En slik behandling er nødvendig for å ødelegge sykdomsfremkallende bakterier og kontrollere aktiviteten av de gjæringsbakterier som finnes i rå helmelk. Alle bakterier i rå helmelk blir imidlertid ikke uskadeliggjort ved en slik behandling og melken har følgelig en begrenset oppbevaringstid og må avkjøles til temperaturer nær 4°C under transport, lagring og salg.

TABELL III

Virkning av metallioner på sulfhydryl-oksidasaktiviteten

Forsøk ble gjennomført i fosfat ved pH 7,0 og 35°C under anvendelse av 0,8 mM GSH som substrat. En delprøve av hoved-enzymløsningen ble fjernet og undersøkt i nærvær av 1,0 mM EDTA. Etter behandling av andre delprøver av hovedoppløsningen med EDTA, ble disse dialysert mot 1,0 mM oppløsninger av de forskjellige metallioner. Kontrollprøver ble fremstilt under anvendelse av kokt enzym og også under anvendelse av dialysatet inneholdende metallionet. I begge tilfeller ble det ikke iaktatt særlig O₂-forbruk.

Behandling	Enzymaktivitet
	umol O ₂ forbrukt/min.
Sulfhydryl-oksidas (kontroll)	0,368
Enzym	
+EDTA (1,0 mM)	0,012
+Ferrosulfat	0,256
+Kobbersulfat	0,109
+Mangan (II)-klorid	0,085
+Kobolt-klorid	0,021
+Sink-sulfat	0,029
+Molybden-dibromid a)	0,008

a) Selv om molybden-dibromid ble anvendt for å fremstille løsningen ble det sannsynligvis oksydert til høyere oksydasjonstilstander.

Det kjennes i dag metoder for fremstilling av melk sterilisert ved ultrahøy temperatur (UHT). Slike prosesser er beskrevet f.eks. av H. Burton, Dairy Science Abst., 31 sider 287-297 (1969) og T.R. Ashton, J. Soc. Dairy Tech., bind 18, nr. 2, sidene 65-83 (1965). Sely om behandling av melk ved UHT har en noe forskjellig mening i USA og Canada forhold til i Europa går behandlingen ut på at melken behandles ved temperaturer på minst 88°C i varierende tidsperioder og generelt ved omtrent 149°C i omtrent 4 sekunder. Uheldigvis utvikler melk når den varmebehandles ved slike høye temperaturer (eller endog lavere for lengre tidsrom) en uønsket og denaturert "kokt" smak slik at melken generelt blir mindre salgbar, spesielt i USA. Det er forsket intenst for å bestemme grunnen til denne "kokte" smak og tilveiebringe metoder for å fjerne denne smak. Både J.T. Hutton et al i J. of Dairy Science, 35, sider 699 (1952) og H. Burton i Proc. 15th International Dairy Congress 3, side 1729 (1952) har gått ut fra at den "kokte" smak i oppvarmet melk skyldes frigivelse av sulfhydrylgrupper i melken. Senere arbeider av Burton (Dairy Sci. Abstr., 31, side 295, 1969) så vel som andre har uttrykt tvil med hensyn til betydningen av fri sulfhydrylgrupper i melk.

Før den foreliggende oppfinnelse var det ikke noen metode kjent for å fjerne den nevnte "kokte" smak som forårsakes av oppvarmingsprosessen for UHT-sterilisert melk eller melk behandlet på lignende måte. I noen tilfeller har intensiteten av den nevnte "kokte" smak blitt redusert, men ikke fjernet ved kjøling. I 1971 ble det solgt anslagsvis 20 millioner tonn melk i USA og hele denne melkenengde krevet omhyggelig avkjøling. Mens sterilisering av melk ville ha de opplagte fordeler med nedsatte krav til energi og drivstoff ved behandling, med økning av produktets lagringsmulighet, slik at forsendelse, salg og lagring kunne foregå med omgivelsenes temperatur, ville nærværet av slik "kokt" smak som i dag forbindes med slik melk

gjøre den generelt uselgelig.

Den erkjennelse som ligger til grunn for den foreliggende oppfinnelse er at denne "kokte" smak som forbindes med varmebehandlet melk kan fjernes ved hjelp av fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen.

Det er således et primært formål for oppfinnelsen å tilveiebringe en fremgangsmåte hvor den nevnte "kokte" smak som forbindes med varmebehandlet melk kan fjernes, slik at det frembringes en salgbar melk som kan transporteres, selges og lagres ved omgivelsenes temperatur uten ødeleggelse og svinn, idet melken vil ha en forlenget mulig lagringstid uten nødvendigheten av avkjøling.

Denne melk vil uten avkjøling ha en god smak som den gjennomsnittlige forbruker ikke kan skille fra nylig pasteurisert, homogenisert melk.

Disse og andre formål for oppfinnelsen vil fremgå av det følgende:

Den "kokte" smak i melk som skriver seg fra at melken utsettes for tilstrekkelig varme i et nærmere angitt tidsrom fjernes ved å bringe den varmebehandlede melk i kontakt med et fiksert sulfhydryl-oksidaseenzym.

Betegnelsen "kokt" smak som anvendt heri refererer til den flaue eller dårlige smak som opptrer ved melk behandlet ved temperaturer generelt over omtrent 68°C. Slik melk kan være ubehagelig både med hensyn til smak og lukt som minner om kokt kål. Mens en slik kålaktig lukt kan forsvinne i løpet av noen dager etter behandlingen av melken, vil den flaue, "kokte" smak bli tilbake og tilslutt frembringe en smak som mindre og mindre kan forbindes med smaken av frisk melk.

Det arbeid som ligger til grunn for den foreliggende opp-

finnelse har vist at den "kokte" smak i melk skriver seg fra reaksjonene med sulfhydryl-grupper i melkeproteinene ved at melken har vært utsatt for varmedenaturering. Sulfhydryloksydaseenzymet oppnådd fra rå helmelk og anvendt ved den foreliggende oppfinnelse katalyserer omdannelsen av sulfhydrylgrupper til disulfider. Oksydasjonen av sulfhydrylgrupper i oppvarmet melk ved kontakt med fiksert sulfhydryloksidase eliminerer den nevnte "kokte" smak.

Bruken av den fikserte sulfhydryl-oksydasekatalysator ved den foreliggende oppfinnelse har den fordel at enzymet oppnås fra hel råmelk og er således en naturlig bestanddel i melken. Bruken av enzymet i den fikserte form medfører videre at det skjer ingen tilsetning til den melk som behandles.

Oppfinnelsen vil ytterligere bli beskrevet ved henvisning til de etterfølgende eksempler.

Eksempel 1

En biokatalytisk reaktor inneholdende fiksert sulfhydryloksidase fremstilles ved å fylle en 6 mm diameter glasskolonne med 1,4 ml sulfhydryl-oksydaseenzym fiksert til glasskuler med en porestørrelse på omtrent 2000Å. Reaktoren er en glasskolonne som inneholder det fikserte enzym og er innrettet til å motta varmebehandlet melk (innløpet) som strømmer gjennom kolonnen og laget av fiksert enzym med passende innretninger for etterfølgende uttømming av melken etter å være bragt i kontakt med det fikserte enzym. Reaktoren kan anordnes slik at den gir en kontinuerlig strømningsprosess ved direkte tilknytning til en enhet for UHT-behandling.

Eksempel 2

Kumelk som har vært utsatt for en temperatur på 149°C i omtrent 4 sekunder har en merkbar "kokt" smak og føres gjennom den biokatalytiske reaktor beskrevet i det foregående med en

temperatur på mellom 30-35°C og en strømningshastighet på omtrent 40 ml/time. Den ubehagelige lukt og "kokte" smak i melken fjernes ved denne behandling.

Prosentvis oksydasjon av sulfhydryl-grupper i varmebe-handlet melk og stabiliteten av reaktoren beskrevet tidligere illustreres ved hjelp av dataene i tabell IV.

TABELL IV

Stabilitet av en sulfhydryl-oksidasereaktor som arbeider med UHT-sterilisert skummet melk.

En 1,4 ml reaktor ble drevet med en strømningshastighet på 40 ml/time ved 35°C.

Driftsdøgn	Varighet av driften (timer)	Prosentvis oksydasjon
Nyfremstilt	5	45
Femte døgn	3	34
Tiende døgn	5	31

Det foretrekkes å anvende glasskuler med en porestørrelse større enn 700Å for å fikserte enzymet for bruk ved be-handling av melk i henhold til den foreliggende oppfinnelse. Mindre porestørrelser gir mer ugunstige resultater, og optimal aktivitet oppnås ved en porestørrelse på omtrent 2000Å.

Man bør unngå å bringe melken og det fikserte enzym i kontakt med hverandre ved høye temperaturer da høye tempe-raturer kan føre til at enzymet taper aktivitet. Kontakt-temperaturer på fra 20-45°C og foretrukket 30-35°C anvendes uten særlig tap av enzymaktivitet ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen.

148096

20

PATENTKRAV

Frengangsmåte for smaksforbedrende behandling av melk som er sterilisert ved oppvarming til omtrent 20°C i omtrent 4 sek., hvorved de tiol-grupper som er dannet ved varmebehandlingen fjernes ved sammenføring av den varmebehandlede melk med sulfhydryloksidaseenzym som er immobilisert på faste legemer, k a r a k t e r i s e r t v e d at en sulfhydryl-oksidasenzymfraksjon, som er oppnådd fra skummet melk ved fraseparering av material med større, henhv. mindre molekyler og som er immobilisert på faste legemer i form av glasskuler, som før eller etter immobiliseringen og uten vesentlig temperaturforhøyelse er sterilisert ved hjelp av en væske eller en gass, særlig etylalkohol eller etylenoksyd, bringes i kontakt med melken ved at denne ved en temperatur på mellom 20 og 45°C og fortrinnsvis 30 til 35°C får renne over de faste legemer.