



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) 324980

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A23L 1/0524 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A23L 1/22 (2006.01)

B01J 13/02 (2006.01)

A23L 1/302 (2006.01)

B01J 13/04 (2006.01)

A23P 1/04 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20034547	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.04.10 PCT/DK02/00238
(22)	Inng.dag	2003.10.09	(85)	Videreføringsdag	2003.10.09
(24)	Løpedag	2002.04.10	(30)	Prioritet	2001.04.10, DK, 0594/01
(41)	Alm.tilgj	2003.12.10			
(45)	Meddelt	2008.01.14			

(73)	Innehaver	BASF AG, 67056 LUDWIGSHAFEN, DE
(72)	Oppfinner	Anders Vagnø Pedersen, Geelsdalen 24, DK-2830 Virum, DK Morten Mohr Hansen, Callunavej 24, DK-3450 Allerød, DK Susanne Lund Madsen, Lodsvej 54 B, DK-2650 Hvidovre, DK Nina Musaeus Jensen, Højgårds Allé 47, DK-2900 Hellerup, DK Carsten Lynggaard Hansen, Stenkær 12, 2765 SMØRUM, DK Annette Strarup Kristensen, Byagervej 19, DK-3460 Birkerød, DK Karin Meyer Hansen, Teglværksvej 3, DK-4681 Herfølge, DK
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO

(54)	Benevnelse	Mikrokapsler, fremgangsmåte for fremstilling av slike samt produkt som innbefatter nevnte mikrokapsler.
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-0017368, WO-A1-0070967
(57)	Sammendrag	

Mikrokapsler innbefattende en aktiv substans innleiret i et matrisemateriale som kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med ett eller flere enzymer valgt fra gruppen bestående av esteraser (E.C.3. 1), glukosidaser (E.C.3.2), peptidaser (E.C.3.4), protease (E.C.3.4) og lyaser (E.C.4), en fremgangsmåte for fremstilling av mikrokapsler og produkter som inneholder slike mikrokapsler.

Foreliggende oppfinnelse vedrører mikrokapsler innbefattende en aktiv substans innleiret i en ny matrisematerialtype, en fremgangsmåte for fremstilling av slike mikrokapsler og produkter innbefattende mikrokapslene.

5

Oppfinnelsens bakgrunn

Naturlig forekommende og modifiserte polysakkarider og naturlig forekommende hydrokolloider slik som alginat, karagenan, gelatin, pektiner, gummi arabicum og
10 akasiegummi, har utbredt anvendelse som matrisematerialer for mikroinnkapslingen av følsomme aktive substanser slik som vitaminer og aroma- og smaksstoffer i matvarer, matvaretilsetninger, farmasøytika og landbruksprodukter for å beskytte dem mot innvirkninger av oksygen, fuktighet og stråling samt fysiske innvirkninger og således for å unngå kjemisk og/eller fysikalsk nedbrytning av nevnte aktive substanser og for å
15 forbedre deres lagringsstabilitet.

De hydrokolloidene som for tiden anvendes som matrisematerialer er hovedsakelig av animalsk opprinnelse, f.eks gelatinøse materialer fra pattedyr og fisk.

20 Mikroinnkapslede produkter basert på anvendelsen av matrisematerialer av animalsk opprinnelse er imidlertid uakseptable for bruk i noen produkter slik som vegetarmatvarer, kosher-matvarer og hallal-matvarer. Videre er det sannsynlig at lovgivningen som bestemmer bruken av matvareprodukter av animalsk opprinnelse vil bli strengere i fremtiden.

25

Det har vært gjort forsøk på å anvende pektinstoffer som potensielle alternativer for matrisematerialer av animalsk opprinnelse, men det er funnet at pektinstoffer slik som sitrus eller sukkerroepektin kun gir en begrenset beskyttelse av mikroinnkapslede aktive substanser mot nedbrytning og således ikke gir mikrokapslede produkter en ønsket
30 lagringsstabilitet.

EP patentsøknad 1 066 761 beskriver innkapslede preparater innbefattende en fettopp-løselig substans innkapslet i et karbohydratmatrise bestående av maltose eller maltose-sirup eller en blanding av karbohydrater av lav molekylvekt slik som maltodekstrin,
35 eventuelt i kombinasjon med et karbohydrat av høy molekylvekt, et emuleringsmiddel og eventuelt et antioksydasjonsmiddel.

US patent 5.998.176 angir en fremgangsmåte for å bevirke geldannelse eller økning av viskositeten til et vandig medium inneholdende et pektinmateriale slik som sukkerroepektin ved behandling av det vandige mediet med en karboksylik esterhydrolase og en oksydase og/eller en peroksydase i nærvær av et oksydasjonsmiddel for bruk med

5 nevnte oksydase og/eller peroksydase. Det er nevnt at de resulterende geldannede eller viskøse produktene er egnet f.eks som fortykningsmidler og/eller stabiliseringsmidler i matvareanvendelser, som et materiale for legemiddelinnkapsling i medisinske

anvendelser og som en vehikkel med langsom frigivningsvirkning i både medisinske og landbruks/hagebruksanvendelser.

10

DK patentsøknad 1991 01060 angir uforgrenede arabaner, f.eks fra sukkerroe, oppnådd ved behandling av sukkerroearaban med α -L-arabinofuranosidase, og deres anvendelse som geldannelsesmidler, som emulgeringsmidler og som innkapslingsmateriale. Sukkerroearabanene som benyttes som enzymsubstrat i denne prosessen oppnås ved en

15 alkalisk behandling av sukkerroemasse, og de urene sukkerroearabanene innbefatter typisk ca 70 – 85 % arabinose, 5 – 10 % uronsyre, 8 – 15 % D-galaktose, og noen prosent rhamnose og andre monosakkarider.

20

WO 00/70967 A1 angir et preparat innbefattende fargestofflegemer som er i det minste delvis belagt med umodifisert pektin valgt fra sukkerroepektin, og jordskokk, fortrinnsvis med en høy acetyleringsgrad.

25

WO 00/17368 beskriver en appelsinfrukt-pektinacetylerase og en fremgangsmåte hvor esterassen bringes i kontakt med et substrat, slik som pektin fra en frukt eller en grønnsak. Forbedrede geldannelsesegenskaper oppnås ved deacetylering av sukkerroepektin med den angitte acetylerasen.

30

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe mikrokapsler innbefattende et matrisemateriale av ikke-animalsk opprinnelse og som er i stand til på effektiv måte å beskytte aktive substanser innleiret i matrisematerialet mot kjemiske og fysiske

innvirkninger.

Oppfinnelsen

35

Mikrokapslene ifølge oppfinnelsen er kjennetegnet ved at matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med ett eller flere enzymer valgt fra gruppen

bestående av esteraser (E.C.3.1.), glukosidaser (E.C.3.2.), peptidaser (E.C.3.4), proteaser (E.C.3.4.) og lyaser (E.C.4).

De forbedrede stabilitetsegenskapene som oppnås med mikrokapslene ifølge oppfinnelsen sammenlignet med mikrokapsler innbefattende et matrisemateriale av ikke-modifisert pektin vil fremgå fra tegningene hvor

Fig 1 viser stabilitetstestresultater oppnådd ved lagring av mikrokapsler ved en temperatur på 25°C og 60 % RH (relativ fuktighet), og

Fig 2 viser stabilitetstestresultater oppnådd ved lagring av mikrokapsler ved en temperatur på 40°C og 75 % RH.

Fig 1 og 2 viser kurver som illustrerer virkningsgraden til mikrokapsler inneholdende vitamin A palmitat innleiret i forskjellige matrisematerialer som en tidsfunksjon.

Det fremgår fra nevnte kurver at mikrokapsler ifølge oppfinnelsen, nemlig innbefattende matrisemateriale som er proteasebehandlet pektin, barbert β -pektin, deacetyleret β -pektin, rhamnogalakouronasebehandlet β -pektin, lyasebehandlet β -pektin, karboksypeptidase A- eller B-behandlet β -pektin, og Flavourzyme 500 LTM behandlet β -pektin samt lyasebehandlet appelsinpektin, utviser betydelig bedre stabiliteter ved lagring både ved 25°C, 60 % RH og ved 40°C, 75 % RH i perioder opptil minst 20 dager sammenlignet med mikrokapsler innbefattende ikke-modifisert pektin som matrisemateriale.

Den heri benyttede betegnelse "mikrokapsler" betyr partikler som hver innbefatter et matrisemateriale hvori det er innleiret et flertall faste eller flytende mikropartikler.

Pektiner er høymolekylvektige polygalaktouronsyrer sammenkoblet av (1 $\Rightarrow$ 4)- α -glykosidiske bindinger hvor noen av karboksylsyregruppene er forestret med metanol og de består av fleksible områder hvor polymerhovedkjeden er rik på rhamnose og har sidekjeder, "hårete områder", av en kompleks natur.

Pektiner innbefatter også "slette områder" som er stive områder hvor hovedkjeden består vesentlig av galaktouronsyre eller galaktouronsyrerester som har meget små sidekjeder slik som metyl- eller etylgrupper.

US patent 5 929 051 inneholder en mer detaljert omtale av den generelle strukturen til pektin og pektinsubstanser slik de forstås.

- Som benyttet i foreliggende sammenheng innbefatter betegnelsen "pektinsubstans"
- 5 pektin, pektinsyre og salter og estere av pektinsyre (pektater) hvorved pektinsubstansen har et galaktouronsyreinnhold på over 40 %.

Galaktouronsyreinnholdet i pektinsubstansen er fortrinnsvis over 50 % og mer foretrukket over 65 %.

10

Matrisematerialet i foreliggende mikrokapsler består fortrinnsvis av pektin, som er behandlet med ett eller flere enzymer som er i stand til å modifisere de hårete områdene, nemlig sidekjedene i pektinets rhamnogalaktouranan-hovedkjede.

- 15 Foretrukne eksempler på slike enzymer er rhamnogalaktouranase, rhamnogalaktourananacetylerase, β -galaktosidase, arabinase, galaktanase og α -arabinofuranosidase.

- Et annet foretrukket matrisemateriale er et pektin som er behandlet med ett eller flere enzymer som kan modifisere hovedkjeden i pektinets slette områder for derved å danne
- 20 separate elementer innbefattende hårete områder.

Eksempler på slike enzymer er pektinlyase og kombinasjoner av polygalaktouronase og pektinmetylesterase.

- 25 De fleste pektiner inneholder proteiner, f.eks i en mengde på ca 1 – 5 % vekt/vekt og det er overraskende funnet at beskyttelseegenskapene til slike proteinholdige pektiner forbedres betydelig dersom de behandles med en protease slik som papain, pepsin og trypsin.

- 30 Pektinmaterialet som skal modifiseres ifølge oppfinnelsen er fortrinnsvis avledet fra betetevekst (Beta vulgaris L. Chenopodiaceae), inkludert sukkerroe, rødbete, bladbete, fôr-bete, spinatbete, sølvbete og fôrroe, eller fra appelsin, drue, soyabønne, linfrø, jord-skokk, selleri og poteter. Sukkerroepektin er en spesielt nyttig pektinsubstans.

- 35 Enzymklassifikasjonssystemet som er benyttet i definisjonen av enzymer for bruk for modifisering av pektinsubstanser ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet i Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, California, med supplementer.

Esterase (E.C.3.1) som utgjør en underklasse til hydrolaser (E.C.3) er enzymer som katalyserer hydrolysen av estergrupper i pektin. Foretrukne esteraser for bruk for modifikasjonen av pektinsubstanser er deacetyleringsenzymer, slik som rhamnogalakto-
5 uronan-acetylerase, pektinacetylerase og pektinmetylesterase.

Glukosidaser (E.C.3.2), som også utgjør en underklasse til hydrolaser (E.C.3) er enzymer som katalyserer hydrolysen av glykosidiske bindinger i pektin. Foretrukne glukosidaser er avgreningsenzymer slik som α -arabinofuranosidase, galaktanase,
10 arabinanase og endo- og ekso-polygalakturonaser. En blanding av α -arabinofuranosidase, galaktanase, rhamnogalakturnase, og arabinanase er særlig nyttig.

Peptidaser og proteaser (E.C.3.4) som også utgjør en underklasse til hydrolaser (E.C.3), katalyserer hydrolysen av peptidbindinger. Foretrukne proteaser er papain, pepsin og
15 trypsin (endopeptidaser) og karboksypeptidase A og B (eksopeptidaser), samt kombinasjoner av endo- og eksopeptidaser, slik som Flavorzyme 500L TM.

Eksempler på egnede kommersielle protaser er Papain 1600 fra Valley Research og Collupulin® fra DSM Gist-Brocades Food Specialities.

20

Lyaser (E.C.4) er enzymer som katalyserer addisjon til dobbeltbindinger. En foretrukket lyase er pektinase PL lyase.

Betegnelsen "deacetyleringsenzym" betyr et enzym som er i stand til å fjerne acetyl-
25 grupper, som er kovalent bundet til galakturonsyrerester i hovedkjeden til pektinets hårete områder.

Betegnelsen "barberingsenzym" eller "avgreningsenzym" betyr enzymer som er i stand til å redusere lengden på sidekjedene i pektins hårete områder.

30

Betegnelsen "pektinesterase" betyr et enzym som er i stand til å fjerne esterrester fra galaktoursyrerester i pektins hovedkjede.

I praksis kan den enzymatiske modifikasjonen av pektinsubstanser utføres som følger:

35

Temperatur og pH for pektinfremstillingen justeres til det benyttede enzymets henholdsvis arbeidstemperatur og arbeids-pH. Enzym oppløses/fortynnes i ionevekslet

vann og tilsettes til pektinfremstillingen. Reaksjon utføres under kontinuerlig omrøring, og pH-verdien blir om nødvendig regulert ved titrering. Etter en viss tid stoppes reaksjonen ved å nedsette pH-verdien. For på irreversibel måte å inaktivere enzymet heves temperaturen til 80°C i 10 min. Oppløsningens temperatur senkes og pektinet utfelles (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet dreneres på en beltepresse og anbringes i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking males pektinet og siktes (DIN 24).

Pektinpreparatet for anvendelse som substrat for enzymbehandling kan være et ekstrakt oppnådd direkte fra råmaterialet f.eks sukkerroeskall eller det kan være en oppløsning av et raffinert pektinprodukt.

Et ekstrakt av sukkerroepektin kan fremstilles som følger:

- 1) Blanding av tørr granulær sukkerroemasse med en vandig oppløsning av en sterk mineralsyre, fortrinnsvis salpetersyre.
- 2) Ekstraksjon av massen under kraftig omrøring i ca 1 til 5 timer ved 60-80°C og pH varierende fra 1,5 til 2,5.
- 3) Separering av den resulterende blandingen i faste avfallstoffer og en væske inneholdende pektin.
- 4) Behandling av væsken inneholdende pektin med enzymer som beskrevet ovenfor.

En pektinoppløsning tilberedes ved tilsetning av pektinpulver til varmt (70°C) ionevekslet vann. Det preparerte produktet omrøres kontinuerlig inntil pektinet er fullstendig oppløst.

De aktive substansene som inneholdes i mikrokapslene ifølge oppfinnelsen kan være en hvilken som helst substans, som under lagring, transport, håndtering og bruk krever beskyttelse, f.eks overfor oksygen, fuktighet, lysstråling og fyskialske innvirkninger, for å unngå fysikalsk og kjemisk dekomponering av substansen. Disse aktive substansene er ytterligere definert som aktive i enten et kjemisk eller biologisk system. Videre kan en beskyttende matrise anvendes for å hindre den aktive substansen i å reagere med andre stoffer som er tilstede i en sammensetning eller med stoffer med hvilke det kan komme i kontakt ved bruk og som ville ha en skadelig innvirkning på den aktive substansen ønsket aktivitet. En beskyttende matrise kan også anvendes for å omdanne væsker og andre stoffer, som er vanskelig å håndtere, f.eks på grunn av kleberlighet, til

en fast form som er egnet for håndtering og prosessering ved bruk, slik som et pulver av mikrokapsler.

Eksempler på aktive substanser egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse er fettopp-
5 løselige stoffer, slik som vitaminer, fettsyrer, f.eks én- og flerumettede fettsyrer, som kan tilsettes i form av fiskeolje inneholdende blant annet (n-3) fettsyrene docosaheksaensyre (DHA) og eicosapentaensyre (EPA), og i form av nattlysolje og ricinusolje inneholdende blant annet (n-6) fettsyren γ -linolensyre, karotenoider, f.eks β -karoten, lutein, lykopen, β -kryptosantin og zeasantin, oljer og fetter; vannoppløselige stoffer slik
10 som vitamin C; enzymer, f.eks amylase, farmasøytiak, slik som griseofulvin, ibuprofen, benzodiazepiner, fenacetin, hormoner og paracetamol, og andre ernæringstilsetninger, slik som mineraler.

Ytterligere aktive stoffer er aroma- og smaksforbindelser.

15 Foreliggende mikrokapslers matrisemateriale kan inneholde konvensjonelle additiver slik som antioksydasjonsmidler, f.eks t-butylhydroksytoluen (BHT), t-butylhydroksyanisol (BHA), ascorbinsyre, ascorbylpalmitat, natriumascorbat, tocoferoler, TBHQ, etoksykin, propylgallat, og ekstrakter fra urter, blant annet rosmarinekstrakt, pudrings-
20 midler, f.eks stiveler, modifiserte stivelser, trikalsiumfosfat, laktose, mannitol, etylcellulose, koagulert albumin, herdet gelatin, kasein, stearat-Ca, stearat-Na, metallsåper, hydrogenert ricinusolje, polyoksyd, talkum, vokser og silikater; antikakedannende midler, f.eks trikalsiumfosfat og silikater, blant annet silisiumdioksyd og natriumaluminiumsilikat; myknere, f.eks karbohydrater og karbohydrataalkoholer, og eksempler
25 på slike er sakkarose, glukose, fruktose, laktose, invertesukker, sorbitol, mannitol, maltodekstrin, glyserin og blandinger derav, fortrinnsvis sakkarose, laktose, maltodekstrin, og blandinger derav.

Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for fremstilling av mikrokapsler inne-
30 holdende en aktiv substans innleiret i en matrise, og denne fremgangsmåten innbefatter trinnene med tilveiebringelse av et vandig medium av en pektinsubstans modifisert ved behandling med ett eller flere enzymer valgt fra gruppen bestående av esteraser (E.C.3.1), glukosidaser (E.C.3.2), peptidaser (E.C.3.4), proteaser (E.C.3.4), og lyaser (E.C.4), tilsetning til nevnte oppløsning av minst én aktiv substans, findeling og tørking
35 av den således oppnådde blandingen for oppnåelse av en masse av partikler som hver inneholder et flertall flytende eller faste mikropartikler av den aktive substansen innleiret i en matrise innbefattende en modifisert pektinsubstans.

Sluttrinnet i den ovenfor beskrevne fremgangsmåten kan utføres ved bruk av konvensjonelle metoder slik som sprøytekjøling, sprøytetørking, modifisert sprøytetørking eller arktørking og knusing, kfr WO 91/06292.

5

Foreliggende oppfinnelse angår også produkter innbefattende de ovenfor beskrevne mikrokapslene. Typiske eksempler på slike produkter er matvarer, matvaretilsetninger, drikker, farmasøytiske og veterinærprodukter, fôr, fôrtilsetninger, produkter for personlig pleie, og husholdningsprodukter.

10

Oppfinnelsen vil nå bli beskrevet mer detaljert under henvisning til følgende eksempler.

EKSEMPLER

15

I eksemplene er molekylvekten (MW) målt ved bruk av kapillærrørmetodeprinsippet som følger:

20

Utløpstiden måles for en pektin/heksametafosfatopløsning og molekylvekten beregnes deretter ved bruk av en velkjent formel (kfr WO 00/58367 pektin med redusert kalsiumsensitivitet, side 12).

25

Utløpstiden måles på to utløp. Dersom forskjellen mellom tidene er mer enn 0,4 sekunder gjentas målingen inntil forskjellene er mindre enn den passende verdien. Utløpstiden som benyttes for molekylbestemmelsen er gjennomsnittsverdien for de ovennevnte identiske eller vesentlig identiske måleresultatene.

Fremstilling av enzymatisk modifiserte pektinsubstanser.

30

Eksempel 1

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer (GENU beta-pektin, lot 92455, produsert av CP Kelco ApS, Lille Skensved, Danmark) og enzymet var papain (Collupulin® papain batch R9741, produsert av DSM Gist-Brocades Food Specialities, Delft, Nederland).

1000 l av ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C, 0,4 M NaCl ble oppløst og 20 g pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C; pH ble justert til 5,50 ved titrering med en 2 % (vekt/vol) NH₃ oppløsning. 240 gram Collupulin ble oppløst i ca 5 ml ionevekslet vann ved omgivelsestemperatur og tilsatt til pektinoppløsningen. Under forsøket ble pH-verdien holdt konstant ved 5,50 ved tritering med 2 % (vekt/vol) NH₃. Etter 20 minutter ble 6127 ml av 2 % (vekt/vol) NH₃ tilsatt, og reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av en 10 % HNO₃ oppløsning til pH 2,50. For å sørge for irreversibel inaktivering av enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgraden (%D(Ac)), forestringsgraden (% DE), galakturonsyreinnhold (% GA) og molekylvekt (MW) for det enzymbehandlede pektinet ble bestemt og de oppnådde resultatene fremgår fra tabell 1.

TABELL 1

	Collupulin-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	19,9
% DE	38,8
% GA	76,9
MW	63000 Da

Eksempel 2

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer (GENO® beta-pektin, lot 82899, produsert av CP Kelco ApS, Lille Skensved, Danmark). De benyttede enzymene var α -arabinofuranosidase (α -ARA) (batch sp 580, PPJ 4494), arabinanase (batch sp 564, PPC 4381) og galaktanase (batch sp 518 PPJ 4368), alle produsert av Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danmark.

1000 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 60°C og 10 kg pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C og pH ble justert til 4,50 ved titrering med en 2 % (vekt/vol) NH₃ oppløsning. 5 gram arabinanase, 35 mg α -arabinofuranosidase, og 35 gram galaktanase ble fortynnet i

ca 1 l ionevekslet vann ved omgivelsestemperatur og tilsatt til pektinoppløsningen. Etter 4 timer ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) HNO₃ oppløsning til pH 3,00. For å sørge for irreversibel inaktivering av enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 20°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en belte-
 5 presse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgraden (%D(Ac)), forestringsgraden (%DE), galakturonsyreinnholdet (%GA), molekylvekten (MW) og det nøytrale sukkerinnholdet i den enzymbehandlede pektinprøven ble bestemt og de oppnådde resultatene fremgår
 10 fra tabell 2.

TABELL 2

Prøve	α -ARA-, arabinanase-, og galaktanase- behandlet sukkerroepektin
% DE	60
% GA	81
MW	66000 Da
% Rhamnose	7
% Arabinose	2
% Galaktose	8
% Andre sukkere	2

15

Eksempel 3

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer, GENU® beta-pektin, lot 92455 produsert av CP Kelco ApS, Lille Skensved, Danmark) og enzymet var rhamnogalaktouronanacetylerase (batch PPJ 4456, produsert av Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danmark).
 20

50 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C, og 1 kg pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Temperaturen ble senket til 50°C, og pH ble justert til 4,50 ved
 25 titrering med en 2 % (vekt/vol) NH₃ oppløsning. 10 gram rhamnogalaktouronanacetylerase ble tilsatt til pektinoppløsningen. Etter 24 timer ved 50°C under kontinuerlig

omrøring ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) HNO₃ oppløsningen til pH 2,50. For å sørge for irreversibel inaktivering av enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgraden (%D(Ac)), forestringsgraden (% DE), galakturonsyreinnholdet (% GA) og molekylvekten (MW) ble bestemt og de oppnådde resultatene fremgår fra tabell 3.

10 TABELL 3

Prøve	Rhamnogalakturonan-acetylerase-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	15,2
% DE	52,7
% GA	72,5
MW	57500 Da

Eksempel 4

15

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer (GENU® beta-pektin, lot 82899 produsert av CP Kelco ApS, Lille Skensved, Danmark) og enzymet var rhamnogalakturonase (batch PPJ 4478, produsert av Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danmark).

20

50 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C og 1 g pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Temperaturen ble senket til 50°C og pH ble justert til 4,50 ved tritering med en 2 % (vekt/vol) NH₃ oppløsning. 3125 gram rhamnogalakturonase ble oppløst i ca 50 ml ionevekslet vann og tilsatt til pektinoppløsningen. Etter 4 timer ved 50°C ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) HNO₃ oppløsning til

25 pH 2,50. For å sørge for irreversibel inaktivering av enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og til slutt ble pektinet siktet (DIN 24). Acetyleringsgraden (% D(Ac)), forestrings-

graden (% DE), galakturonsyreinnholdet (% GA) og molekylvekten (MW) ble bestemt og de oppnådde resultatene fremgår fra tabell 4.

TABELL 4

5

Prøve	Rhamnogalakturonase-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	16,5
% DE	58,7
% GA	81,1
MW	64000 Da

Eksempel 5

- 10 I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroe (batch nr 30003, type SF H-25, produsert av CPKelco, Germany GmbH, Grossenbrode, Tyskland) og enzymet var Enzeco Pectinase PL lyase fra Enzyme Development Corporation, batch nr S-11677, aktivitet 26 U/ml.
- 15 55 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C og 2,75 kg pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C; pH ble justert til 4,50 ved titrering med en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning. 1,63 ml Enzeco Pectinase PL lyase ble tilsatt til pektinoppløsningen. Under forsøket ble pH-verdien holdt konstant ved 5,5 ved titrering med 5 % (vekt/vol) soda.
- 20 (viskositetskonstant, 9 cP) ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning til pH 2,50. For å sørge for irreversibel aktivering av enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C, inndampet til halve mengden ved følgende prosedyre: oppløsningen ble overført til et fordampningsapparat. Varmer ble tilført under vakuum ved 0,8 bar, og
- 25 oppløsningen vil nå kokepunktet (ca 60°C). Oppløsningen ble avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgraden (% D(Ac)), forestringsgraden (% DE), galakturonsyren (% GE) og molekylvekten (MW) for det enzymbehandlede
- 30 pektinet ble bestemt og resultatet fremgår fra tabell 5.

TABELL 5

Prøve	Pectinase PL lyase-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	22,5
% DE	51,7
% GA	70,0
MW	17.900 Da

5 **Eksempel 6**

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer (GENU beta pektin, lot 30003, produsert av CP Kelco, Germany GmbH, Grossenbrode, Tyskland) og enzymet var karboksypeptidase B fra Sigma, batch nr 108H7406, aktivitet 176 u/mg.

10

40 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C og 1,6 kg pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C; pH ble justert til 7,50 ved titrering med en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning. 21 mg karboksypeptidase B ble tilsatt til pektinoppløsningen. Under forsøket ble pH-
 15 verdien holdt konstant ved 7,5 ved tritering med 5 % (vekt/vol) soda. Etter 24 timer ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning til pH 2,50. For på irreversibel måte å inaktivere enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og
 20 anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgrad (% D(Ac)), forestringsgrad (% DE), galakturonsyre (% GA) og molekylvekt (MW) for det enzymbehandlede pektinet ble bestemt og resultatene fremgår fra tabell 6.

25

30

TABELL 6

Prøve	Karboksyptidase B-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	24,6
% DE	51,8
% GA	72,9
MW	69100 Da

5 Eksempel 7

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer (GENU beta pektin, lot 30003, produsert av CPKelco, Germany GmbH, Grossenbrode, Tyskland) og enzymet var karboksyptidase A fra Sigma, batch nr 127H7445, aktivitet 50 u/mg.

10

40 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C og 1,6 kg pektin ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C; pH ble justert til 7,50 ved tritering med en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning. 21 mg karboksyptidase A ble tilsatt til pektinoppløsningen. Under forsøket ble pH-verdien holdt konstant ved 7,5 ved tritering med 5 % (vekt/vol) soda. Etter 24 timer ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning til pH 2,50. For på irreversibel måte å inaktivere enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgrad (% D(Ac)), forestringsgrad (% DE), galakturonsyre (% GA) og molekylvekt (MW) for det enzymbehandlede pektinet ble bestemt og resultatet er angitt i tabell 7.

20

TABELL 7

Prøve	Karboksyptidase A-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	17,8
% DE	37,5
% GA	74,6
MW	14,100 Da

5 Eksempel 8

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra sukkerroer (GENU beta pektin, lot 30003, produsert av CPKelco, Germany GmbH, Grossenbrode, Tyskland) og enzymet var Flavorzyme 500L™ fra Novozymes, Danmark, batch nr HPNO1200 med en aktivitet på 500 LAPU/g.

50 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C og 2 kg pektinsubstans ble tilsatt under omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C; pH ble justert til 5,50 ved titrering med en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning. 15 l Flavorzyme 500L ble tilsatt til pektinoppløsningen. Under forsøket ble pH-verdien holdt konstant ved 5,5 ved titrering med 5 % (vekt/vol) soda. Etter 4 timer ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning til pH 2,50. For på irreversibel måte å inaktivere enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (DIN 24). Acetyleringsgrad (% D(Ac)), forestringsgrad (% DE), galakturonsyre (% GA) og molekylvekt (MW, kapillærrørmetode) for det enzymbehandlede pektinet ble bestemt og resultatet er angitt i tabell 8.

TABELL 8

Prøve	Flavorzyme-behandlet sukkerroepektin
% D(Ac)	22,8
% DE	55,0
% GA	73,8
MW	61000 Da

5 Eksempel 9

I dette eksemplet var pektinsubstansen avledet fra appelsin (batch nr 1001-69-1, produsert av CPKelco, Limeira, Brasil) og enzymet var Enzeco Pectinase PL lyase fra Enzyme Development Corporation, batch nr S-11677, aktivitet 26 U/ml.

10

55 l ionevekslet vann ble oppvarmet til 70°C og 940 gram pektinsubstans ble tilsatt under kontinuerlig omrøring. Etter at pektinet var fullstendig oppløst ble temperaturen senket til 45°C; pH ble justert til 4,50 ved titrering med en 10 % sodaoppløsning. 0,50 ml Enzeco Pectinase PL lyase ble tilsatt til pektinoppløsningen. Under forsøket ble pH-verdien holdt konstant ved 5,5 ved titrering med 5 % (vekt/vol) soda. Etter 1,5 timer ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av en 10 % (vekt/vol) sodaoppløsning til pH 2,50. For å irreversibel måte å inaktivere enzymet ble temperaturen hevet til 80°C. Etter 10 minutter ved 80°C ble oppløsningen avkjølt til 50°C, inndampet til halve mengden ved følgende prosedyre: oppløsningen ble overført til evaporatoren. Varmer ble tilført under vakuum ved 0,8 bar og oppløsningen vil nå kokepunktet (ca 60°C). Oppløsningen ble avkjølt til 50°C og det modifiserte pektinet ble utfelt (1:3) i 80 % 2-propanol. Det utfelte pektinet ble drenert på en beltepresse og anbragt i et tørkekammer ved 70°C i 24 timer. Etter tørking ble pektinet malt og siktet (24 DIN). Acetyleringsgrad (% D(Ac)), forestringsgrad (% DE), galakturonsyre (% GA) og molekylvekt (MW) for det enzym-behandlede enzymet ble bestemt og resultatet fremgår fra tabell 9:

25

TABELL 9

Prøve	Pectinase PL lyase-behandlet appelsinpektin
% D(Ac)	2,4
% DE	68,9
% GA	87,5
MW	25.400

5 Fremstilling av mikrokapsler

Mikrokapslene ble fremstilt ifølge nedenstående oppskrift.

1.000,00 gram vann

10 92,9 gram (modifisert) pektin

797,0 gram sukker

12,6 gram natriumascorbat

400,0 gram vitamin A palmitatolje

20,40 gram α -tocoferol.

15

Sammenligningseksempel

92,9 gram sukkerroepektin (GENU® beta-pektin type BETA, lot HF 72-097-0 fra CP
 20 Kelco ApS, Lille Skensved, Danmark) og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann
 ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0
 gram vitamin A palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet
 til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløs-
 ningen av pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring og deretter utsatt
 25 for sterk omrøring ved 10.000 omdr/min ved bruk av Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i
 60 minutter ved 65°C. Den sluttelige emulsjonen ble fortynnet med 975 ml 65°C vann til
 en viskositet på 150 cP (målt med Brookfield Viscometer type HAT, spindel HA1). Den
 gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 1,40 μ m (Malvern Mastersizer
 Long bed ver. 2.19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen
 30 forstøvet i et sprøytetårn, hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av

emulsjonen ble sprøytet. Etter sortering på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkel-
formig produkt med en virkningsgrad på 105.000 IU/g (Prøven ble forsåpet med 50 %
KOH, 96 % etanol og en 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan.
Mengden av vitamin A ble målt ved HPLC, Hichrom LiChrosorb CN 5,5 µl, 250 mm x
5 4,0 mm mot en ekstern standard).

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt
i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/
75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk
10 på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	70 %	17 %
14 dager:	51 %	0,3 %
21 dager:	43 %	0 %

15 Eksempel 10

92,9 gram Collupulin-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 1
og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6
gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 million
20 IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den olje-
holdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker
og natriumascorbat under langsom omrøring og deretter ble den utsatt for sterk
omrøring ved 10.000 omdr/min ved bruk av Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60
minutter ved 65°C. Sluttemulsjonen ble fortynnet med 10.000 ml 65°C vann til en
25 viskositet på 155 cP (målt med Brookfield Ciscometer type HAT, spindel HA1). Den
gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 1,09 µm (Malvern Mastersizer
Long bed ver 2.19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble oppløsningen
forstøvet i et sprøytetårn, hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av
emulsjonen ble sprøytet. Etter sortering på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkel-
30 formig produkt med en virkningsgrad på 278.000 IU/g (prøvene ble forsåpet med 50 %
KOH, 96 % etanol og 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan).

Mengden av vitamin A ble målt ved HPLC (Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 µl, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern standard).

- 5 Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt i det nedenstående:

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	96 %	100 %
14 dager:	100 %	77 %
21 dager:	93 %	0,1 %

- 10 Som det fremgår fra disse resultatene var foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet langt mer overlegen enn disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

15 Eksempel 11

- 92,9 gram α -ARA, arabinanase, og galaktanase-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 2 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring deretter utsatt for sterk omrøring ved 10.000 omdr/min ved bruk av Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter ved 65°C. Sluttemulsjonen ble fortynnet med 1050 ml 65°C vann til en viskositet på 155 cP (målt med Brookfield Viscometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige dråpestørrelsen ble målt til å være 1,28 µm (Malvern Mastersizer Long bed ver. 2.19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i et sprøytetårn hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprøytet. Etter sikting på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en virkningsgrad på 224.000 IU/g (prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol og 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av

vitamin A ble målt ved bruk av HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 µl, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern standard).

- Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (5 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/45 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt i det nedenstående:

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	101 %	102 %
14 dager:	97 %	96 %
21 dager:	89 %	0,4 %

- Som det fremgår fra disse resultatene var foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet langt overlegen i forhold til disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

Eksempel 12

- 92,9 gram rhamnogalakouronanacetylerase-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 3 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 millium IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring og deretter sterkt omrørt ved 10.000 omdr/min med Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter ved 65°C. Sluttemulsjonen ble fortynnet med 800 ml 65°C vann til en visositet på 150 cP (målt med Brookfield Viscometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 1,59 µm (Malvern Mastersizer Long bed ver. 2,19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i et sprøytetårn hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprøytet. Etter sikting på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en virkningsgrad på 252.000 IU/g (prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol og en 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av vitamin A

ble målt med HPLC, Hichrom LiCrosorb CN-5, 5 µl, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern standard).

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	70 %	17 %
14 dager:	51 %	0,3 %
21 dager:	43 %	0 %

Som det fremgår fra disse resultatene var foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet langt overlegen i forhold til disse egenskapene til det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

Eksempel 13

92,9 gram rhamnogalakouronase-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 4 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring og deretter gitt sterk omrøring ved 10.000 omdr/min med Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter ved 65°C. Sluttemulsjonen ble fortynnet med 980 ml 65°C vann til en viskositet på 150 cP (målt med Brookfield viskometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 1,64 µm (Malvern Mastersizer Long bed ver. 2,19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i et spraytårn, hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprayet. Etter sikting på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en virkningsgrad på 218.000 IU/g (prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol og en 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av vitamin A

ble målt med HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5 5 µl, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern standard).

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	102 %	100 %
14 dager:	97 %	91 %
21 dager:	91 %	0,5 %

Det fremgår fra disse resultatene at foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet var langt overlegen i forhold til disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

Eksempel 14

92,9 gram Pectinase PL lyase-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 5 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjons-tank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palminat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring. Deretter ble det foretatt sterk omrøring ved 10.000 omdr/min med Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter ved 65°C. Sluttemulsjonen viste en viskositet på 155 cP (målt ved Brookfield viskometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 0,83 µm (Malvern Mastersizer Long bed ver. 2,19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i et sprøytetårn, hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprayet. Etter sikting på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en virkningsgrad på 349.000 IU/g (prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol og en 10 % natriumascorbat-oppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av vitamin A ble målt ved bruk av HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 µl, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern standard).

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	99 %	92 %
14 dager:	96 %	1,1 %
21 dager:	94 %	0,8 %

Det fremgår fra disse resultatene at foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet var langt overlegen i forhold til disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

Eksempel 15

92,9 gram karboksypeptidase B-modifisert sukkerroeppektin fremstilt som beskrevet i eksempel 6 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocopherol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring og deretter utsatt for sterk omrøring ved 10.000 omdr/min ved bruk av Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter i 65°C. Sluttemulsjonen ble fortynnet med 1151 ml 65°C vann til en viskositet på 155 cP (målt med Brookfield viskometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 0,83 μ m Malvern Mastersizer Long bed ver. 2,19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter emulsjonen forstøvet i et sprøytetårn hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprøytet. Etter sortering på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en virkningsgrad på 222.000 IU/g. Prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol, og en 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av vitamin A ble målt med HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 μ l, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern standard.

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

5

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	97 %	96 %
14 dager:	96 %	93 %
21 dager:	90 %	0,0 %

Det fremgår fra disse resultatene at foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet var langt overlegen i forhold til disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

10

Eksempel 16

92,9 gram karboksypeptidase A-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 7 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjons-
 15 tank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring og det hele ble
 20 utsatt for sterk omrøring ved 10.000 omdr/min ved bruk av Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter ved 65°C. Sluttoppløsningen viste en viskositet på 100 cP (målt med Brookfield viskometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige oljedråpe-
 størrelsen ble målt til å være 1,77 μ m (Malvern Mastersizer Long bed ver. 2,19, brenn-
 vidde 45 mm, strålelengde 2,6 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i et spraytårn,
 25 hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprayet. Etter sikting på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en
 virkningsgrad på 331.000 IU/g (prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol og en
 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av vitamin A ble
 30 målt med HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 μ l, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern
 standard.

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

5

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	99 %	98 %
14 dager:	95 %	94 %
21 dager:	84 %	2,0 %

Som det fremgår fra disse resultatene var foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet langt overlegen i forhold til disse egenskapene til det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

10

Eksempel 17

92,9 gram Flavorzyme-modifisert sukkerroepektin fremstilt som beskrevet i eksempel 8
 15 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,0 l vann ved 65°C i en emulsjonstank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 gram DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass. Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert pektin, sukker og natriumascorbat under langsom omrøring og deretter utsatt for sterk omrøring ved
 20 10.000 omdr/min med Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60 minutter ved 65°C. Slutt-emulsjonen ble fortynnet med 1093 ml 65°C vann til en viskositet på 155 cP (målt med Brookfield viskometer type HAT, spindel HA1). Den gjennomsnittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 1,50 μ m (Malvern Mastersizer Long bed ver. 2,19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i et sprøytetårn
 25 hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av emulsjonen ble sprøytet. Etter sikting på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkelformig produkt med en virkningsgrad på 203.000 IU/g (prøven ble forsåpet med 50 % KOH, 96 % etanol og en 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan. Mengden av vitamin A ble målt med HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 μ l, 250 mm x 4,0 mm mot en ekstern
 30 standard).

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

5

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	100 %	100 %
14 dager:	82 %	90 %
21 dager:	68 %	0,0 %

Det fremgår fra disse resultatene at foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet var langt overlegen i forhold til disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

10

Eksempel 18

92,9 gram Pectinase PL lyase-modifisert appelsinpektin fremstilt som beskrevet i
 15 eksempel 9 og 797,0 gram sakkarose ble oppløst i 1,08 l vann ved 65°C i en emulsjons-
 tank og 12,6 gram natriumascorbat tilsatt. En blanding av 400,0 gram vitamin A
 palmitat 1,7 million IU/g og 20,4 DL- α -tocoferol ble oppvarmet til 65°C i et begerglass.
 Den oljeholdige blandingen ble tilsatt til den vandige oppløsningen av modifisert
 pektin, sukker og natriumascorbat under langsam omrøring og deretter ble sterk
 20 omrøring utført ved 10.000 omdr/min med Ultra Turrax (Ultra Turrax T50) i 60
 minutter ved 65°C. Sluttemulsjonen ble fortynnet med 37 ml 65°C vann til en viskositet
 på 155 cP (målt med Brookfield viskometer type HAT, spindel HA1). Den gjennom-
 snittlige oljedråpestørrelsen ble målt til å være 1,84 μ m (Malvern Mastersizer Long bed
 ver. 2,19, brennvidde 45 mm, strålelengde 2,4 mm). Deretter ble emulsjonen forstøvet i
 25 et sprøytetårn hvor dråpene ble dekket med stivelse og tørket. Bare en del av
 emulsjonen ble sprøytet. Etter sortering på mesh 30/120 ga dette ca 1 kg partikkel-
 formig produkt med en virkningsgrad på 313.000 IU/g. Prøven ble forsåpet med 50 %
 KOH, 96 % etanol og en 10 % natriumascorbatoppløsning og ekstrahert med heptan.
 Mengden av vitamin A måles ved HPLC, Hichrom LiChrosorb CN-5, 5 μ l, 250 mm x
 30 4,0 mm mot en ekstern standard.

Produktets stabilitet ble undersøkt som følger: ca 0,2 gram produkt ble veiet og anbragt i en liten åpen glassbeholder (15 x 10 mm) og holdt ved 25°C/60 % R.H. og ved 40°C/75 % R.H. i 3 uker. Prøver ble analysert ved start, etter 7, 14 og 21 dager med henblikk på virkningsgrad. De oppnådde resultatene er angitt nedenfor:

5

Virkningsgrad:	25°C/60 % R.H.	40°C/75 % R.H.
Start:	100 %	100 %
7 dager:	99 %	97 %
14 dager:	98 %	87 %
21 dager:	93 %	1 %

Fra disse resultatene fremgår det at foreliggende preparats virkningsgrad og stabilitet var langt overlegen i forhold til disse egenskapene for det tidligere kjente preparatet i sammenligningseksemplet.

10

P a t e n t k r a v

1.

Mikrokapsler innbefattende en aktiv substans innleiret i et matrisemateriale,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at matrisematerialet kan oppnås ved
behandling av en pektinsubstans med ett eller flere enzymer valgt fra gruppen bestående
av esteraser (E.C.3.1), glukosidaser (E.C.3.2), peptidaser (E.C.3.4), proteaser (E.C.3.4)
og lyaser (E.C.4).

10 2.

Mikrokapsler ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med ett eller flere
enzymer som kan modifisere de hårete områdene.

15 3.

Mikrokapsler ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d
at matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med ett eller flere
enzymer som kan modifisere de slette områdenes hovedkjede for derved å danne
separate elementer innbefattende hårete områder.

20

4.

Mikrokapsler ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med papain, pepsin
eller trypsin.

25

5.

Mikrokapsler ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at
matrisematerialet kan oppnås ved behandling av pektinsubstansen med papain, slik som
Collupulin®.

30

6.

Mikrokapsler ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
matrisematerialet kan oppnås ved behandling av pektinsubstansen med en eksopepti-
dase, slik som karboksypeptidase.

35

7.

Mikrokapsler ifølge krav 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med et deacetylerende enzym.

5

8.

Mikrokapsler ifølge krav 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med et avgrenings-enzym.

10

9.

Mikrokapsler ifølge krav 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at matrisematerialet kan oppnås ved behandling av en pektinsubstans med en blanding av α -arabinofuranosidase, galaktanase og arabinanase.

15

10.

Mikrokapsler ifølge krav 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at matrisematerialet kan oppnås ved behandling av pektinsubstansen med en lyase, slik som pektinase PL lyase.

20

11.

Mikrokapsel ifølge hvilket som helst av krav 1-10, k a r a k t e r i s e r t v e d at pektinsubstansen er avledet fra et vegetabilsk materiale.

25

12.

Mikrokapsel ifølge hvilket som helst av krav 1-10, k a r a k t e r i s e r t v e d at pektinsubstansen er avledet fra appelsin, drue, sukkerroe, soyabønne, linfrø, jordskokk, selleri, poteter og rødbeter.

30

13.

Fremgangsmåte for fremstilling av mikrokapsler inneholdende en aktiv substans innleiret i et matrisemateriale, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter trinnene med tilveiebringelse av et vandig medium av en pektinsubstans modifisert ved behandling med ett eller flere enzymer valgt fra gruppen bestående av esteraser (E.C.3.1), glukosidaser (E.C.3.2), peptidaser (E.C.3.4), proteaser (E.C.3.4) og lyaser (E.C.4), tilsetning til nevnte oppløsning av minst én aktiv substans, findeling og tørking av den således oppnådde blandingen til oppnåelse av en masse av partikler som

35

hver inneholder et flertall væskeformige eller faste mikrokapsler av den aktive substansen innleiret i en matrise innbefattende den modifiserte pektinsubstansen.

14.

- 5 Produkt, k a r a k t e r i s e r t v e d at det innbefatter mikrokapsler ifølge hvilke som helst av krav 1-12.

15.

- 10 Produkt ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er en matvare, et matvareadditiv, en drikk, et farmasøytisk eller veterinærprodukt, et fôr eller fôradditiv, et produkt for personlig pleie eller et husholdningsprodukt.

Figur 1

Vitamin A virkningsgrad, %

Dager

Legend:

- Beta-pektin umodifiseret
- Rhamnogalakturnonase-behandlet
- *--- Flavourzyme 500 L behandlet
- ◇--- Protease-behandlet
- ▲--- Lyase-behandlet
- x--- Appelsinpektin
- ◇--- Barbert
- Karboksy-peptidase B-behandlet
- x--- Karboksy-peptidase A-behandlet
- Deacetyleret

Figur 2

