



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 56822

C (45) Patentti myönnetty 10 04 1980
Patent meddelat

(51) Kv.lk.²/Int.Cl.² **C 07 C 59/17**
C 12 D 1/02

(21) Patenttihakemus — Patentansöknin	825/73
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	16.03.73
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	16.03.73
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	25.09.73
(44) Nähtävölkäpanon ja kuul.julkalsun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.12.79
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	24.03.72

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2214442.9

- (71) Boehringer Mannheim GmbH., Sandhofer Strasse 112-132, 6800 Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (72) Hans Ulrich Bergmeyer, Tutzing/Obb., Dieter Jaworek, Tutzing/Obb., Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Menetelmä glukosin muuttamiseksi glukonihapoksi - Förfarande för att omvandla glukos till glukonsyra

Keksinnön kohteena on menetelmä glukosin muuttamiseksi glukonihapoksi hapettamalla glukosia hapella vesiliuoksessa.

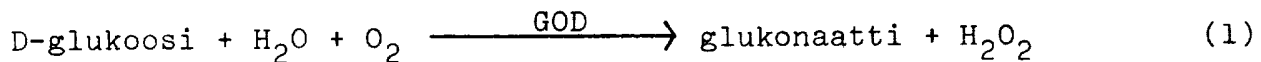
Glukosin muuttamisella glukonihapoksi on suuri merkitys useita teknisiä tarkoituksia varten. Pääasiassa on tällöin kysymys ongelmista, joita esiintyy glukosin erottamisessa ja poistamisessa glukosipitoisista seoksista muiden aineiden, erikoisesti muiden sokerien kuten fruktoosin kanssa, ja toisaalta glukonihapon valmistusmenetelmästä. Glukosin erottaminen on erikoisongelma, esimerkiksi sokereista, jotka vielä sisältävät pieniä glukosimääriä, mitkä ovat erittäin vaikeasti poistettavissa. Tyypillinen tällainen tapaus on fruktoosin valmistaminen ruokavaliotarkoituksia varten ja lääkkeeksi, jolloin on usein erittäin vaikeaa saada glukosipitoisuus niin pieneksi kuin lain määräykset vaativat. Samanlaisia ongelmia esiintyy valmistettaessa ravintoaineita, erikoisesti sokeritautisille tarkoitettuja, kuten esimerkiksi hedelmämehuja, olutta, viiniä ja sentapaisia, joiden valmistuksen yhteydessä esiintyy suurta tarvetta yksinkertaisista menetelmistä niiden sisältämän sokerin poistamiseksi. On tunnettua, että glukosi voidaan muuttaa glukonihapoksi hapettamalla hapella vesiliuoksessa glukosioksideksi-entsyymin katalyyttisesti vaikuttaes-

sa. Tätä menetelmää ei kuitenkaan voida soveltaa tekniikassa, koska glukoosioksidaasi-entsyymi menettää tällöin hyvin nopeasti aktiivisuutensa ja on niin kallista, että tarvittavien suurien määrien käyttö on käytännöllisesti katsoen mahdotonta.

Keksinnön tarkoituksena on poistaa edellä esitetyt vaikeudet ja aikaansaada glukoosin muuttamiseksi glukonihapoksi yksinkertainen menetelmä, jossa tunnetun menetelmän haitat on vältetty.

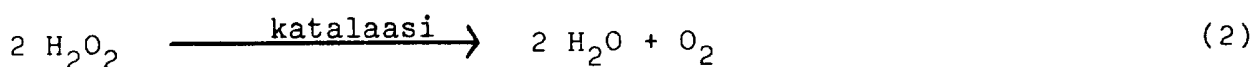
Tämä ongelma ratkaistaan keksinnön mukaan ottamalla käyttöön sellainen menetelmä glukoosin muuttamiseksi glukonihapoksi hapella vesiliuoksessa hapettamalla, missä glukoosipitoinen vesiliuos johdetaan sellaisen katalyytin kautta, joka sisältää glukoosioksidaasia ja katalaasia aktiviteettisuhteessa enintään 1:1 välittömästi toistensa läheisyydessä sidottuna sopivaan kantajaan, jolloin muutos suoritetaan pH-arvossa 5-7 ja lämpötilassa 25-50°C.

Glukoosin entsyymaattinen muuttaminen glukonihapoksi hapella hapettamalla glukoosioksidaasin (GOD) läsnäollessa tapahtuu seuraavan yleisen kaavan mukaisesti:



Liuetetun entsyymin GOD käyttö mainittuun reaktioon on teknisesti kannattamatonta, koska tätä kallista entsyymiä voidaan käyttää vain yhteen ainoaan reaktioerään, ja valmistuserissä on lisäksi entsyymivalvauksen erotus tarpeen. Teoreettisesti olisi tosin mahdollista välttää nämä vaikeudet siten, että entsyymiä GOD käytetään liukenevammattomaan kantajaan sidottuna. On kuitenkin ilmennyt, ettei tämä ole käytännössä suoritettavissa, koska kantajaan sidottu GOD, vaikka se on helposti erotettavissa, muuttuu hyvin lyhyen ajan kuluttua tehottomaksi.

Lähtien siitä olettamuksesta, että tämän tehottomaksi muuttumisen ainakin osaksi aiheuttaa muodostunut vetyperoksidi, on koetettu välttää mainittu hankaluus lisäämällä katalaasi-entsyymiä reaktioerään. Katalaasi hajottaa peroksidin katalyyttisesti muodostamalla happea ja vettä seuraavan yhtälön mukaisesti:



Suoritettut kokeet osoittivat kuitenkin, ettei katalaasinkaan läsnäolo estä entsyymien GOD nopeata tehottomaksi muuttumista.

Sen vuoksi yritettiin kantajaan sidotun entsyymin GOD ohella käyttää kantajaan sidottua katalaasia seoksena kantajaan sidotun ent-

syymän GOD kanssa. Mahdollisimman läheisen kosketuksen ja siten äskettäin muodostuneen vetyperoksidin pikaisen poiston aikaansaamiseksi kumpikin entsyymi kiinnitettiin hienojakoiseen kantajaan, ja saatuja hienojakoisia kantajia käytettiin keskenään sekoitettuna. Myöskään tällä tavalla ei kuvailtuja hankaluuksia voitu poistaa, joten oli oletettava, ettei vetyperoksidinmuodostuksella ole mitään ratkaisevaa vaikutusta todettuun entsyymän GOD nopeaan tehottomaksi muuttumiseen.

Yllättävästi on nyt todettu, että esitetty ongelma voidaan ratkaista käyttämällä, kuten edellä on mainittu, glukoosioksidaasia ja katalaasia yhdessä aktiviteettisuhteessa enintään 1:1 sidottuna sopivaan kantajaan. Tämä keksinnölle olennainen tunnusmerkki tarkoittaa sitä, että kantajassa sijaitsee sidottuna ainakin likimain yksi GOD-molekyyli yhden katalaasimolekyylin vieressä. Oletettiin, että tällöin molekyylialueella tapahtuu jonkinlainen kiertoreaktio, jossa yhdisteen GOD muodostama H_2O_2 tulee välittömässä läheisyydessä sijaitsevan katalaasin hajottamaksi ennen kuin H_2O_2 voi vaikuttaa toiseen GOD-molekyyliin.

Edellä esitetyistä kaavoista ilmenee, että keksinnön mukaista menetelmää käytettäessä lisähapetta tarvitaan vain suurehkojen glukoosipitoisuuksien ollessa kyseessä, koska esiintyvä happi aina muodostuu uudelleen. On kuitenkin osoittautunut edulliseksi johtaa lisähapetta myös siinä tapauksessa, että käsiteltävän liuoksen glukoosipitoisuus ei olennaisesti ylitä liuoksen lämpötilan edellyttämää happipitoisuutta moolisuusarvon suhteen. Tässä tapauksessa voidaan lisäämällä hapetta liuokseen saada aikaan huomattava reaktion kiihdytys. Keksinnön mukainen menetelmä voidaan suorittaa ilman happilisiä, jos reaktionopeus asetetaan suhteeseen happipitoisuuden kanssa. Tämä voi tapahtua aikaansaamalla kosketus kantajaan liitettyjen entsyymien kanssa kromatografian tapaan pylväässä vastaavasti pienellä virtausnopeudella tai esimerkiksi kierrättämällä glukoosipitoinen liuos toistuvasti katalyytin kautta.

Siinä tapauksessa, että glukoosipitoinen liuos rikastetaan hapella, voi tämä tapahtua lisäämällä siihen puhdasta hapetta tai hapetta sisältäviä aineita, erikoisesti kaasuja kuten ilmaa. Edullisinta on hapen lisääminen ilman suurehkoja määriä muita kaasuja.

Keksinnön mukainen menetelmä on suoritettava pH-arvoissa 5-7, jossa entsyymit glukoosioksidaasi ja katalaasi ovat aktiivisia. Suurin aktiivisuus mitattiin useissa kokeissa pH-arvojen ollessa välillä 5-5,5. Suurinta aktiivisuutta vastaava pH-arvo riippuu myös entsyymien alkuperästä, esim. käytetäänkö homesienistä lähtöisin olevaa katalyytiä, jota pidetään edullisimpana, tai nisäkäsmaksakatalyytiä.

Halutun pH-arvoalueen ylläpitäminen voi tapahtua kemian tavanmukaisten pH-arvonsäätömenetelmien mukaisesti, mikäli ne eivät haitallisesti muuta entsyymien aktiivisuutta. Hyviä tuloksia on saatu lisäämällä emäsluoksia, kuten erikoisesti alkalimetallien emäksisesti reagoivia yhdisteitä, esim. natronlipeää, natriumkarbonaattiliuosta, kalilipeää jne. Myös orgaaniset emäkset ovat osoittautuneet samalla tavalla pH-arvonsäätöön soveltuviksi.

Erittäin tarkoituksenmukaiseksi on osoittautunut pH-arvon pitäminen vakiona edullisen pH-arvoalueen sisäpuolella. Tällainen vakionapitäminen voi tapahtua esimerkiksi automaattisen titrauksen avulla käyttämällä lasielektrodia ja pH-staattia. pH-elektrodin mittaustulosten mukaan pH-staatti avaa venttiilin, joka säätää emäsliuoksen, kuten esim. natronlipeän juoksutusta reaktioastiaan.

Keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan lämpötilassa 25-50°C, jossa entsyymien aktiivisuus on teknisesti käyttökelpoista suuruusluokkaa. Korkeammassa lämpötiloissa tapahtuu entsyymien huomattava denaturoituminen, ja alemmissa lämpötiloissa reaktionopeus tulee liian hitaaksi.

Keksinnön mukainen menetelmä voidaan suorittaa valmistuserittäin tai jatkuvasti toimivana. Keksinnön mukaisen menetelmän valmistuserittäin suoritettava sovellutusmuoto voidaan toteuttaa erittäin yksinkertaisesti siten, että sopivaan reaktioastiaan, joka sisältää glukosipitoisen vesiliuoksen, lisätään keksinnön mukaan käytettävää katalyyttiä ja annetaan sen olla liuoksessa kunnes haluttu reaktio on tapahtunut. Tarkoituksenmukaista on tällöin hämmentää liuosta tavanmukaisesti, jota varten on osoittautunut erikoisen edulliseksi hapen sisäänjohtaminen, joka aikaansaa toisaalta halutun hapen rikastumisen ja toisaalta liuoksen sekoittumisen. Reaktion päätyttyä katalyytti poistetaan esimerkiksi linkoamalla, dekantoimalla tai muulla tavalla. Katalyyttiä voidaan sen jälkeen käyttää uudelleen ilman enempää toimenpiteitä, ja myös itse käsiteltyä liuosta voidaan sellaisenaan käyttää edelleen, esimerkiksi jos ovat kyseessä glukosipitoiset mehut ja sentapaiset.

Keksinnön mukaisen menetelmän erään toisen sovellutusmuodon mukaan reaktio tapahtuu kiertoprosessina. Tämä tekee mahdolliseksi menetelmän erikoisen yksinkertaisen ohjauksen. Sitä paitsi voidaan tällä tavalla erottaa muodostunut glukonihappo ja poistaa siten tasa-

painosta, niin että reaktio tapahtuu erittäin nopeasti ja kvantitatiivisesti. Glukonihapon erottaminen voi tapahtua tavanmukaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi sitomalla anioninvaihtimeen, muuttamalla vaikealiukoiseksi suolaksi tai muuksi johdannaiseksi tahi erottamalla muita tunnettuja fysikaalisia tai kemiallisia menetelmiä käyttäen.

Tässä sovellutusmuodossa on erikoisen tarkoituksenmukaista glukonihapon poisto anioninvaihtotietä. Koska kiertoprosessin jatkuvassa reaktiossa keksinnön mukaista katalyyttiä käytetään samoin tarkoituksenmukaisesti pylväissä, joiden kautta käsiteltävä liuos virtaa, voidaan menetelmä suorittaa yksinkertaisesti liittämällä peräkkäin vähintään kaksi pylvästä, ensimmäisen pylvään sisältäessä keksinnön mukaisen katalyytin ja toisen pylvään sisältäessä anioninvaihtohartsin.

Keksinnön mukaisesti käytettävää katalyyttiä saadaan kiinnittämällä entsyymien GOD ja katalaasin seosta sopivaan kantajaan vesiliuoksesta. Sopivia kantajia ja kiinnitysmenetelmiä on esitetty esimerkiksi saksalaisissa patenttihakemuksissa P 19 08 290 ja P 21 28 743. Kulloinkin käytetyn kantajan laatu ei ole tällöin kriittinen, mikäli vain GOD ja katalyytti sijaitsevat toistensa välittömässä läheisyydessä kantajaan sidottuna.

Entsyymien GOD aktiivisuuden suhde katalaasin aktiivisuuteen kantajassa ei saa ylittää arvoa 1:1. Sopivimmin pitäisi suhteen olla 1:10 tai pienempi. Erittäin hyviä tuloksia on saavutettu aktiivisuussuhteilla aina arvoon 1:200 saakka. On kuitenkin oletettavissa, että vielä olennaisesti pienemmätkin aktiivisuussuhteet tuottavat samoin erinomaisia tuloksia. Pienen aktiivisuussuhteen, ts. sidotun katalaasiaktiivisuuden suuren arvon verrattuna GOD-aktiivisuuteen, etuna on, että hapentarve tällöin olennaisesti vähenee. Tämä hapentarpeen pieneminen perustuu hapen jälleenmuodostumiseen vetyperoksidista yhtälön (2) mukaisesti.

Keksinnön mukaisella menetelmällä glukosin muuttamiseksi glukonihapoksi ja glukosin erottamiseksi sitä sisältävistä vesiliuoksista on muihin tunnettuihin kemiallisiin menetelmiin nähden etuna toiminnan absoluuttinen täsmällisyys ja erinomainen yksinkertaisuus. Keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää myös silloin, kun hyvin suuret määrät kemiallisesti samankaltaisia aineita on läsnä. Niinpä se tekee mahdolliseksi pienien glukosimäärien erottamisen liuoksista, jotka sisältävät ylivoimaisesti enemmän muita sokereita, kuten esim. fruktoosia. Keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan siis ratkaista tehtäviä, jotka eivät olleet ratkaistavissa aikaisemmin tunnetuilla kemiallisilla ja fysikaaliskemiallisilla menetelmillä. Keksinnön

nön mukaisen menetelmän käyttömahdollisuudet ovat erittäin moninaiset, ulottuen elintarvikkeista, juomista ja sentapaisista suoritettavasta glukoosinpoistosta glukoosivapaitten preparaattien valmistukseen lääketieteellisuutta varten ja glukonihapon tekniseen valmistukseen. Menetelmän erikoisetuna, käytettäessä sitä glukoosinpoistoon juomista kuten hedelmämehuista, oluesta, viinistä ja sentapaisista, on, että vaikka muodostunut glukonihappo voidaan helposti poistaa, sitä ei tarvitse poistaa, koska se itse on makuaine, joka edullisesti tasoi-
taa käsiteltyjen juomien makuominaisuuksia.

Seuraavassa selostetaan kantajaan sidotun GOD-katalaasin valmistus keksinnön mukaista menetelmää varten.

A.

50 mg tavallista kaupasta saatavaa GOD-valmistetta, jonka ominaisaktiivisuus on 220 U/mg, liuotetaan 1 ml:aan 0,5 M trietanoli-amiini/HCl-puskuria, pH 8,0, liuokseen lisätään siihen tyyppä johtaan lämpötilassa 30°C 0,25 akryylihappo-2,3-epoksi-propyyliesteriä, ja seosta hämmennetään noin 30 minuutin ajan mainitussa lämpötilassa. Sen jälkeen seos jäädytetään lämpötilaan 10°C. 18 ml:aan tislattua vettä liuotetaan peräkkäin 3,0 g akryyliamidia, 0,1 g N,N'-metyyleeni-bis-akryyliamidia ja 300 mg entsyymivalmistetta, jonka GOD-aktiivisuus on 20 U/mg ja katalaasiaktiivisuus 260 U/mg, ja liuos kaadetaan reaktio-astiaan. Sitten polymerointireaktio saatetaan alkuun lisäämällä 50 mg bentsoyyliperoksidia ja 0,5 ml 5 %:ista N,N-dimetyyliaminopropionitriililiuosta. Polymeroitumisen päätyttyä (n. 1 tunnin kuluttua) jätetään seos seisomaan 12-18 tunniksi lämpötilassa 4°C. Muodostunut polymeraatti painetaan sen jälkeen reikäkoon 4 mm omaavan siivilän lävitse, pestään ja kuivataan. Kantajaan sidottujen entsyymien ominaisaktiivisuus on:

GOD: 281 U/mg (fotometrinen GOD-koe kirjallisuusviitteen H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Bd. I, S.416 (1970) mukaan). Katalaasi: 185 U/mg (vapautuneen hapen manometrinen määräys).

Saadusta valmisteesta käytetään seuraavassa merkintää GOD-katalaasi A.

B.

1,5 g entsyymivalmistetta, jonka GOD-aktiivisuus oli 20 U/mg ja katalaasiaktiivisuus 260 U/mg, sekä 50 mg katalaasia, jonka ominaisaktiivisuus oli 39 000 U/mg, liuotettiin 15 ml tislattua vettä ja 7,5 ml 1 M trietanoliamiini/HCl-puskuria, pH 8,0, käsittelevään seokseen. Sen jälkeen lisättiin 1,25 ml akryylihappo-2,3-epoksi-propyyliesteriä lämpötilassa 30°C typpi-atmosfäärin alaisena. Seosta hämmenne-

tään sitten kevyesti 30 minuutin ajan tässä lämpötilassa, se jäähdytetään lämpötilaan 10°C , ja siihen lisätään liuos, joka sisältää 15 g akryyliamidia ja 0,75 g N,N'-metyleeni-bis-akryyliamidia 73 ml:ssa tislattua vettä. Polymerisaatio saatetaan alkuun lisäämällä 3 ml 5 %:sta ammoniumperoksidisulfaattiliuosta ja 3 ml 5 %:ista dimetyyliaminopropionitriililiuosta. Työskentelyä jatketaan samoin kuin kokeessa A. Saadun GOD-katalaasin ominaisaktiivisuus on:

GOD: 95 U/g (fotometrisesti)

Katalaasi: 4200 U/g (fotometrisesti kirjallisuusviitteen H.U. Bergmeyer, "Methoden der enzymatischen Analyse", Bd. I, S.339 (1970) mukaan).

Tästä GOD-katalaasi-valmisteesta käytetään seuraavassa nimitystä GOD-katalaasi B.

Seuraavat esimerkit selittävät keksintöä edelleen.

Esimerkki 1

Menetelmän suoritus valmistuserittäin

20 g (0,11 moolia) fruktoosia ja 1,1 g (0,0055 moolia) glukosihiydraattia liuotettiin veteen kunnes liuoksen tilavuus oli 200 ml. Liuos kaadettiin termostaatilla säädettyyn reaktioastiaan, johon asetettiin lämpötila 35°C . Reaktioastiassa sijaitsi pH-elektrodi, joka oli yhdistetty pH-staatin kautta 0,2 N NaOH-liuoksella täytettyyn byrettiin. pH pidettiin vakioarvossa 5,5 siten, että sen pyrkiessä alenemaan reaktion kuluessa muodostuneen glukonihapon vuoksi reaktioastiaan annettiin automaattisesti virrata vastaava määrä natriumhydroksidia.

Reaktioastia käsitti lisäksi puhdistimella varustetun hapenjohtoputken, jonka kautta johdettiin 10 l happea tunnissa.

Fruktoosi-glukoosi-liuokseen lisättiin nyt 250 mg kantajaan sidottua entsyymiä GOD, jonka ominaisaktiivisuus oli 300 U/g. 50 minuutin välein määritettiin liuoksen glukoosipitoisuus. 100 minuutin kuluttua oli 20 % liuokseen viedystä glukoosista muuttunut glukonihapoksi.

Eräässä toisessa kokeessa toistettiin edellä selostettu menettelyä sillä erotuksella, että liuokseen vietiin lisäksi 2 mg katalaasia, jonka ominaisaktiivisuus oli 40 000 U/mg. 100 minuutin kuluttua oli glukoosinmuutos 30 % ja 200 minuutin kuluttua 40 %. Reaktioajan ollessa vielä pitempi tuli GOD tehottomaksi, eikä sitä voitu enää aktivoida.

Vielä eräässä kokeessa seurattiin keksinnön mukaista työskentelytapaa. Meneteltiin jälleen samoin kuin edellisessä kokeessa,

paitsi että kantajaan sidotun entsyymin GOD ja liuotetun katalaasin sijasta lisättiin edellä mainittua GOD-katalaasi-valmistetta A määrässä 250 mg. 100 minuutin kuluttua muutos oli noin 50 %, 200 minuutin kuluttua 70 % liuokseen viedyn glukoosin määrästä. Entsyymin tehottomaksi muuttumista ei tapahtunut, ja muutosreaktiota jatkaen voitiin käytännöllisesti katsoen kaikki glukoosi muuttaa glukonihapoksi.

Edellä selostettu menettely toistettiin vielä kerran käyttämällä yllämainittua GOD-katalaasi-valmistetta B. 100 minuutin kuluttua oli noin 40 % ja 200 minuutin kuluttua 94 % glukoosista muuttunut glukonihapoksi. 220 minuutin kuluttua oli enemmän kuin 99 % glukosista muuttunut.

Edellä selostetut koetulokset osoittavat, että keksinnön mukaisesti menetellen saavutetaan olennaisesti alhaisemmista entsyyminaktiivisuuksista huolimatta verrattomasti parempia muuttumistuloksia. Sitä paitsi ei keksinnön mukaisesti menetellen esiinny mitään huomattavaa katalyytin epäaktiiviseksi muuttumista, kun taas vertauskokeissa, jotka suoritettiin ilman katalaasia ja liuotettua katalaasia käyttäen, tapahtui suurista entsyyminaktiivisuuksista huolimatta entsyymin nopea palautumaton epäaktiiviseksi muuttuminen.

Esimerkki 2

Jatkuva muutosreaktio

1 g kantajaan sidottua GOD-katalaasi-valmistetta B suspendoitiin tislattuun veteen, ja suspension annettiin turvota. Sen jälkeen suspensio vietiin pylväaseen, jonka sisäläpimitta oli 20 mm ja pituus 5 cm. Tämän pylvään lävitse johdettiin liuos, joka sisälsi 50 g fruktoosia ja 2,75 g glukoosihydraattia 500 ml:ssa vettä ja jonka kautta pulputettiin ilmaa lämpötilassa 25°C, virtausnopeudella 1,2 l tunnissa. Reaktioliuoksen läpivirtauksen jälkeen pH säädettiin 0,2 N natronlipeällä jälleen arvoon 6,5, happea johdettiin lävitse, ja sen jälkeen liuoksen annettiin uudelleen kiertää pylvään kautta. Yhtä kierrätystä kohti muuttui 100-120 mg glukoosia glukonihapoksi. 23 kierrätyksen jälkeen oli enemmän kuin 99 % glukoosista muuttunut.

Esimerkki 3

Esimerkin 2 mukainen menettely toistettiin muuten paitsi että entsyymipylvään perään liitettiin anioninvaihtopylväs (asetaattilisäyksellä varustettua yhdistettä IMAC A 27), ja pH-arvon säätäminen natronlipeää lisäämällä jätettiin pois. Anioninvaihtopylvästä poistuva liuos sisälsi enää vain 0,036 % glukonihappoa laskettuna fruktoosin määrästä.

Esimerkki 4

Seuraavassa selostettu koe osoittaa, että glukoosinmuutoksen nopeus riippuu suhteesta glukoosi:GOD-katalaasi-katalyytti liuoksessa.

Samoin kuin esimerkin 1 valmistuserittäin suoritettavassa menetelmässä, sekoitettiin liuos, joka sisälsi 20 g fruktoosia ja 1,1 g glukoosia, lämpötilassa 40°C pH-arvon ollessa 5,5 ja ilmaa lävitse johtaen keksinnön mukaisesti käytetyn katalyytin A kanssa. Kulloinkin 100 minuuttia kestäneen reaktioajan kuluttua erilaisilla määrittämällä katalyyttinä saadut tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Katalyyttimäärä	Muuttunut glukoosimäärä 100 minuutin kuluttua
100	24 %
250	69 %
500	97 %

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä glukosin muuttamiseksi glukonihapoksi hapettamalla hapella vesiliuoksessa, t u n n e t t u siitä, että glukosipitoinen vesiliuos johdetaan sellaisen katalyytin kautta, joka sisältää glukosioksidaasia ja katalaasia aktiviteettisuhteessa enintään 1:1 välittömästi toistensa läheisyydessä sopivaan kantajaan sidottuna, että pH-arvo muutoksen aikana pidetään välillä 5-7, ja että muutos suoritetaan lämpötilassa, joka on välillä 25-50°C.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glukosipitoiseen liuokseen johdetaan happea.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH-arvo säädetään emäsluosta lisäämällä.
4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH-arvo säädetään poistamalla muodostunutta glukonihappoa.
5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että muutos tapahtuu kierrätystä käyttäen ja että muodostunut glukonihappo poistetaan liuoksesta ennen liuoksen palauttamista katalyytin kautta.
6. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glukonihappo poistetaan käyttäen anioninvaihtokäsittelyä.
7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glukosioksidaasin ja katalaasin aktiviteettisuhde on enintään 1:10.

Patentkrav

1. Förfarande för omvandling av glukos till glukonsyra genom oxidation med syre i en vattenlösning, k ä n n e t e c k n a t av att den glukoshaltiga vattenlösningen ledes över en katalysator innehållande glukosoxidas och katalas i omedelbar närhet av varandra bundna till en lämplig bärare i ett aktivitetsförhållande av högst 1:1, att pH hålles mellan 5 och 7 under omvandlingen, och att omvandlingen utföres vid en temperatur, som är mellan 25 och 50°C.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att syre inmatas i den glukoshaltiga lösningen.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att pH inställes genom tillförsel av alkalilösning.
4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att pH inställes genom avlägsning av bildad glukonsyra.

5. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n - n e t e c k n a t av att omvandlingen sker medelst användning av cirkulation och att den bildade glukonsyran avlägsnas ur lösningen innan lösningen återföres över katalysatorn.
6. Förfarande enligt patentkravet 4 eller 5, k ä n n e t e c k - n a t av att glukonsyran avlägsnas genom användning av en anjon- bytarbehandling.
7. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n - n e t e c k n a t av att glukosoxidasens och katalasens aktivitets- förhållande är högst 1:10.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Kuulutusjulkaisuja:-Utläggningsskrifter: Ruotsi-Sverige(SE) 355 022 (C 07 G 7/02).