

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 160792 B

(21) Patentansøgning nr.: 1458/81

(51) Int.Cl.⁵ A 23 L 1/236

(22) Indleveringsdag: 31 mar 1981

C 12 P 19/18

(41) Alm. tilgængelig: 01 okt 1981

(44) Fremlagt: 22 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 31 mar 1980 JP 40193/80 24 jun 1980 JP 84547/80 12 dec 1980 JP 174667/80

(71) Ansøger: *Meiji Seika Kaisha Ltd.; No. 4-16, Kyobashi 2-chome; Chuo-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Takashi *Adachi; JP, Hidemasa *Hidaka; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Sødemiddel samt fremgangsmåde til fremstilling deraf

(56) Fremdragne publikationer

DE pat. nr. 2426998
Andre publikationer. Elementary Biochemistry, Edwin T Mertz,
Ph. D. Burgess Publishing company.
Minnesota. 1960 side 28.

(57) Sammendrag:

1458-81

Sødemidlet består af oligosaccharider med fra 1 til 4 fructosemolekyler bundet til sucrose. Det fremstilles ved at omsætte sucrose i nærværelse af fructosyltransferase, hvorved der opnås en blanding af de ovennævnte oligosaccharider samt fructose, glucose og sucrose. Denne blanding kan eventuelt reduceres katalytisk til omdannelse af glucose og fructose til sorbitol og mannitol.
Sødemidlet er lav-cariogent og har fremragende smag.

DK 160792 B

1

Opfindelsen angår et lav-cariogent sødemiddel (dvs. et sødemiddel med ringe eller ingen tendens til at forårsage nedbrydning af tænderne) bestående i det væsentlige af oligosaccharider af fructose og sucrose, 5 og opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af sødemidlet.

Sucrose er hidtil udstrakt blevet anvendt i konfekt og fødevarer på grund af dets fremragende sødhed, smag, krystallinitet osv.. Sucrose kan imid- 10 lertid virke som substrat for dextransucrase, der fremstilles af intraorale mikroorganismer, og som et resultat fører hyppig indtagelse af sucrose til dannelsen af uopløseligt dextran i munden, hvorved dannelsen af tandbelægninger accelereres. Derfor siges sucrose 15 at være cariogent.

Den mekanisme, der fører til caries i tænderne, synes at omfatte de følgende trin: (1) et trin, hvori sucrose omdannes til uopløseligt dextran ved påvirkning fra dextransucrase fremstillet af cariogene mikroorga- 20 nismer af *Streptococcus mutans* eller lignende og samtidig absorberer de cariogene mikroorganismer til dannelsen af tandbelægninger, og (2) et trin, hvori sukkerarter, der kan gæres såsom glucose og sucrose, gæres af mikroorganismene i tandbelægningerne, der 25 er aflejret på tændernes overflade til fremstilling af organiske syrer (der i det væsentlige består af mælkesyre), hvilket sænker pH og frembringer et afkalkningsfænomen.

Polyoler såsom xylitol og saccharin og syntetiske sødemidler såsom cyclamat og aspartam kendes 30 som lav-cariogene sødemidler. Men disse sødemidler har ulemper såsom f.eks., at det første let forårsager diaré, og det sidste mangler smag. Det er derfor ønskværdigt at udvikle et lav-cariogent sødemiddel med 35 sucroses fremragende egenskaber og som ikke har de ovennævnte ulemper.

I betragtning af sucroses cariogenicitet er det formålet med opfindelsen at tilvejebringe et sødemiddel

med sucroses ønskværdige egenskaber, men med lav cario-genicitet.

Dette opnås med sødemidlet ifølge opfindelsen, der er ejendommeligt ved, at der til hvert sucrose-mole-
5 kyle er bundet 1 til 4 fructosemolekyler, således at forholdet mellem fructose og sucrose er mindst 1:1.

En hensigtsmæssig udførelsesform for sødemidlet ifølge opfindelsen er angivet i krav 2.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til
10 fremstilling af det omhandlede lav-cariogene sødemiddel, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at fructose omsættes i nærværelse af fructosyltransferase.

Der kan benyttes forskellige hensigtsmæssige ud-førelsesformer for fremgangsmåden ifølge opfindelsen
15 som angivet i krav 4-7.

Sødemidlet ifølge opfindelsen kan benyttes til fremstilling af lav-cariogene spiselige produkter, herunder både faste spiselige produkter og drikkevarer.

Fra DE-patentskrift nr. 2.426.998 kendes en frem-
20 gangsmåde til fremstilling af en stivelsessirup, der som hovedbestanddel indeholder oligoglucosylfructose. Nærmere angivet er der tale om fremstilling af en (glucose)_n-glucose-fructose (hvor n = 1 til 15). I modsætning hertil angår den foreliggende opfindelse et søde-
25 middel, der omfatter en glucose-(fructose)_m-fructose (hvor m = 1 til 4), samt en fremgangsmåde til fremstilling af dette sødemiddel. Det kendte produkt og produktet ifølge opfindelsen er således væsentligt forskellige. Desuden er der tale om anvendelse af forskellige enzymer
30 til fremstilling af de to produkter. Ved den kendte fremgangsmåde anvendes der således glucosyltransferase, medens der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes fructosyltransferase. Sødemidlet ifølge opfindelsen har, som beskrevet nedenfor, en kombination af flere forskel-
35 lige fortrinlige egenskaber, der ikke er beskrevet tilsvarende for det nævnte kendte produkt.

Opfindelsen er opstået som resultat af grundig-

ge undersøgelser for at udvikle et lav-cariogent sucrosebeslægtet materiale, der stadig har sucroses fremragende egenskaber, ved hvilken undersøgelse det nu har vist sig, at oligosaccharider, der opnås ved

5 at omsætte sucrose i nærværelse af fructosyltransferase og især oligosaccharider såsom det, hvori ét fructosemolekyle er bundet til sucrose (herefter betegnet GF_2), det hvori to fructosemolekyler er bundet til sucrose (herefter benævnt GF_3), det hvori tre fructosemolekyler er bundet til sucrose (herefter benævnt GF_4), og det hvori fire fructosemolekyler er bundet til sucrose (herefter benævnt GF_5), i det væsentlige ikke påvirkes af dextransucrase, der er fremstillet af

10 intraorale mikroorganismer (såsom Streptococcus mutans) og formindsker dannelsen af uopløseligt dextran ud fra sucrose, hvilket forårsages af dextransucrase. Oligosacchariderne GF_2 , GF_3 , GF_4 og GF_5 ifølge opfindelsen kan isoleres og renses ved hjælp af f.eks. carbonchromatografi (dvs. chromatografi under anvendelse af aktivt pulveriseret trækul), ionbytterchromatografi eller lignende fra den sukkerblanding, der opnås ved at omsætte fructosyltransferase med sucrose. Af

20 praktiske hensyn anvendes oligosaccharidblandingen imidlertid fortrinsvis som sådan. Sukkerblandingen indeholder også typisk noget uomsat sucrose, oligosacchariderne GF_2 , GF_3 osv., der fremstilles ved overføringsreaktionen, og biprodukterne glucose og fructose, der dannes som biprodukter ved omsætningen.

25

30 Denne sukkerblanding påvirkes imidlertid også af dextransucrase, der fremstilles af intraorale mikroorganismer, men på grund af tilstedeværelsen af oligosacchariderne fremstilles det uopløselige dextran i en mindre mængde. Dette tilskrives det faktum, at oligosacchariderne GF_2 , GF_3 osv. undertrykker dannelsen af uopløselige dextraner fra sucrose på trods af nærværelsen af sucrose, og at uopløseligt dextran ikke fremstilles ud fra oligosacchariderne GF_2 , GF_3 osv.

35

En blanding eller komposition, der indeholder oligosaccharider med fra 1 til 4 fructosemolekyler bundet til sucrose, producerer således mindre uopløseligt dextran, der menes at være hovedårsagen til caries i tænderne, og oligosacchariderne GF_2 , GF_3 osv. undertrykker dannelsen af dextran ud fra sucrose.

Endvidere har en sådan blanding fremragende egenskaber som sødemiddel, såsom god sødhed, udmærket smag, god fugttilbageholdelse osv., udover at den har lav-cariogenicitet.

Mere bestemt har blandingen en sødhed på 60 til 80, idet sucroses sødhed tages som 100, og har specifik duft. Sødhed bedømmes ved tærskelmetoden, der er beskrevet i "Sweeteners and Dental Caries" af J.H. Shaw, side 45, Information Retrieval Incorporation. Endvidere farves GF_2 , GF_3 osv. vanskeligt ved behandling, eftersom de er ikke-reducerende sukkerarter. Yderligere har dette sødemiddel omtrent den samme viskositet og det samme osmotiske tryk som sucrose og er ikke-krySTALLINSK. Derfor kan den, når den blandes med sucrose, frugtsukker, lactose eller lignende, hæmme krystallisation. Denne egenskab anses at være fordelagtigt ved praktisk anvendelse. Derudover har dette sødemiddel omtrent den samme frysepunktssænkning som sucrose og har fremragende fugttilbageholdelsesegenskaber.

Som beskrevet ovenfor har det omhandlede sødemiddel forskellige egenskaber, der kræves af konventionelle sødemidler, og det kan derfor anvendes i ethvert spiseligt produkt i stedet for de sædvanligvis anvendte sødemidler såsom sukker, syresaccharificeret hvedegluten (mizuame), isomeriserede sukkere osv., og det derved opnåede spiselige produkt vil være mindre cariogent end et spiseligt produkt, der opnås ved anvendelse af de sædvanlige sødemidler.

Som beskrevet ovenfor er blandingen, der indeholder oligosaccharider med fra 1 til 4 fructosemolekyler, bundet til sucrose (herefter benævnt et lav-cariogent sødemiddel), en sødemiddelkomposition med

lille cariesdannende virkning på tænderne. Fremgangs-
måden til industriel fremstilling af dette lav-carioge-
ne sødemiddel er også blevet grundigt undersøgt, og der
er fundet en særlig fremgangsmåde. Den består som
5 nævnt i, at sucrose omsættes i nærværelse af fructosyl-
transferase.

Fructosyltransferasen virker i det væsentlige
på sucrosen ved at overskære β -1,2-bindingen mellem
fructose og glucose, og overføre den resulterende
10 fructose til sucrose til opnåelse af GF_2 og yderligere
overføring af fructose til GF_2 til opnåelse af GF_3 .
Den er forskellig fra inulosucrase [2.4.1.9] og levan-
sucrase [2.4.1.10] beskrevet i "Enzyme Nomenclature"
(Academic Press, 1978) ved at reaktionsprodukterne
15 er oligosaccharider, hvori fructose er bundet til
sucrose som GF_2 , GF_3 osv.

Som enzymkilder findes mikroorganismer såsom
fungi (f.eks. slægten *Aspergillus* (*Aspergillus niger*
ACE-2-1, ATCC 20611 osv.), slægten *Penicillium* (*Peni-*
20 *cillium* *nigricans* osv.), slægten *Fusarium* (*Fusarium*
lini IAM 5008 osv.), slægten *Gloeosporium* (*Gloeosporium*
kaki IAM 5011 osv.) osv.] og gærsvampe [f.eks. slægten
Saccharomyces (*Saccharomyces cerevisiae* osv.), slægten
Rhodotorulla (*Rhodotorulla glutinis* osv.), slægten
25 *Pichia* (*Pichia miso* osv.), slægten *Hansenula* (*Hansenula*
miso osv.), slægten *Candida* (*Candida tropicalis* osv.),
Aureobasidium pullulans var. *melanigenum* A-8, ATCC
20612] og plantefremstillet enzym såsom fra *Asparagus*
offininalis, *Helianthus tuberosus* L. osv. Fructosyl-
30 transferase af mikrobiel oprindelse kan opnås ved at
dyrke mikroorganismer ved en optimal temperatur for
mikroorganismene, dvs. 25°C til 30°C i fra 24 til 96
timer under anvendelse af et kendt passende medium,
f.eks. et medium, der indeholder 5,0% sucrose, 1,0%
35 pepton, 0,7% kødekstrakt og 0,3% NaCl, og efter af-
slutning af dyrkningen at fjerne mikroorganismeceller-
ne ved filtrering eller centrifugering til opnåelse af
et kulturfiltrat. Selve filtratet eller enzymet, der

opnås ved rensning af filtratet ved konventionelle fremgangsmåder, der er kendte til rensning af enzymer såsom ultrafiltrering, udsaltning (dvs. salt eller andre urenheder fjernes derfra) med natriumsulfat, opløsningsmiddeludfældning, gelfiltrering eller ion-
5 bytterchromatografi kan anvendes.

Enzym af vegetabilsk oprindelse kan opnås ved at destruere vegetabilsk væv ad fysisk vej såsom knusning og ekstrahering af enzymet. Selve råekstraktet
10 eller enzymet, der opnås ved rensning af ekstraktet på konventionel vis (såsom ethanoludfældning, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -udsaltning osv.), kan anvendes.

Det lav-cariogene sødemiddel kan derpå opnås ved at omsætte sucrose i nærværelse af det således
15 opnåede enzym. Som et resultat af forskellige undersøgelser angående passende reaktionsbetingelser har de følgende betingelser vist sig at være foretrækkel-sesværdige. Især justeres sucrosekoncentrationen ved overføringsreaktionen i almindelighed til fra 5 vægt%
20 til 70 vægt%, og fortrinsvis fra 30 vægt% til 60 vægt%. Omsætningens pH og reaktionstemperaturen er i almindelighed henholdsvis fra 4,0 til 7,0 og fra 25°C til 65°C, og fortrinsvis 50 til 60°C, skønt de er afhængige af enzyms oprindelse, kan de mest foretrukne betin-
25 gelser variere. Vedrørende enzyemmængden anvendes fra 5 til 200 enheder, og fortrinsvis fra 20 til 80 enheder enzym pr. gram sucrose. Enzyemmængden er angivet som "enheder", idet én enhed er en enzyemmængde, hvis akti-vitet giver 1 μmol glucose pr. 2,5 ml reaktionsopløs-
30 ning, når omsætningen udføres ved at sætte 0,5 ml enzy-mopløsning til 1,0 ml 5%ig sucroseopløsning og 1,0 ml pufferopløsning med pH 5,0 efterfulgt af omsætning ved 40°C i 60 minutter.

Efter afslutning af overføringsreaktionen opvarmes reaktionsblandingen til 100°C for at deaktivere enzymet, blandingen affarves med aktivt carbon, afsaltes med ionbytterharpiks og koncentrerer til opnåelse af slutproduktet. Analyse af overføringsreaktionsblandingen kan f.eks. udføres med højhastighedsvæskechromatografi under anvendelse af en Microbondapack CH søjle (fremstillet af Waters Associates Incorporation) og et opløsningsmiddel af acetonitril/vand (80/20 ved rumfang).

Det således opnåede lav-cariogene sødemiddel har en sammensætning på, for et typisk eksempel, 28 vægt% glucose, 2 vægt% fructose, 11 vægt% sucrose, 28 vægt% GF₂, 25 vægt% GF₃, 5 vægt% GF₅ og 1 vægt% GF₅. Denne grundlæggende sukkersammensætning varierer meget efter reaktionsbetingelserne.

Af oligosacchariderne GF₂ kan nævnes O-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-O-β-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranosid, O-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-O-β-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranosid, O-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-O-β-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranosid osv. Som GF₃ kan nævnes O-β-D-fructofuranosyl-(2→[1-O-β-D-fructofuranosyl]₂→1)-α-D-glucopyranosid, O-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-O-[β-D-fructofuranosyl-(2→2)]-O-α-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranosid osv., og som GF₄ kan nævnes O-β-D-fructofuranosyl-2→[1-O-β-D-fructofuranosyl-2]₃→1)-α-D-glucopyranosid osv. Som GF₅ kan nævnes O-β-D-fructofuranosyl-(2→[1-O-β-D-fructofuranosyl-2]₄→1)-α-D-glucopyranosid osv.

Virkningerne af sødemidlet ifølge opfindelsen og virkningerne af de individuelle ingredienser GF₂, GF₃, GF₄ og GF₅ beskrives nærmere i de nedenfor anførte undersøgelseseksempler.

Tabel 1 i undersøgelseseksempel 1, der er angivet nedenfor, viser de mængder uopløseligt dextran, der er opnået ud fra GF_2 , GF_3 , GF_4 og GF_5 under anvendelse af dextransucrase opnået ved dyrkning af Streptococcus mutans af stammen ATCC 25175 i sammenligning med resultatet fra sucrose. Som det fremgår af tabellen opnås intet uopløseligt dextran fra GF_2 , GF_3 , GF_4 og GF_5 .

Resultater, fra undersøgelser af om GF_2 og GF_3 undertrykker eller ikke undertrykker produktion af uopløselig dextran fra sucrose af dextransucrase, er anført i tabel 2 i undersøgelseseksempel 2, der beskrives senere. Som det fremgår af tabel 2 har GF_2 og GF_3 vist sig at undertrykke produktion af uopløseligt dextran fra sucrose.

Tabel 4 i undersøgelseseksempel 3, der beskrives nedenfor, viser mængden af uopløseligt dextran, der er opnået ud fra den omhandlede sødemiddelblanding fremstillet under forskellige betingelser og derfor med forskellig sammensætning i sammenligning med resultatet fra sucrose. Som det fremgår af tabellen gav overføringsblandingerne det uopløselige dextran i mindre mængder end sucrose. Især foretrækkes, at vægtindholdet af summen af oligosaccharider GF_2 , GF_3 , GF_4 osv. er dobbelt så stort som eller mere end indholdet af fri sucrose i sødemiddelkompositionen. Det vil sige, hvor vægtforholdet mellem summen af oligosaccharider og det frie sucroseindhold er mindst 2,0/1, er mængden af produceret uopløseligt dextran 50% eller mindre end hvad der produceres under anvendelse af sucrose; sådanne blandinger er således særligt foretrækkelsesværdige.

Som beskrevet ovenfor producerer en blanding eller komposition, der indeholder oligosaccharider med fra 1 til 4 fructosemolekyler bundet til sucrose, mindre uopløseligt dextran, der er hovedårsagen til
5 caries i tænderne, og oligosacchariderne GF_2 , GF_3 osv. undertrykker dannelsen af dextran ud fra sucrose.

En sådan sukkerkomposition påvirkes ikke af dextransucrase opnået fra *Streptococcus mutans* osv., og der produceres således intet uopløseligt dextran,
10 når sukkerblandingen indtages, og blandingen er i denne betydning mindre cariogen. Skønt oligosacchariderne GF_2 , GF_3 osv. i blandingen ikke gøres væsentligt af mikroorganismene *Streptococcus mutans* osv., hvorved der kun produceres ringe mængder organiske syrer derfra,
15 kan omsat sucrose og glucose og fructose, der er frembragt som biprodukter ved overføringsreaktionen omdannes til organiske syrer.

Den omhandlede sukkerblanding giver altså en mindre mængde organisk syre i forhold til sucrose, men er
20 dog ikke fuldstændig tilfredsstillende.

Som et resultat af intensive undersøgelser omkring dette særlige punkt har det også vist sig, at glucose og fructose kun findes i ringe mængde i kompositionen og selektivt kan omdannes til sorbitol og mannitol ved katalytisk reduktion af sukkerblandingen, der
25 er blevet opnået ved at omsætte sucrose i nærværelse af fructosyltransferase under særlige betingelser, og at mængden af mælkesyre, der frembringes ud fra den således opnåede sødemiddelblanding ved påvirkning
30 fra mikroorganismer kun er ca. 20% af den, der frembringes af sucrose (se undersøgelseseksempel 4). Det vil sige, opfindelsen angiver også en fremgangsmåde til fremstilling af et nyt sødemiddel, der indeholder

sorbitol og mannitol, ved hvilken sucrose omsættes i nærværelse af fructosyltransferase til opnåelse af en sukkeropløsning, der indeholder glucose, fructose, sucrose og oligosaccharider med 1 til 4 fructosemole-
5 kyler bundet til sucrose, og hvor denne sukkeropløsning udsættes for katalytisk reduktion, mens opløsningsens pH fastholdes på fra 7 til 9.

Nærmere angivet har det vist sig, at glucose og fructose selektivt reduceres til opnåelse af sorbitol ud fra glucose og sorbitol og mannitol ud fra
10 fructose uden nedbrydning af oligosacchariderne GF_2 , GF_3 , GF_4 osv. ved f.eks. tilsætning af dinatriumhydrogenphosphat til den vandige opløsning af den ovenfor beskrevne sukkerblanding for at justere den
15 vandige opløsnings pH til fra 7 til 9 og omrøring af blandingen i nærværelse af 3 til 10% baseret på mængden af faste stoffer, nikkelkatalysator (Raney-nikkel, nikkelformat, nikkel-på-diatoméjord osv.) for at udføre
20 reduktionsreaktionen ved 50 til 130°C under et reaktivt hydrogentryk på 50 til 120 kg/cm². Blandt reaktionsbetingelserne er justering af pH særligt vigtigt. Såfremt den katalytiske reduktion f.eks. udføres ved en pH på 6 eller mindre, nedbrydes oligosacchariderne
25 GF_2 , GF_3 , GF_4 osv. til opnåelse af sorbitol og mannitol i store mængder og selektiv reduktion af glucose og fructose udføres fortrinsvis ved et pH på fra 7 til 9.

Den således opnåede sødemiddelblanding indeholder typisk ca. 37% sorbitol, 2% mannitol, 10% sucrose,
30 22% GF_2 , 22% GF_3 og 7% GF_4 . Som angivet i undersøgelseseksempel 4 er det blevet vist, at mængden af mælkesyre frembragt ud fra blandingen ved påvirkning fra *Streptococcus mutans* er meget mindre end den fra sucrose eller fra sukkerblanding, der opnås ved at omsæt-

te sucrose med fructosyltransferase.

Som beskrevet ovenfor er sødemiddelblandingen ifølge opfindelsen, der indeholder sorbitol, mannitol, oligosacchariderne, GF_2 , GF_3 , GF_4 osv. samt en lille
5 mængde sucrose, et dårligt substrat for dextransucrase fra *Streptococcus mutans*, og den giver således produktion af uopløseligt dextran i kun ringe mængde. Derudover reducerer blandingens mindre påvirkelighed af gæring af *Streptococcus mutans* mængden af fremstillet caries-
10 dannende mælkesyre.

Følgelig er blandingen et sødemiddel med stærke anticariogene egenskaber.

Undersøgelseseksempel 1

Streptococcus mutans af stammen ATCC 25175 blev
15 dyrket under anaerobe betingelser ved anvendelse af et medium, der indeholdt glucose og triptocase og efter separering af mikroorganismecellerne, blev filtratet koncentreret og rensat ved ultrafiltrering til fremstilling af dextransucrase.

20 Derpå blev 1,0 ml 1%'s sukkeropløsning, 1,5 ml 0,67 M phosphatpufferopløsning (pH 7,0) og 0,25 ml af den ovennævnte enzymopløsning blandet og omsat i 4 timer ved 37°C. Det således fremstillede vanduoopløselige dextran blev udfældet ved centrifugering ved
25 3000 omdrejninger pr. minut for at opsamle bundfaldet. Bundfaldet blev vasket to gange hver gang med 5 ml 70% ethanol, opløst i 2,5 ml 1 M kaliumhydroxidopløsning, og mængden af opnået dextran blev bestemt ved en phenol-svovlsyremetode. Yderligere blev der som sukkeropløsninger anvendt 1%'s opløsninger af henholdsvis
30 GF_2 , GF_3 , GF_4 og GF_5 . Som GF_2 , GF_3 , GF_4 og GF_5 blev der anvendt fraktioner rensat ved at underkaste en sukkerblanding (opnået ved at omsætte sucrose i nærværelse af fructosyltransferase) for carbonchromatografi (under anvendelse af aktivt pulveriseret trækul)
35 til opnåelse af en enkelt plet i tyndtlagschromatografi. De således opnåede resultater er vist i tabel 1.

Tabel 1

Prøve	Dextran opnået i reaktions-	
	opløsningen	
	(γ)	
Sucrose	740	
5 GF ₂	0	
GF ₃	0	
GF ₄	0	
GF ₅	0	

10 Som det ses af tabel 1, blev der ikke opnået
noget dextran fra GF₂, GF₃, GF₄ og GF₅.

Undersøgelseseksempel 2

Ved dette eksempel blev det undersøgt, om GF₂ og GF₃ undertrykker eller ikke undertrykker produktion af uopløseligt dextran ud fra sucrose, når sucrose
15 udsættes for destransucrase fremstillet i undersøgelseseksempel 1 i nærværelse af GF₂ og GF₃. Derudover var reaktionsbetingelserne som følger: 1,0 ml af hver
20 sukkeropløsning (indeholdende den sukkerart, der er anført i tabel 2), 1,5 ml 0,67 M phosphatpufferopløsning (pH 7,0) og 0,25 ml enzymopløsning blev blandet og omsat ved 37°C i 4 timer. Uopløseligt dextran opnået i reaktionsopløsningen blev bestemt på samme måde som i undersøgelseseksempel 1.

Tabel 2

25	Sukkerindhold i reaktions-	Mængde dextran opnået i
	opløsningen	reaktionsopløsningen
	(γ)	
	Sucrose 10 mg	740 (100)
	Sucrose 10 mg + GF ₂ 30 mg	300 (40)
	Sucrose 10 mg + GF ₃ 30 mg	350 (47)

30 Endvidere angiver tallene i parenteser i tabel 2 indeks for mængden af uopløseligt dextran, idet udbyttet fra sucrose angives som 100.

Undersøgelseseksempel 3

Ved at omsætte sucrose i nærværelse af fructo-syltransferase under forskellige betingelser blev der fremstillet sødemidler med de følgende sammensætninger.

5

Tabel 3

Nr.	Fructose	Glucose	Sucrose	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅	Forhold [*]
1	--	5,9	81,9	12,2	--	--	--	15,0
2	--	13,7	58,5	27,8	--	--	--	47,5
3	--	17,4	41,8	35,7	5,0	--	--	97,0
10 4	--	23,5	23,9	41,2	11,4	--	--	220
5	--	28,4	14,9	39,2	17,4	--	--	380
6	0,8	31,5	11,0	26,4	25,1	5,0	--	514
7	0,9	31,6	10,0	23,5	24,1	7,0	2,9	575

$$15 \quad * \frac{GF_2 + GF_3 + GF_4 + GF_5 (\%)}{\text{fri sucrose} (\%)} \times 100$$

Mængderne af uopløseligt dextran opnået ud fra de ovenfor beskrevne overføringssukkerblandinger blev målt på samme måde som i undersøgelseseksempel 1 til opnåelse af de i tabel 4 angivne resultater.

20

Tabel 4

Prøve		Dextran opnået i reaktionsop-løsningen
		(%)
	Sucrose	490 (100) [*]
	Overføringssukker nr. 1	436 (89)
25	" nr. 2	298 (61)
	" nr. 3	289 (59)
	" nr. 4	201 (41)
	" nr. 5	142 (29)
	" nr. 6	44 (9)
30	" nr. 7	40 (8)

^{*} Tallene i parenteser angiver indeks for mængden af uopløseligt dextran, idet mængden, der opnås fra sucrose tages som 100.

Undersøgelseseksempel 4

Streptococcus mutans Serotype C blev anaerobt dyrket under anvendelse af et medium, der indeholdt 0,27% maltose, 0,01% L-cysteinhydrochlorid, 0,1% natrium-L-glutamat, 0,2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% NaCl, 0,01% MnSO_4 og 0,01% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Derpå blev mikroorganismecellerne opsamlet ved centrifugering, derefter dispergeret i en 0,05 M phosphatpuffer i en koncentration på 10 mg/ml. 0,9 ml 0,2 M phosphatpuffer, 0,14 ml 22,5 mM MgCl_2 , 0,2 ml 1,7% 's sukkeropløsning og 0,5 ml celledispersion blev blandet og rystet ved 37°C i 30 minutter til omsætning. Derpå blev blandingen kogt i 15 minutter for at afbryde reaktionen og efter fjernelse af cellerne ved centrifugering blev mælkesyre i den ovenstående væske bestemt ved en enzymatisk metode.

Tabel 5

Substrat	Mælkesyre		Fremstillingsforhold
	μmol	reaktionsforhold	
Sucrose	16,8		100
GF ₂	8,0		48
GF ₃	0,1		0
Komposition-1*1	12,6		75
Komposition-2*2	3,7		22
*1 Komposition-1: (sukkerkomposition opnået ved omsætning af sucrose i nærværelse af fructosyltransferase)			
	Glucose		37%
	Fructose		2%
	Sucrose		10%
GF ₂			22%
GF ₃			23%
GF ₄			6%
*2 Komposition-2: (komposition opnået ved katalytisk reduktion)			
Sorbitol			38%
Mannitol			1%

Sucrose	10%
GF ₂	22%
GF ₃	23%
GF ₄	6%

5 Eksempel 1.

10 ml's portioner BS medium, der indeholdt 5,0% sucrose, 1,0% pepton, 0,7% kødekstrakt og 0,3% NaCl blev hældt i to reagensrør og efter sterilisation ved 120°C i 30 minutter blev hvert af medierne inoculeret med en platintrådssløjfe med *Aspergillus niger* ACE-2-1, ATCC 20611, og dyrkning blev udført ved 28°C i 24 timer.

10 ml's portioner af de resulterende kulturopløsninger blev sat til to Erlenmeyer kolber, der indeholdt 200 ml BS medium (steriliseret ved 120°C i 30 minutter), og der blev gennemført rystekultur ved 28°C i 24 timer for at udføre predyrkning.

20 ml BS medium blev fyldt på et 30 liters gæringskar og efter sterilisation ved 120°C i 30 minutter afkølet og inoculeret med 400 ml af den ovennævnte kulturopløsning. Dyrkningen blev udført ved 300 omdrejninger pr. minut ved 28°C i 72 timer. Efter afslutning af dyrkningen blev cellerne fjernet ved filtrering til opnåelse af 20 liter kulturfiltrat. 20 liter af dette kulturfiltrat blev koncentreret og rensat ved ultrafiltrering til opnåelse af 2 liter enzymopløsning med en enzymaktivitet på 240 enheder/ml.

6,7 liter vand blev sat til 10 kg sucrose for at opløse dette, og efter justering af pH til 5,0 blev enzymet sat dertil i en mængde på 48 enheder pr. gram sucrose, og overføringsreaktionen blev udført ved 50°C i 48 timer. Efter afslutning af overføringsreaktionen blev reaktionsblandingen opvarmet til 100°C i 15 minutter for at deaktivere enzymet efterfulgt af tilsætning af aktivt carbon i en mængde på 0,5% i forhold til indholdet af faste stoffer til affarvning. Efter fjernelse af det aktive carbon blev opløsningen behandlet

med ionbytterharpikserne Amberlite IR-120B og Amberlite IRA-411 og koncentreret til 75 vægt% til opnåelse af 12 kg lav-cariogent sødemiddel.

Det således opnåede sødemiddel havde en sukkersammensætning på: 26% glucose, 2% fructose, 18% sucrose, 40% GF₂ og 14% GF₃.

Eksempel 2

Fusarium lini IAM 5008 blev dyrket på samme måde som beskrevet i eksempel 1 til opnåelse af 20 liter kulturopløsning. Denne opløsning blev koncentreret og rensat ved ultrafiltrering til opnåelse af 2 liter enzymopløsning med en enzymaktivitet på 200 enheder/ml.

7 liter vand blev sat til 3 kg sucrose, og efter justering af pH til 6,0 blev enzymet sat dertil i en mængde på 16 enheder pr. gram sucrose efterfulgt af, at overføringsreaktionen blev gennemført ved 50°C i 24 timer. Efter afslutning af reaktionen blev opløsningen opvarmet til 100°C i 15 minutter for at deaktivere enzymet, og der blev tilsat aktivt carbon i en mængde på 0,5% i forhold til indholdet af faste stoffer til affarvning. Derpå blev opløsningen afsaltet med en ionbytterharpiks og koncentreret til 75 vægt% til opnåelse af 3,7 kg lav-cariogent sødemiddel.

Det således opnåede sødemiddel havde en sukkersammensætning på: 38,2% glucose, 7,8% fructose, 17,2% sucrose, 25,4% GF₂ og 11,4% GF₃.

Eksempel 3

Gloeosporium kaki IAM 5011 blev dyrket på samme måde som beskrevet i eksempel 1 til opnåelse af 20 liter filtrat. Dette filtrat blev koncentreret og rensat ved ultrafiltrering til opnåelse af 1,5 liter enzymopløsning med en enzymaktivitet på 200 enheder/ml.

7 liter vand blev sat til 3 kg sucrose for at opløse dette, og efter justering af pH til 6,0 blev enzymet sat dertil i en mængde på 20 enheder pr. gram sucrose efterfulgt af, at overføringsreaktionen blev

gennemført ved 50°C i 24 timer. Efter afslutning af reaktionen blev opløsningen affarvet og afsaltet på samme måde som i eksempel 1 og koncentreret til 75 vægt% til opnåelse af 3,8 kg lav-cariogent sødemiddel.

Det således opnåede sødemiddel havde en sukkersammensætning på: 25% glucose, 9% fructose, 36% sucrose, 24% GF₂ og 6% GF₃.

Eksempler på anvendelse af sødemidlet til forskellige spiselige produkter og drikkevarer beskrives nedenfor.

Eksempel 4

Fremstilling af hårde bolsjer:

Et lav-cariogent sødemiddel med en sukkersammensætning på 37% glucose, 2% fructose, 10% sucrose, 22% GF₂, 23% GF₃ og 6% GF₄ (vandindhold: 25 vægt%) blev vakuumkoncentreret til et endeligt vandindhold på ca. 8 til 10 vægt%, og efter afkøling til ca. 80°C blev der tilsat et smagsstof og et spiseligt farvestof efterfulgt af støbning og afkøling til stuetemperatur til opnåelse af hårde bolsjer. Disse bolsjer dannede ikke sukkerkrystaller, som det sker med bolsjer, der er fremstillet under anvendelse af sukker, og havde ringe cariogenicitet.

Eksempel 5

Fremstilling af appelsinmarmelade:

200 g appelsinkød blev sat til 90 g appelsinskræller, der natten over var blevet dyppet i en vandig 3%'s natriumchloridopløsning for at fjerne bitterhed, vasket med vand for at fjerne saltet og kogt i ca. 20 minutter. Efter tilsætning af 370 ml vand blev blandingen kogt ned i ca. 30 minutter, mens der blev tilsat 320 g af det lav-cariogene sødemiddel med den samme sukkersammensætning som i eksempel 4 (vandindhold: 25 vægt%). Den resulterende appelsinmarmelade havde et sukkerindhold på 65 vægt%. Dette gav en frisk syrlig appelsinsmag og smagte godt.

Eksempel 6

Fremstilling af en sød pasta af dampede bønner (også benævnt "neri-yokan"):

12 g agar-agar blev dyppet i vand i 3 timer og
5 malet efter fjernelse af vandet. Derpå blev der tilsat
260 ml vand efterfulgt af opvarmning for at opløse.
960 g Lav-cariogent sødemiddel med den samme sukker-
sammensætning som i eksempel 4 (vandindhold: 25 vægt%)
blev sat dertil, og filtreret efter at agar-agar
10 var fuldstændigt opløst. Denne agar-agar blanding blev
anbragt over ild, og 500 g rå bønnepasta blev tilsat
og æltet, og efter kogning til opnåelse af et sukker-
indhold på 70-71%, støbt i en form og færdiggjort til
fremstilling af sød pasta af dampede bønner (neri-yo-
15 kan). Denne havde ringe cariogenicitet.

Eksempel 7

Fremstilling af iscreme:

10 Dele skummetmælk, 75,5 dele vand, 0,25 dele
stabiliseringsmiddel, 0,25 dele emulgeringsmiddel, 14
20 dele lav-cariogent sødemiddel med den samme sukker-
sammensætning som i eksempel 4 og en passende mængde
smagsstof blev anvendt til at fremstille en iscrems-
blanding. Efter filtrering blev denne steriliseret
ved 70°C i 30 minutter derpå afkølet. Efter henstilling
25 ved 3 til 5°C i 6 timer blev temperaturen sænket under
omrøring til frysning. Der blev således fremstillet is-
creme. Eftersom det lav-cariogene sødemiddel havde
omtrent den samme frysepunktssænkning, havde den re-
sulterende iscreme god evne til at bevare formen i
30 sammenligning med det tilfælde, hvor der anvendes
sukker.

Eksempel 8

Fremstilling af småkager:

Dejen blev fremstillet ved at anvende 1 kg hvede-
35 mel, 100 g majsstivelse, 333 g lav-cariogent sødemiddel
med den samme sukkersammensætning som i eksempel 4

(vandindhold: 25 vægt%), 125 g margarine, 5 g natriumchlorid, 2,5 g natriumcarbonat, 8,8 g ammoniumcarbonat, 6,3 g sojabønnelecithin, 75 g æg, 6,3 g vanilleolie og 267 g vand, og efter hævning formet og bagt til småkager. 5 ger. Dejens tilstand var den samme som i tilfældet, hvor der er anvendes sukker, og småkagerne havde et godt rumfang og en god bagt farve i sammenligning med, hvor der anvendes sukker.

Eksempel 9

10 Fremstilling af læskedrik:

1,5 Dele citronsyre og 970 dele vand blev sat til 133 dele lav-cariogent sødemiddel med den samme sukkersammensætning som i eksempel 4 (vandindhold: 25 vægt%) til opløsning, og der blev sat en passende 15 mængde farvestof og smagsstof til. Derpå blev blandingen underkastet carbonering til fremstilling af en læskedrik. Dette er en lav-cariogen læskedrik, eftersom den kun indeholder det lav-cariogene sødemiddel.

Eksempel 10

20 Fremstilling af tyggegummi:

75 Dele af det lav-cariogene sødemiddelpulver med den samme sukkersammensætning som i eksempel 4, og 22 dele chiclegummi blev opløst og blandet. Derpå blev der tilsat smagsstof og menthol efterfulgt af 25 æltning. Efter at føre blandingen gennem en valse for at valse den til en given tykkelse, blev det valsede produkt skåret ud og tørret til fremstilling af plade-tyggegummi. Dette tyggegummi har ringe cariogenicitet, eftersom der kun blev anvendt det lav-cariogene søde- 30 middel.

Eksempel 11

Fremstilling af chokolade:

100 Dele bitter chokolade, 116 dele lav-cariogent sødemiddelpulver med den sammesukkersammensætning 35 som i eksempel 4, 23 dele cacaosmør, 90 dele mælkepul-

ver og små mængder vanille og lecithin blev blandet til fremstilling af chokolade på sædvanlig vis. Denne chokolade havde en udsøgt sødhed og gav den samme smag, som en fremstillet under anvendelse af sukker.

5 Eksempel 12

Fremstilling af et conserveret spiseligt produkt nedkogt i sojasovs (også benævnt "tsukudani"):

10 1 liter sojasovs og 900 g lav-cariogent sødemiddel med den samme sukkersammensætning som i eksempel 4 blev blandet og kogt ned. Derpå blev der tilsat 800 g korthalsede muslinger og 50 g ingefær og kogt i 40 til 60 minutter i flydende tilstand til opnåelse af conserverede korthalsede muslinger nedkogt i sojasovs med god farve og god smag.

15 Eksempel 13

Fremstilling af glaserede kastanjer:

Kastanjernes skaller blev fjernet efterfulgt af kogning af de skrællede kastanjer i 8 til 10 timer. Derpå blev bittert skin fjernet, og der blev hældt en 20 40%'s varm sukkeropløsning af lav-cariogent sødemiddel med den samme sukkersammensætning som i eksempel 4 derpå. Efter henstand i en dag, blev der hældt en 45%'s sukkeropløsning derpå efterfulgt af henstand i en dag. Ligeledes blev koncentrationen af sukkeropløsningen 25 hævet til 70% til fremstilling af glaserede kastanjer. Eftersom det lav-cariogene sødemiddels osmotiske tryk var omtrent det samme som det osmotiske tryk af sukker, blev der opnået gode produkter.

Eksempel 14

30 10 ml's portioner BS medium indeholdende 5,0% sucrose, 1,0% pepton, 0,7% kødekstrakt og 0,3% NaCl blev hver især anbragt i to reagensglas og efter sterilisation ved 120°C i 30 minutter blev hvert af medierne inoculeret med en platintrådssløjfe *Aspergillus niger*, 35 og dyrkning blev gennemført ved 28°C i 24 timer.

10 ml's portioner af den resulterende kulturopløsning blev hver især sat til 2 Erlenmeyer-kolber, der indeholdt 200 ml BS medium (steriliseret ved 120°C i 30 minutter), og der blev gennemført rystekultur
5 ved 28°C i 24 timer til gennemføring af predyrkning.

20 Liter BS medium blev anbragt i et 20 liters gæringskar, og efter sterilisation ved 120°C i 30 minutter afkølet og inoculeret med 400 ml af den ovennævnte kulturopløsning. Dyrkning blev gennemført ved 300 om-
10 drejninger pr. minut ved 28°C i 72 timer. Ved afslutningen af dyrkningen blev cellerne fjernet ved filtrering til opnåelse af 20 liter kulturfiltrat. 20 Liter af dette kulturfiltrat blev koncentreret og rensat ved ultrafiltrering til opnåelse af 2 liter enzymopløs-
15 ning med en enzymaktivitet på 240 enheder/ml.

3,3 Liter vand blev sat til 5 kg sucrose til opløsning, og efter justering af pH til 6,0 blev enzymopløsningen sat dertil i en mængde på 60 enheder/gram sucrose efterfulgt af overføringsreaktionen ved 50°C
20 i 72 timer. Efter afslutning af overføringsreaktionen blev opløsningen opvarmet til 100°C i 15 minutter for at deaktivere enzymet. Derpå blev aktivt carbon tilsat i en mængde på 0,5% i forhold til de faste stoffer til affarvning. Efter fjernelse af det aktive carbon blev
25 opløsningen behandlet med ionbytterharpikserne Amberlite IR-120 og Amberlite IRA-411 og koncentreret til en koncentration på 75 vægt% til opnåelse af 6 kg sødemiddel. Dette sødemiddel havde en sukkersammensætning på: 37% glucose, 2% fructose, 10% sucrose, 22% GF₂,
30 23% GF₃ og 6% GF₄.

700 ml vand blev sat til den ovennævnte sødemiddelblanding, der blev tilsat 15 ml 10%'s Na₂HPO₄ efterfulgt af justering af pH til 9,0 med 4%'s NaOH. 50 g Raney-nikkel blev tilsat, og reduktionen blev
35 udført ved 80 til 90°C i 50 minutter under omrøring ved et hydrogentryk på 60 til 120 kg/cm². Efter reaktionens afslutning blev nikkelkatalysatoren fjernet, og opløsningen blev behandlet med ionbytterharpikserne

Amberlite IR-120B og Amberlite IRA-411 efterfulgt af koncentration til 75 vægt% til opnåelse af 1 kg produkt.

Dette sødemiddel havde en sukkersammensætning på:

38% sorbitol, 2% mannitol, 9% sucrose, 22% GF₂, 23%

5 GF₃ og 6% GF₄.

Eksempel 15

10 ml BS medium indeholdende 0,5% sucrose, 1,0% pepton, 0,7% kødekstrakt og 0,3% NaCl blev hver især anbragt i to reagensglas, og efter sterilisation
10 ved 120°C i 30 minutter blev hvert af medierne inoculeret med en platintrådssløjfe Aureobasidium pullulans var. melanigenum A-8 ATCC 20612, og dyrkning blev gennemført ved 28°C i 24 timer.

10 ml's portioner af den resulterende kultur-
15 opløsning blev hver sat til to Erlenmeyer-kolber, der indeholdt 300 ml BS medium (steriliseret ved 120°C i 30 minutter), og der blev udført rystekultur ved 28°C i 24 timer til gennemførelse af predyrkning.

20 Liter medium, der indeholdt 10% sucrose, 1,0% pepton, 0,7% kødekstrakt, 0,3% NaCl og 0,1% CoCl₂·6H₂O blev fyldt i et 30 liters gæringskar og efter sterilisation ved 120°C i 30 minutter afkølet og inoculeret med 600 ml af den ovennævnte kulturopløsning. Dyrkning blev gennemført ved 240 omdrej-
25 ninger pr. minut ved 28°C i 24 timer. Efter dyrkning blev cellerne centrifugeret til opnåelse af 400 g råenzym. Dette råenzym (celler opnået ved centrifugering) havde en enzymaktivitet på 12000 enheder/g.

6,7 Liter vand blev sat til 10 kg sucrose til
30 opløsning, og efter justering af pH til 6,0 blev enzymet sat dertil i en mængde på 30 enheder pr. gram sucrose, og overføringsreaktionen blev gennemført ved 60°C i 48 timer. Efter afslutning af overføringsreaktionen blev reaktionsblandingen opvarmet til 100°C i
35 15 minutter for at inaktivere enzymet efterfulgt af tilsætning af aktivt carbon i en mængde på 0,5% baseret på faste stoffer for at affarve. Efter fjernelse af

det aktive carbon blev opløsningen behandlet med ion-bytterharpikserne Amberlite-120B og Amberlite IRA-411 og koncentreret til 75 vægt% til opnåelse af 11 kg lav-cariogent sødemiddel.

- 5 Det således opnåede sødemiddel havde en sukker-sammensætning på 0,8% fructose, 31,5% glucose, 11,0% sucrose, 24,6% GF₂, 25,1% GF₃ og 7,0% GF₄.

P A T E N T K R A V

- 10 1. Lav-cariogent: sødemiddel bestående i det væsentlige af oligosaccharider af fructose og sucrose, k e n d e t e g n e t ved, at der til hvert sucrose-molekyle er bundet 1 til 4 fructosemolekyler, således at forholdet mellem fructose og sucrose er mindst 1:1.
- 15 2. Sødemiddel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at forholdet mellem vægtindholdet af summen af oligosacchariderne med fra 1 til 4 fructosemolekyler bundet til sucrose blandt de faste ingredienser og vægtindholdet af fri sucrose er mindst 2,0/1.
- 20 3. Fremgangsmåde til fremstilling af et lav-cariogent sødemiddel ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at sucrose omsættes i nærværelse af fructosyltransferase.
- 25 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at fructosyltransferasen fås fra slægten *Aspergillus*.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at fructosyltransferasen fås fra slægten *Fusarium*.
- 30 6. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at fructosyltransferasen fås fra slægten *Gloeosporium*.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at fructosyltransferasen fås fra
- 35 *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* A-8 ATCC 20612.