

Eljárás a szacharóz glükózzá alakítására

K i v o n a t

A találmány tárgyát képezi eljárás kereskedelmi mennyiségű glükóz előállítására, továbbá eljárás kereskedelmi mennyiségű glükóz és elágazó fruktán előállítására szacharózból kiindulva, tovább reaktor az eljárások gyakorlati megvalósításhoz.

A találmány szerinti eljárás alkalmas glükóz és poliszaccharidok, mint például lineáris vagy elágazó inulinok kereskedelmi léptékű előállítására.



2001.07.19.

P0102675

47497

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

A2

Eljárás a szacharóz glükózzá alakítására

A találmány tárgya eljárás kereskedelmi mennyiségű glükóz, valamint elágazó fruktán szacharózból történő előállítására, továbbá reaktor ennek gyakorlati kivitelezésére. A találmány tárgya közelebbről egy eljárás, mellyel a szacharózt glükózzá lehet átalakítani oly módon, hogy a szacharózt érintkezésbe hozzuk β -2,1-fruktoziltranszferázzal és β -2,6-fruktoziltranszferázzal, majd ezután a glükózt és az elágazó fruktánt elkülönítjük, és ily módon a termelés hatékonyságát megnöveljük.

A találmány szerinti eljárás előnyösen alkalmazható glükóz és poliszaccharidok, mint például lineáris vagy elágazó inulinok kereskedelmi léptékű előállítására.

Monoszaccharidok formájában vagy poliszaccharidokba beépülten, a glükóz a természetben megtalálható szaccharid. A glükózt a gyógyászatban a folyadék- és tápanyagvesztesség pótlására, a mikroorganizmus-tenyészetekben, mint szénforrást, széles körben pedig táplálék adalékanyagként alkalmazzák.

Aktaszámunk: 92550-6422/SG

A glükózt kereskedelmi mennyiségben keményítőből [Dean, Gottfried, Adv. Carbohydr. Chem. 5, 127 (1950)], és a szacharóz savas hidrolízisével állítják elő. Annak ellenére, hogy a glükóz előállításához a kiindulási anyag elérhető, a kiindulási anyag költségéhez viszonyítva a glükóz ára magas marad. Ezért, a glükóz kereskedelmi méretű szintézise tökéletesítésre szorul.

A fruktánok a természetben előfordulnak [„Science and technology of fructans” szerk.: Suzuki, M. és Chatterton, N.J., CRC Press, Inc. (1993)]. Növényekből négy fruktánt írtak le: (1) az inulint - egy 2,1-kapcsolt fruktán, mely főként a kétszikűekben, például Jeruzsálemi articsóka és a cikóriagyökerekben, fordul elő -; (2) a levánt vagy fleint - 2,6 kapcsolt fruktán, melyet bizonyos egyszikűekben, például a komócsinban, találtak meg -; (3) 2,1- és 2,6-elágazó láncú fruktánok, melyek egyszikűekben, például az árpában, a kék agávében és a búzában, találhatók; és (4) a neosorozat („neoserries”) fruktánjai, amelyekben a glükózhoz 2,1- és 2,6-helyeken kapcsolt fruktózok találhatók. Ezekben a molekulákban a glükóz nem a molekula végén, hanem a molekulán belül helyezkedik el. Ha a terminális fruktózhoz, a 2,1- és 2,6-helyeken fruktózcsoportok kapcsolódnak, akkor komplex szerkezet alakul ki (spárga). Sok növény e fruktánok közül többet is előállít.

Az élesztőkben és gombákban 2,1-kapcsolt fruktánokat mutattak ki.

Baktériumokban két fruktánt írtak le: (1) egy inulin 2,1-fruktánt a *Streptococcus mutans* fajból, és (2) egy

leván 2,6-kapcsolt fruktánt a *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*, és számos más fajokból.

Az inulinok szerkezetében, egy α -D-glükózidhoz β -2,1-kapcsolt fruktózláncok kapcsolódnak. A szerkezet lineáris, és jellemzően számos β -O-fruktofuranóz egységet tartalmaz. Az átlagos lánc hosszúság és a molekulatömeg-eloszlás függ a növényfajtól, a növekedési fázistól és az alkalmazott kivonási eljárástól. Az átlagos 10-25 egységből álló lánc hosszúság általános, melyen belül a különálló egységek körülbelül 9-24 fruktózegységből tevődnek össze.

Az elágazó inulinok előfordulását is leírták. Ezekben az inulinokban a β -2,1-kapcsolt fruktózláncok olyan α -D-glükózidhoz kapcsolódnak, melyen elágazó β -2,6-fruktóz egységek vannak. Több publikáció szerint ilyen elágazó inulint izoláltak a kék agavé növény nedvéből [Aspinall, G.O. és Gupta, P.C. Das, Proc. Chem. Soc., 718-722 (1959); Satyanarayana, M.N., Indian J. Biochem. Biophys. 13, 408-412 (1976)] és az árpa leveléből [Simmen és mtsai., Plant Physiol., 101, 459-468 (1993)].

Egy inulin tulajdonságai a lánc hosszúság és az elágazás fokának függvényében változhat. A rövid, 3-7 fruktózegységből álló polimerizációs fokú, lineáris láncú inulinokat tartalmazó készítményeket a csökkentett kalóriaértékű szacharózpótlókként (4.003.140 számú német szabadalmi irat) alkalmazzák. A hosszabb láncú inulinokat zsírhelyettesítőként, az elágazó fruktánokat pedig mindkét célra alkalmazni lehet.

Coussement és mtsai, az 5.659.028 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban feltárnak bizonyos elágazó frukto-oligoszaccharidokat, melyek láncszerkezete főként fruktóz egységekből épül fel és előnyösen 2-15 egységből álló lánchosszúságúak. A lánchoz egy vagy két, főleg fruktóz egységekből álló, oldallánc kapcsolódik.

A glükóztermelés területén, Nagle és mtsai., a 4.637.835 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírják a glükóz és más szaccharidok előállítását α -cellulózból. Az eljárásban kalciumklorid katalizátort és hidrogénionokat alkalmaztak.

Miyawaki és mtsai. az 5.524.075 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban egy enzim alkalmazásával, az elfolyósított keményítőből történő nagytisztaságú glükóz előállítását ismertetik.

Venkatasubramanian és mtsai. a 4.299.677 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban a fruktóz és a glükóz közvetlen elválasztását tárják fel ioncserélő membránok alkalmazásával glükóz és fruktóz keverékéből.

Harada és mtsai. az 5.169.679 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban közlik a, főként β -2,1 kötéseket tartalmazó, 2.000-20.000 molekulatömegű, fruktánok táplálékadalékként - mint például szaporítóanyagként, illetve zsírhelyettesítőként - történő felhasználását az alacsonykalóriatartalmú élelmiszer előállításban.

Kurz és mtsai. az 5.478.732 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírnak egy, a közepes lánchosszúságú (azaz 10-12 polimerizációs fokú) inulinok előál-

lítására szolgáló eljárást. Az eljárás során a nyers inulinszuszenziót hidroláz enzimmal kezelik. Az enzimkezelés alatt a rövid láncú összetevők mono- és diszaccharidokra bomlanak - majd ezeket száraz formává alakítják - a hosszú láncú inulinokat pedig elkülönítik.

Adachi és mtsai. a 4.681.771 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban azt közlik, hogy amikor szacharózt (G-F) olyan enzimmal hoznak kapcsolatba, melynek fruktózt transzferáló aktivitása van (ezeket ettől kezdve „fruktoziltranszferáz”oknak nevezzük), egy alacsony kalóriatartalmú, alacsony cariogenic édesítőszer készítményt nyernek. Ez az édesítőszer készítmény glükózt, szacharózt, triszaccharidot (GF_2), tetraszaccharidot (GF_3) és emellett kis mennyiségű fruktózt, pentaszaccharidot (GF_4) és hexaszaccharidot (GF_5) tartalmaz. A hosszabb lineáris inulinok mennyisége jelentősen lecsökken, a frakció többsége GF_{2-3} inulinból áll.

Kono és mtsai. az 5,314,810 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírják, hogy a reakcióban alkalmazott fruktoziltranszferáz féléletideje megnövelhető, ha szemcsés hordozóra, mint például kitozán származékra vagy anioncserélő gyantára, immobilizálják. A leírás szerint egy ilyen védett enzim alkalmazását engedélyezték alacsony cariogenic édesítőszer készítmény ipari előállítására.

Heady a 4.317.880 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírja egy újszerű fruktózipolimer és magas fruktóztartalmú szirup előállítását szacharózból. Az eljárás

rás során a fruktoziltranszferáz enzimet és egy glükóz-izomeráz enzimkészítmény kombinációját alkalmazzák.

A szacharózból kiinduló glükóz és/vagy fruktóz előállítás egy eljárását Catani és mtsai. közlik a 09/019,709 sorozatszámú, 1998 február 6.-án bejelentetett amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés kapcsán.

Jelenleg a szacharózból kiinduló glükózelőállítási eljárások azonban gyenge hatékonyságúak, így a kereskedelmi mennyiségű glükóz előállítása tökéletesítésre szorul.

Ráadásul, még mindig szükség van poliszaccharidok, mint például lineáris vagy elágazó inulinok, kereskedelmi mértékű előállítására alkalmas eljárásokra.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

A találmány szerinti megoldás célja egy olyan eljárás kidolgozása, mely alkalmas a glükóz kereskedelmi mértékű előállítására szacharózból.

A találmány szerinti megoldás másik célja egy olyan eljárás kidolgozása, mely alkalmas glükóz és elágazó fruktán kereskedelmi mértékű előállítására szacharózból.

A glükóz előállítási folyamatával összefüggésben, a fenti célok oly módon is megvalósíthatók, hogy a szacharózt egy reaktorban kapcsolatba hozzuk β -2,1-fruktoziltranszferázzal és β -2,6-fruktoziltranszferázzal. A reakció során glükózt és elágazó fruktánt tartalmazó reakciótermék keletkezik, melyből a glükózt és az elágazó fruktánt elkülönítjük.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint, a glükóz előállítására úgy is elvégezhető, hogy egymás után következő lépésekben a szacharózt egy reaktorban először lánchosszabbító β -2,1-fruktoziltranszferázzal, majd másodszor az elágazásokat létrehozó β -2,6-fruktoziltranszferázzal hozzuk kapcsolatba. A reakció során glükózt és elágazó fruktánt tartalmazó, nagyjából szacharózmentes reakciótermék keletkezik.

A találmány részben azon a felfedezésen alapul, hogy a fruktoziltranszferázok kombinációját nagyobb hatékonysággal lehet alkalmazni a szacharózból (GF) kiinduló glükóz előállításban. Ráadásul, a glükóz előállítása alatt, a szacharóz és a két fruktoziltranszferáz reakciója során elágazó fruktánok keletkeznek, melyek kereskedelmi mennyiségekben izolálhatók, fokozva ezzel a jelen eljárás gazdasági értékét.

Az alábbiakban a találmány és az azzal járó előnyök alaposabb ismertetését nyújtjuk az alábbi részletes leírás és az azt kísérő rajzok segítségével:

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat.

1. ábrán a szacharóz glükózzá és elágazó fruktánná történő átalakításának folyamatábráját mutatjuk be;

1.a ábra egy, a glükóz elválasztására szolgáló külső szeparátorral ellátott, reaktortartályban lezajló, a szacharóz glükózzá és elágazó fruktánná történő átalakításának folyamatát ábrázolja;

2. ábra a szacharóz glükózzá és elágazó fruktánná történő átalakításának, két reaktortartályban lezajló folyamatát ábrázolja;

2.a ábra a szacharóz glükózzá és elágazó fruktánná történő átalakításának, két, a glükóz elválasztására szolgáló külső szeparátorral ellátott, reaktortartályban lezajló folyamatát ábrázolja.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány előnyös megvalósítási módjait.

A kereskedelemben a glükóz egy tartósan jelenlevő árucikk, melyet gyógyászati és étkezési célokra árusítanak. Az elágazó inulinfruktán jó teljesítményt ad az organoleptikus tesztekben és az élelmiszerként történő felhasználás során - akárcsak a nem elágazó inulinok - a szacharózhoz hasonló, jó duzzadási tulajdonságokkal rendelkezik, azonban a fogyasztást követően nem indukál túlzott gázképződést. Élelmiszerként történő felhasználás szempontjából az elágazó levánfruktánnak szintén jó duzzadási tulajdonságai vannak.

A leírás szerinti értelemben, a „ β -2,1-fruktoziltranszferáz” kifejezés jelent minden olyan enzimet vagy enzimeket, amely vagy amelyek képes vagy képesek fruktóz-csoportokat egy szacharózzal, mint donorról, egy szacharózra vagy más szaccharidra (például fruktánra), mint akceptorra, transzferálni és β -2,1 kötéseket kialakítani. A fruktóz egység előnyösen furanóz formában kerül transzferá-

lásra. Ráadásul, előnyös, ha a β -2,1-fruktoziltranszferáz a furanóz formában levő fruktózra, mint akceptorra, nézve szelektív. A növényekben ezekért az enzimaktivitásokért specifikusan a szacharóz:szacharóz 1-fruktoziltranszferáz (1-SST) és a fruktán-fruktán 1-fruktoziltranszferáz (1-FFT) enzimek a felelősek [lásd Pollock és mtsai., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 77-101 (1991)]. Az *S. mutans* baktériumfajból izolált β -2,1-fruktoziltranszferáz képes a szacharózt mind szacharózra, mind pedig fruktánra transzferálni. Egy szacharóz fruktózcsoportjának transzferével egy glükóz-egység keletkezik. A β -2,1-fruktoziltranszferáz transzferálhatja a fruktózt egy terminális fruktóz C1 helyzetére (így például lineáris láncnövekedés jön létre) vagy egy lineáris fruktán (például egy β -2,6-kapcsolt leván) C1 helyzetére. Az utóbbi esetben elágazási pontok keletkeznek. Némely fruktoziltranszferáz mindkét aktivitással rendelkezik (azaz láncmeghosszabbítás és elágazás képzése), de vannak olyan fruktoziltranszferázok is, melyeknek csak egyféle aktivitásuk van. A megfelelő láncmeghosszabbító vagy elágazásokat képző fruktoziltranszferázok kiválasztása az átlagos szakember kötelező tudásához tartozik.

A célra alkalmas β -2,1-fruktoziltranszferázokra - a korlátozás szándéka nélkül - példákat találhatunk a következő fajok közé tartozó mikroorganizmusok között: Aspergillus például *A. oryzae* ATCC 20498; *A. sp.* ATCC 20524; *A. awamori*, *A. sydowi* és *A. niger* ATCC 20611; Penicillium, például *P. jancezewskii* ATCC 10115 és 26546;

P. nigricans; Fusarium, például *F. lini* IAM 5011; Aureobasidium, például *A. pullulans* ACTT 9348; *Streptococcus mutans* ATCC 25175; és *A. pullulans* var. *melanigenum* A-8 ATCC 20612. Alkalmas enzimeket találhatunk a következő élesztő és más mikroorganizmus nemzetségek fajtái között, például Saccharomyces nemzetség, például *S. cerevisiae*; Rhodotorula nemzetség, például *R. lutinis*; Pichia nemzetség, például *P. miso*; Hansenula nemzetség, például *H. miso*; Candida nemzetség, például *C. tropicalis*; illetve a magasabb rendű növények között, például spárga, a dália gumói, cikória gyökerei, és a Jeruzsálemi articsóka (lásd JP-A-56-154967 és JP-B-59-53834 japán közzétételi iratokat).

Egy különösen előnyös enzim a bakteriális β -2,1-fruktoziltranszferáz, melyet a *Streptococcus mutans* fajból izolált gén felhasználásával juthatunk hozzá. Különösen a *S. mutans* ATCC 25175 lehet a fruktoziltranszferáz gén forrása. A fruktoziltranszferázhoz hozzájuthatunk heterológ fehérjeszekvenciával fuzionált konstrukció formájában. Megfelelő fúziósfehérje, például, a *Streptococcus mutans*-ból izolált fruktoziltranszferáz és a glutation-S-transzferáz C-terminális részének fúziójával előállított fehérje.

Az *Streptococcus mutans* fruktoziltranszferázát kódoló - a szignálszekvencia nélküli - szekvenciát a *Streptococcus mutans* ATCC 2517 törzsből, PCR-rel izolálni lehet, majd pedig fel lehet használni fruktoziltranszferáz -fúziósfehérjéket expresszáló transzformánsok előállítására. Egy másik alkalmas fruktoziltranszferáz génszekvenciát a

Streptococcus mutans GS-5 törzsből izolált Shiroza és Kuramitsu [J. Bacteriol., 170, 810-816 (1988)].

A leírás szerinti értelemben a „ β -2,6-fruktoziltranszferáz” (mely levánszintetázként is ismert) jelent minden olyan enzimet vagy enzimeket, mely vagy melyek egy szacharóizról, mint donorról, képesek fruktózrészeket egy szacharózra vagy más szaccharidra (például fruktánra), mint akceptorra, transzferálni és β -2,6 kötéseket kialakítani. A fruktózegység előnyösen furanóz formában transzferálódik. Ráadásul, előnyös, ha a β -2,1-fruktoziltranszferáz furanóz formában jelenlevő fruktózra, mint akceptorra szelektív. Ez specifikusan egy szacharóz:fuktán 6-fruktoziltranszferázra (6-SFT) [lásd Sprenger és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11652-11656 (1995)], és egy fruktán:fuktán 6G-fruktoziltranszferázra (6G-FFT) [lásd Vijn és mtsai., Plant J. 11, 387-398 (1997)] nézve igaz. A β -2,6-fruktoziltranszferáz működése során, a szacharóz fruktózz részének átvitele egy glükózegység keletkezését eredményezi. A β -2,6-fruktoziltranszferáz transzferálhatja a fruktózt egy terminális fruktóz C₆ helyzetére (azaz lineáris lánchosszabbítás történik) vagy egy lineáris fruktóz (például β -2,1-kapcsolt inulin) C₆ helyzetére (azaz elágazási pontok keletkeznek). Némely fruktoziltranszferáz mindkét aktivitással rendelkezik (azaz láncmeghosszabbítás és elágazás képzése), de vannak olyan fruktoziltranszferázok is, melyek csak egyféle aktivitással rendelkeznek. A megfelelő lánchosszabbító vagy elágazásokat képző fruktozil-



transzferázok kiválasztása az átlagos szakember köteles tudásához tartozik.

A célra alkalmas β -2,6-fruktoziltranszferáz megtalálható növényi anyagokban, mint például az árpa levele és különböző fűfélék. Ilyen β -2,6-fruktoziltranszferázt az árpa leveléből már többen leírtak [Simmen és mtsai. Plant Physiol. 101, 459-468 (1993); Duchateau és mtsai., Plant Physiol. 107, 1249-1255 (1995)]. A β -2,6-fruktoziltranszferáz aktivitással rendelkező levánszacharáz előállítható *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) és *Zymomonas mobilis* törzsekből. Az árpából származó szacharóz:fruktán 6-fruktoziltranszferáz tisztítását, klónozását és expresszióját Sprenger és mtsai. írták le [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11652-11656 (1995) és FEBS Lett 400, 355-258 (1997)].

A találmány tárgyát képezi egy eljárás, melyben a szacharózt egyidejűleg mind β -2,1-fruktoziltranszferázzal, és mind pedig β -2,6-fruktoziltranszferázzal reagáltatjuk. Azonban, a találmány oltalmi körébe tartoznak további olyan glikoziltranszferázok, ideértve más fruktoziltranszferázokat is, melyek nem avatkoznak be a β -2,1-fruktoziltranszferáz és a β -2,6-fruktoziltranszferáz reakcióiba.

A fruktoziltranszferázok következő meghatározása egymástól függetlenül érvényes mind a β -2,1-fruktoziltranszferázra és mind pedig a β -2,6-fruktoziltranszferázra.

A fruktoziltranszferázokat immobilizálni lehet egy olyan hordozóra, mely elsődleges vagy negyedleges aminosavat

tartalmaz (a leírást lásd 5.314.810 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés).

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az alkalmazott fruktoziltranszferáz, legalábbis részlegesen, tisztított. A leírás szerinti értelemben a „tisztított” kifejezés azt jelenti, hogy az enzimet abból a gazdaszervezetből, mely az enzimet természetes körülmények között termeli, legalábbis részlegesen kitisztították. A tisztítás előnyösen a lebontó enzimek, mint például az inulinázok (melyek a fruktánt bontják) és a proteázok (melyek a fruktoziltranszferáz enzimet bontják), legalábbis részleges eltávolítását eredményezi. Az enzimet előnyösen addig a fokig tisztítjuk, amíg a lebontó enzimektől meg nem szabadulunk. Amikor az enzim transzfektált *E. coli* mikroorganizmusból származik, a nyers sejtlizátum akkor alkalmazható, ha a transzfektált *E. coli* mentes a lebontó enzimektől.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a tisztított fruktoziltranszferázok mindegyikének a szintetikus aktivitáshoz viszonyított lebontó aktivitása ≥ 1.000 - és 1 közé, még előnyösebben ≥ 1.500 és 1 közé, ennél még előnyösebben ≥ 2.000 és 1 közé esik (például, minden egyes fruktán hasítására, előnyösen legalább 1.000 fruktóz kötés kialakítás esik). Amennyiben úgy tekintjük, hogy egy „egység” (U) egyenlő percenként egy μM monoszaccharid akceptorra történő transzferével, a nyers *A. niger* kultúra felülúszó tartalmaz körülbelül 90 U/mg protein-t, míg a DEAE-tisztított *A. niger* készítményben körülbelül 2.000 U/mg

protein található. 10 μ g DEAE-tisztított készítmény elegendő aktivitással rendelkezik ahhoz, hogy 1 nap alatt, 50°C-on, 1 liter 50%-os szacharózoldatot glükózzá és lineáris fruktánná alakítson. Illetve, legalább két héten keresztül, 50°C-on, ez az enzimekészítmény folyamatosan is üzemeltethető a hatékonyság drasztikus csökkenése nélkül, amennyiben a szacharózt folyamatosan adagoljuk.

A fruktoziltranszferázok mindegyikét 90 - 3.000 U/mg aktivitásig, előnyösen 100-tól 2000 U/mg aktivitásig lehet tisztítani. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a fruktoziltranszferázok mindegyikének ≥ 100 U/mg, előnyösen ≥ 150 U/mg, még előnyösebben ≥ 200 U/mg aktivitása van.

A harmadik fruktoziltranszferáz egy 2,6-G-fruktoziltranszferáz, mely a fruktózt a glükóz C₆ hidroxilcsoportjára transzferálja. Az ilyen 2,6-G-fruktoziltranszferáz fruktózdonoraként előnyösen a szacharózt használja. A célra alkalmas 2,6-G-fruktoziltranszferázt természetben előforduló organizmusokból, a szakember által ismert, hagyományos eljárásokkal lehet izolálni. Az alkalmas természetes forrásokra az oltalmi kört nem korlátozó példák a hagymák, spárga és minden, a liliomfélék közé tartozó növényfaj.

A β -2,1 lineáris lánchosszabbító fruktoziltranszferáz-zal és a β -2,6 lineáris lánchosszabbító fruktoziltranszferázzal együtt alkalmazva olyan csillag alakú fruktánt lehet kialakítani, mely lineáris β -2,1 és β -2,6-láncokat tartalmaz. Az ilyen vegyületek polivalens hordozóként, élelmiszerek felszaporítására, illetve polime-

rekhez magként vagy keresztkötés kialakítására alkalmazhatók.

A találmány szerinti megoldás folyamatának kiindulási anyaga szacharóz vagy szacharóztartalmú készítmény. A „szacharóz” jelent bármilyen nyersanyagforrásból (például cukornádból, vagy cukorrépából) származó, oldat formájában, vagy szárítva jelenlévő, finomított vagy nyers diszachcharidot. A szacharóznyersanyag szacharóztartalma előnyösen ≥ 10 tömeg%, előnyösebben ≥ 20 tömeg%, még előnyösebben ≥ 50 tömeg%, legelőnyösebben $\geq 70\%$. Az adagolt törzsoldat egyéb anyagokat is tartalmazhat, amennyiben azok nem befolyásolják jelentősen a szacharóz glükózzá alakítását (például 1-ketóz (G1-2F1-2F)).

A szacharózt a fent említett bármilyen formában lehet adagolni. Azonban abból a célból, hogy az általános ionerősséget és a reakciókeverék koncentrációt fenntartsuk, a szacharózt száraz formában vagy oldott állapotban, folyamatosan vagy szakaszosan adagoljuk. A reakciókeverékbe a szacharóz adagolásának arányát és gyakoriságát úgy kell megválasztani, hogy az oligoszachcharidok előállításának sebességét magasan tartsuk. Az adagolás aránya és gyakorisága részben függ az alkalmazott fruktoziltranszferáz természetétől és specifikus aktivitásától, a reakció hőmérsékletétől, illetve a glükóz és a fruktán eltávolításának mértékétől. A szacharóz adagolásának optimális mértéke és gyakorisága egy átlagos szakember szakértelmét meg nem haladó, rutin kísérletezéssel megállapítható.

A találmány szerinti eljárást előnyösen vizes oldatban bonyolítjuk le.

A reakcióelegyben a szacharóz koncentrációja nem különösebben behatárolt, az 50 mM és a telített koncentráció között lehet. Tömegszázalékban kifejezve, a reakcióoldatban a szacharóz mennyisége 1-80%-ig (tömeg) lehet, a reakciókeverék teljes tömegét alapul véve, jellemzően 40% és 80% közötti, előnyösen 50% és 70% közötti, még előnyösebben 60%.

Az elágazó fruktánszerkezet a kiválasztott reakciókörülményektől függ. A találmánnyal összefüggésben, ez elágazó fruktánokban két alapvető kötést találhatunk meg: 1) β -2,1 kötéssel kapcsolt fruktóz:fruktóz; és β -2,6 kötéssel kapcsolt fruktóz:fruktóz. Specifikusan elágazó fruktánszerkezetek közé soroljuk 1) a β -2,6-elágazásokat tartalmazó, lineáris β -2,1-inulint; 2) a β -2,1-elágazásokat tartalmazó, lineáris β -2,6-levánt; 3) a β -2,1-elágazásokat tartalmazó β -2,6-elágazásokkal ellátott, lineáris β -2,1-inulint; és 4) a β -2,6-elágazásokat tartalmazó β -2,1-elágazásokkal ellátott, lineáris β -2,6-levánt. Bármilyen lineáris lánchoz hozzáadott elágazáson, mely önmagában is egy elágazási pont, további elágazások kialakíthatók. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a fruktóz szacharózra történő kezdeti transzferének eredményeként, a fruktán egy glükóz egységet tartalmazhat.

A találmány egy megvalósítási módja szerint, egy lánchosszabbító β -2,1-fruktoziltranszferáz hatására lineáris, β -2,1-kötéseket tartalmazó, inulinfruktán alakul ki. Ezután egy fruktóz egység részvételével, egy elágazásképző

β -2,6-fruktoziltranszferáz hatására elágazás jön létre. A szacharóz mindkét fruktoziltranszferáz számára fruktózdonor lehet. A szacharóz, és a fruktán terminális részén levő fruktóz a β -2,1-fruktoziltranszferáz számára, míg a lineáris fruktánlanc a β -2,6-fruktoziltranszferáz számára lehet akceptor. A β -2,1-kötéseket tartalmazó, lineáris inulinfuktán egy vagy több szakaszban alakulhat ki. Az egyszakaszos folyamat a nagyobb számú, alacsony DP-vel (polimerizációfok, „degree of polimerization”) rendelkező inulinlancok keletkezését helyezi előtérbe, míg a több mint egy szakaszt tartalmazó folyamat inkább a kevesebb számú, de hosszabb inulinlancok (például magasabb „DP”-k) keletkezését eredményezi. A hosszabb inulinlancok kialakítására, a szacharóz egy részét fruktánná alakítják, majd ezt követi a maradék szacharóz hozzáadása. Az ilyen meghosszabbított, lineáris fruktánok kialakítását Catani és mtsai írták le [09/019/709 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, 1998. Február 6]. A leírás teljes tartalma a kitanítás részét képezi.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint, a β -2,6-fruktoziltranszferáz hatására egy, β -2,6-kötéseket tartalmazó, lineáris levánfuktán alakul ki, melyen ezután β -2,1-fruktoziltranszferáz, fruktóz egységek felhasználásával, elágazásokat képez. A szacharóz mindkét fruktoziltranszferáz számára fruktózdonor lehet. A szacharóz, és a fruktán terminális részén levő fruktóz a β -2,6-fruktoziltranszferáz számára, míg a lineáris fruktánlanc a β -2,1-fruktozil-transzferáz számára lehet akceptor. A β -

2,6-kötéseket tartalmazó, lineáris levánfruktán egy vagy több szakaszban alakulhat ki. Az egyszakaszos folyamat a nagyobb számú, alacsony DP-vel rendelkező, levánláncok keletkezését helyezi előtérbe, míg a több mint egy szakaszt tartalmazó folyamat inkább a kevesebb számú, de hosszabb levánláncok (pl. magasabb „DP”-k) keletkezését eredményezi. A hosszabb levánláncok kialakítására, a szacharóz egy részét fruktánná alakítják, majd ezt követi a maradék szacharóz hozzáadása. Az ilyen meghosszabbított, lineáris fruktánok kialakítását a meghosszabbított inulinfuktánok előállításának tárgyalásánál írtuk le.

A β -2,1-kötésekkel kapcsolódó, elágazó fruktóz-egységeket, és β -2,6-kötéseket tartalmazó lineáris levánfruktánt mennyiségnövelő anyagként élelmiszerekben és élelmiszerédesítőkből lehet felhasználni. Egy ilyen fruktán jellemzően egy glükózhoz β -2,6-kötéssel kapcsolt 2-15 fruktózegységből, előnyösen 3-10 fruktózegységből, még előnyösebben 4-7 fruktózegységből álló, lineáris levánfruktán vázat tartalmaz. E vázhoz β -2,1-kötésekkel, egy vagy több fruktózegység kapcsolódhat és így elágazási pontok jöhetnek létre. A lineáris levánfruktán vázon az elágazási pontok véletlenszerűen alakulhatnak ki. Egy ilyen fruktán molekulatömege 700 gm/mol-tól 3.600 gm/mol-ig terjedhet. Minden egyes elágazási pontból kiinduló láncot meg lehet hosszabbítani.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint, amennyiben mind a β -2,1-fruktoziltranszferázt és mind a β -2,6-fruktoziltranszferázt szacharózon egyidőben alkalmaz-

zuk, β -2,1- és β -2,6-kötéseket tartalmazó, mind elágazó és mind pedig lineáris fruktánt hozhatunk létre. Mindegyik fruktoziltranszferáz fruktózdonoroként a szacharózt, akceptorként pedig a szacharózt és/vagy a fruktánt használja. Ráadásul, mindegyik fruktoziltranszferáz képes lineáris szerkezetet, vagy elágazásokat kialakítani.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint, mind β -2,1-fruktoziltranszferázzal, mind pedig β -2,6-fruktoziltranszferázzal elágazásokat lehet kialakítani egy lineáris inulinon vagy egy lineáris levánfruktánon. Mindkét fruktoziltranszferáz fruktózdonoroként a szacharózt, akceptorként pedig a fruktánt használja. Ráadásul, mindegyik fruktoziltranszferáz képes lineáris szerkezetet, vagy elágazásokat kialakítani.

A fent leírt fruktánok mindegyikét glikoziltranszferázzal tovább lehet alakítani. A glikoziltranszferáz akceptorként a fruktánt, és glükózdonoroként előnyösen a szacharózt használja.

Az elágazó fruktánok kialakításának egy előnye az, hogy a kizárólag lineáris fruktánok kialakításához viszonyítva a glükózkeletkezés hatékonysága megnövekedik, mivel a szacharózból kialakított minden, az elágazás révén létrejött csoport létrejött egy egység glükózt eredményez. Amikor a szacharózból lineáris fruktán keletkezik, az első fruktóz kapcsolódása a szacharózhoz - egy olyan reakció, mely két egység szacharózt fogyaszt - csak egy egység glükózt eredményez. Ilyenformán, az elágazó fruktánok szacha-

rózból történő szintetizálása a glükózsintézis egy igen hatékony módját biztosítja.

A szacharóz és a fruktoziltranszferázok közötti reakció széles hőmérséklettartományban mehet végbe. A reakció történhet szobahőmérsékleten, azaz 18-25°C-on, illetve majdnem addig a hőmérsékletig, ahol a fruktoziltranszferázok gyors inaktivációja bekövetkezik. Az előnyös hőmérséklettartomány 25-60°C. A reakciót előnyösebben 35-55°C hőmérsékleten, még előnyösebben a 30-50°C hőmérsékleten lehet végrehajtani.

A vizes oldat lehet nem pufferelt vagy a megfelelő pH-n, ismert pufferkomponensekkel, például citráttal, foszfáttal, és TRIS pufferekkel, pufferelt. A puffer alkalmazása előnyös abban az esetben, ha a reakciót megnövelt időtartam alatt, például két hétig, hajtjuk végre.

A szacharóz reagáltatását a fruktoziltranszferázokkal a kereskedelmi mennyiségű glükóz előállításához szükséges időtartam alatt hajtjuk végre. A reakció időtartama, a tétel mennyiségétől függően, 2-48 nap lehet. Folyamatos üzemmód esetében, egy 10 literes térfogatban, 2,5 g/óra reakciósebesség alkalmazható anélkül, hogy 2-4 hét időtartam alatt az enzimaktivitás jelentősen lecsökkenne.

A szacharóz fruktoziltranszferázokkal történő reagáltatása során az alkalmazott pH nem különösebben behatárolt. A reakció pH optimuma az alkalmazott specifikus enzimtől függően változhat. Jellemzően, a pH tartomány 4,0-tól 8,0-ig, előnyösen 5,0-tól 7,5-ig terjed. A még előnyösebb pH körülbelül 6,0.

A találmány szerinti eljárás szakaszos (tételenként, „batchwise”) vagy folyamatos üzemmódban alkalmazható. A folyamatos üzemmód esetén, a reakcióelegyet egy ultraszűrő berendezésen cirkuláltatjuk keresztül, ahol a termék/ek/et folyamatosan, az ultraszűrőkön történő áthaladáskor eltávolítjuk, a transzferáz enzim pedig visszamarad a szűrőn hátramaradt anyagban. Szükség szerint friss szubsztrátumot és enzimet adagolhatunk a reakciókeverékbe abból a célból, hogy helyettesítsük az inaktiválódott enzimeket, mégpedig olyan ütemben, amilyen ütemben az átszűrődött anyagot az ultraszűrőkről eltávolítjuk.

A szacharózt β -2,1-fruktoziltranszferázzal és β -2,6-fruktoziltranszferázzal reagáltathatjuk csőreaktorban.

A csőreaktor jellemzően egy bizonyos hosszúságú csőből, a reakcióáram mozgatásához szükséges pumpából, és a reagáló anyagok adagolásához egy bevezető nyílásból, illetve a reakciótermékek elvezetésére egy kivezető nyílásból áll.

A csőreaktort elő lehet állítani a hagyományos reaktorokat alkotó, a szakember számára ismert anyagokból. Például, a csőreaktort elő lehet állítani rozsdamentes acélból, üvegbevonatú („glass lined”) rozsdamentes acélból, vagy valamilyen polimerből, mint például nagysűrűségű polietilénből, polipropilénből, polivinilkloridból, vagy poliszterből. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a csőreaktort polivinilkloridból állítjuk elő.

A csőreaktor jellemzően cső alakú. A cső átmérője és hossza, a kivitelezésre kerülő reakció függvényében, változhat. A cső belső átmérője általában 2,54 és 61 cm között, előnyösen 10,2 és 51 cm között, még előnyösebben 15,2 és 25,4 között van.

A csőreaktorhoz tartozik egy pumpa, mely a reaktor tartalmát a cső hosszirányában mozgatja. A szakember számára ismert hagyományos pumpák e célra megfelelők. Többek között alkalmas pumpák - az oltalmi kör korlátozása nélkül - a következőkkel jellemezhetők:

A pumpa, jellemzően, olyan teljesítményű, hogy 3,1-62 cm/sec, előnyösebben 6,2-31 cm/sec, még előnyösebben 9,3-28 cm/sec anyagáramlást tud biztosítani. Előnyösen, a pumpa, szilárd dugóként viselkedő áramlást biztosít.

A csőreaktor bevezető nyílása nincs különösképpen körülhatárolva, és lehet akár egy egyszerű nyílás, mely lehetővé teszi, egy kezdeti adagban vagy a reaktor működési ideje alatt folyamatosan, a reagáló anyagok bevezetését. A reagensek bemérése a reaktorba történhet akár gravimetrikusan, akár pedig a pumpával. A reagenseket szilárd halmazállapotban, például por alakjában, vagy egy alkalmas oldószerben oldva, oldatként vezethetjük be a reaktorba.

A reakciókat további, a fentiekben leírt, bevezető nyílásokkal is el lehet látni. Ezek a nyílások a reaktor hossz tengelyében helyezkednek el, a kezdeti bevezető nyílástól lefelé. Ezeket a bevezető nyílásokat további reagenseknek, a reakcióáram mentén történő adagolására lehet alkalmazni.

A reaktor kivezető nyílása nem különösképpen behatárolt. A nyílás lehet a reaktor teljes tartalmának egy közvetlen elvezetése, vagy egy olyan nyílás, mely a reakciótermékek szelektív eltávolítását biztosítja. Egy termék szelektív eltávolítása történhet például méretkizárásos szűrővel.

A reaktor hossza, a specifikus reakció és a reakció körülmények - például a reaktor átfolyási rátája és a hőmérséklet - függvényében változhat.

A reaktort fel lehet szerelni a hőmérsékletet szabályozó rendszerrel, így például hűtő vagy fűtő berendezéssel. A hőmérséklet beállításának lehetősége, előnyösen, a reaktor mentén változhat. Így különböző hőmérsékleti zónákat lehet beállítani a reaktor hossztengelye mentén.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a szacharóz és a β -2,1-fruktoziltranszferáz reakciója a csőreaktor első részében történik, majd a reaktor alsóbb részében ezt követi a β -2,6-fruktoziltranszferázzal végrehajtott reakció. A β -2,6-fruktoziltranszferázzal végrehajtott reakciót megelőzően, a β -2,1-fruktoziltranszferázt, megfelelő hőmérsékleten és időtartamig végzett, hőkezeléssel inaktiválni lehet. A körülbelül 1 percre tartó hőkezelést jellemzően 65-95°C-on, előnyösen körülbelül 75-90°C-on, még előnyösebben körülbelül 85°C-on hajtjuk végre. Egy másik lehetőség szerint, az inaktivációs zónában, a csőreaktor anyagáramából a biológiai katalizátort eltávolítjuk például méretkizárásos membránnal, vagy hasonlóval. A inaktivációt úgy is elérhetjük, hogy a biológiai katalizá-

torhoz öngyilkos szubsztrátumot (*suicide substrate*) adagolunk, amely a biokatalitikus aktivitást megszünteti. A fruktoziltranszferázt előnyösen hőkezeléssel inaktiváljuk.

Az akceptorként fruktánt használó, β -2,6-fruktoziltranszferáz aktivitással rendelkező levánszacharázt - melyet *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) expressziójával nyerhetünk - specifikusan alkalmazhatunk. Az inulin láncon kialakításra kerülő, fruktóz β -2,6-kötésekhez a levánszacharáz a szacharóz hatékony felhasználását biztosítja. Ilyen fruktoziltranszferázt a szakember által ismert, hagyományos eljárásokkal állíthatunk elő. Amennyiben a sikerül a szacharózt hatékonyan reagáltatni, a glükóz eltávolítása a maradék szacharóztól egyszerűbbé válik.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a β -2,6-fruktoziltranszferázzal történt reakciót követően a szacharózkoncentráció, már ha van, ≤ 20 tömeg%, még előnyösebben ≤ 10 tömeg%, még előnyösebben ≤ 5 tömeg%, még előnyösebben ≤ 1 tömeg%.

A reakció kivitelezhető egy reaktorban vagy, a reagensek adagolására megfelelő bevezetéssel, illetve a termékek elvezetésére szolgáló kivezetésekkel felszerelt, reaktorok sorozatában. A kivezetés lehet, egy specifikus termékre nézve, szelektív. A szelektivitás megvalósítható megfelelő szeparátorok biztosításával, melyek a termék eltávolítását lehetővé teszik, más anyagokat pedig visszaforgatnak a reaktorba. A szeparátor lehet membrán vagy kromatográfiás oszlop. Bizonyos esetekben, a szeparátor membránok

és/vagy kromatográfiás oszlopok sokaságát tartalmazhatja, biztosítva ezzel a kívánt termék szelektív eltávolítását.

A glükóztermelési reakció után a fruktoziltranszferázokat, a reakciókeverék körülbelül 100°C-on, 10-15 percig végzett hőkezelésével, inaktiválhatjuk. Kívánság szerint, az enzimeket a reakciókeverékből, a megfelelő méretű szűrővel végzett ultraszűréssel, eltávolíthatjuk akár a hőinaktivációs lépést megelőzően, akár pedig utána.

A fruktán jellemzően, β -2,1-kötésekkel kialakított, β -O-fruktanózból álló fruktózegységekből felépülő, lineáris vázzal rendelkezik. A β -O-fruktanózegységek száma jellemzően 4-20, előnyösen 4-15, még előnyösebben 4-8. A lineáris fruktánvázhoz β -2,6-kötéssel egy vagy több β -O-fruktanózegység kapcsolódik. A vázhoz kapcsolódó fruktózegységek száma és sűrűsége változhat, azonban, jellemzően, átlagosan legalább 1 kapcsolódó fruktózegység esik minden 5 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre, előnyösen legalább 1 esik minden 4 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre, előnyösebben legalább 1 esik minden 3 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre, még előnyösebben legalább 1 esik minden 2 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre. Ezek az arányok csak a lineáris vázon található elágazásokra vonatkoznak.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, az elágazó fruktán lánc az elágazást képző fruktózon, β -O-fruktanózegységek β -2,1-kötéssel történő kapcsolódásával, tovább növekedhet. Így fésű alakú, elágazó fruktánszerkezet alakul ki. Az elágazást képző fruktózhhoz

β -2,1-kötéssel kapcsolódó β -O-fruktanózegységek száma a reakció körülményeitől függően változhat. A különálló, elágazást képző fruktózegységekhez jellemzően 2-20, előnyösen 2-10, még előnyösebben 2-8 fruktózegység kapcsolódik. Nem szükséges, hogy minden egyes elágazást képző fruktózegység azonos számú lánchosszabbító fruktózegységet hordozzon. A „fésűszerkezetű polimer” kifejezés a polimerekkel foglalkozó kémiában jól ismert. Így az itt leírt elágazó fruktánszerkezet a szakember számára világos.

A találmány oltalmi körébe tartozik továbbá, egy lineáris szerkezetű, β -2,1-kötéssel kapcsolódó fruktánhoz csatlakozó egyedülálló fésűszerű láncokon az elágazások és a meghosszabbított láncú elágazások kialakítása. A különálló fésűszerű láncokhoz kapcsolódó fruktózegységek száma és sűrűsége változhat, azonban, jellemzően, átlagosan legalább 1 kapcsolódó fruktózegység esik minden 5 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre, előnyösen legalább 1 esik minden 4 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre, előnyösebben legalább 1 esik minden 3 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre, még előnyösebben legalább 1 esik minden 2 β -2,1-kötéssel lineárisan kapcsolt fruktózegységre. Ezek az arányok csak a lineáris, fésűszerű vázon található elágazásokra vonatkoznak. A fésűn az elágazást képző fruktózhöz β -2,1-kötéssel kapcsolódó β -O-fruktanózegységek száma a reakció körülményeitől függően változhat. A különálló, elágazást képző fruktózegységekhez jellemzően 2-20, előnyösen 2-10, még előnyösebben 2-8 fruktózegység kapcsolódik. Nem szükséges, hogy minden egyes

elágazást képző fruktózegység azonos számú lánchosszabbító fruktózegységet hordozzon.

Bemutatósi célból, megadjuk a szacharózból kiinduló, legalább β -2,1-fruktoziltranszferázt és β -2,6-fruktoziltranszferázt alkalmazó, glükózelőállítás specifikus részleteit.

A szacharózt és a β -2,1-fruktoziltranszferázt egy reaktorban reagáltatjuk. A reaktor tartalmazhat egy -bevezetést a szacharóz adagolásához és egy kivezetést a glükóz eltávolítására. Amilyen ütemben a polimerizáció foka növekedik, olyan ütemben nő a glükóz koncentrációja, így lehetséges, hogy a glükózt kialakító reakció hozama csökkeni fog. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a reakció során a glükózt a reakciókeverékből eltávolítjuk. A glükózt, a szakember számára ismert hagyományos eljárásokkal, például membránszűréssel vagy kromatográfiával, el lehet távolítani. A találmány szerinti megoldásban tárgykörén belül a kromatográfiás eljárásként alkalmazhatunk szakember számára ismert ioncserélő és méretkizárásos eljárásokat. A pumpát alkalmazni lehet a membránnal vagy az oszloppal szembeni nyomás növelésére. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a glükóz számára kialakított kivezetés tartalmaz egy membránt, amely lehetővé teszi a glükóz eltávolítását a reakcióelegyből, de meggátolja a szacharóz, a fruktán vagy a fruktoziltranszferáz távozását.

Ezután a β -2,6-fruktoziltranszferáz hozzáadása következik, mely a szacharózzal reagálva a lineáris láncon elágazásokat képez.

A glükózt folyamatosan, szakaszosan vagy félszakaszosan távolíthatjuk el; a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a glükózt a reakcióelegyből folyamatosan távolítjuk el.

A glükóz izolálása és tisztítása a szakember számára ismert, hagyományos eljárásokkal, például szűréssel, történhet, majd ezután következhet a kristályosítás.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a reakciókeverékből a fruktánt is eltávolítjuk. Előnyösebben, a fruktánt a reakciókeverékből folyamatosan távolítjuk el. A fruktán eltávolítása a szakember számára ismert hagyományos eljárásokkal, például membránszűréssel vagy kromatográfiával, mint például ioncsere vagy gélszűrés, történhet. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a fruktán számára kialakított kivezetés tartalmaz egy membránt, mely lehetővé teszi a fruktán eltávozását a reakciókeverékből, anélkül, hogy a szacharózt, a glükózt vagy a fruktoziltranszferázt keresztülengedné. Esetleg, a fruktánt a reakciókeverékből elkülönítjük, a szacharózt és glükózt pedig visszaadagoljuk a reakciókeverékbe.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az induláskor adagolt szacharóz tömegéhez viszonyítva, a termelt fruktán mennyisége ≥ 10 tömeg%, előnyösen ≥ 20 tömeg%, még előnyösebben ≥ 30 tömeg%, még előnyösebben ≥ 40 tömeg%, legelőnyösebben ≥ 50 tömeg%.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az induláskor adagolt szacharóz tömegéhez viszonyítva az előállított glükóz hozama 25-50 tömeg%, előnyösen ≥ 25 tö-

meg%, előnyösebben ≥ 33 tömeg%, még előnyösebben ≥ 37 tömeg%, még ennél is előnyösebben ≥ 40 tömeg%, és legelőnyösebben körülbelül 50 tömeg%.

A találmány szerinti megoldásban a kereskedelmi mennyiségeket a glükóztermelés mértékeként határozzuk meg: 10^3 - 10^5 kg/nap, előnyösen ≥ 1000 kg/nap mennyiség, előnyösebben ≥ 2000 kg/nap, még előnyösebben ≥ 5000 kg/nap. Ráadásul, a kereskedelmi mennyiség előállításának mértéke a szacharózalapanyag mennyiségéhez viszonyul. Ezért, a fent megállapított mennyiségek egy egységnyi, azaz 6000 kg, szacharóz feldolgozásán alapulnak. Eszerint a „kereskedelmi mennyiség” kifejezés nem egy abszolút értékre, hanem inkább a termelés kereskedelmileg elfogadható mértékére vonatkozik.

A glükóztermelés hatékonyságának növelésére, a találmány egy, a szakaszos lánchosszabításra vonatkozó, előnyös megvalósítási módja szerint, minden egyes adag 20-25%-ot tartalmaz az előző reakcióból származó termékből. Eszerint, miután egy tétel kezdeti lánchosszabbítása befejeződött, a reagensek 75-80 tömeg%-át eltávolítjuk, a maradék 20-25 tömeg% pedig reagensként visszamarad egy második tétel lánchosszabításra. Így, az első reakciótermék 20-25 tömeg%-a reaktort ellátja szacharózzal és β -2,1-fruktozil-transzferázzal. Ilyen módon, a szacharózról a β -2,1-fruktozil-transzferázzal történő fruktózátvitel, magasabb rendű fruktánok magasabb koncentrációjának jelenlétében zajlik le, így a triszacharidok (F-F-G) képződése helyett, inkább a magasabb rendű fruktánok kialakulása kerül előtér-

be. Miután a magasabb rendű fruktánok termelése sokkal hatékonyabb glükóztermelést eredményez, ezért ez az eljárás még sokkal hatékonyabb glükóztermeléshez vezet.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a folyamat hatékonysága az el nem reagált szacharóz visszanyerésével tovább fokozható. Az el nem reagált szacharóz, ha ugyan van ilyen, a lánchosszabbítás (β -2,1-fruktozil-transzferáz) vagy az elágazások képzése során (β -2,6-fruktoziltranszferáz) keletkezett termékből származik. Jellemzően, egy fruktoziltranszferáz szacharózzal történő reagálása egy, glükózt, el nem reagált szacharózt, fruktánt és fruktózt tartalmazó, reakciókeveréket eredményez. Az el nem reagált szacharóz eltávolítása és a fruktoziltranszferázok számára nyersanyagként történő visszaforgatása nagyban megnöveli a glükóztermelés hatékonyságát.

Jellemzően, egy szimulált mozgó ágyas eljárás során egy anioncserélő gyanta egy sóját - mint például a 4-6%-os mértékben keresztkötött, sztiroldivinil-benzolszulfonsav gyanta nátrium sója - alkalmazunk hordozóként. Ha a gyantában a keresztkötések mértéke a 6%-ot meghaladja, akkor az elválasztás hatékonysága csökken. Amennyiben a gyantában a keresztkötések mértéke kevesebb, mint 4%, akkor a gyanta mechanikai integritása nem kívánatos. Alkalmas gyanta, mint amilyen a DOWEX® ioncserélő gyanta, a Dow Chemical-től beszerezhető.

A glükóz elválasztását a szakember számára ismert, hagyományos üreges-típusú membránokon alapuló, méretkizárásos technikák alkalmazásával is meg lehet oldani. A keres-

kedelemben beszerezhető, G_{10} és G_5 méretkizárásos membránok egymás utáni kombinációja biztosítja a glükóz hatékony izolálása mellett a szacharózt és az alacsonyabb rendű fruktánokat tartalmazó frakció hatékony elkülönítését. A szacharózt és az alacsonyabb rendű fruktánokat tartalmazó frakciót a reaktorba vissza lehet cirkuláltatni.

Az 1. ábrán bemutatott berendezésnek a következő elemei vannak: 1 első reaktor, 2 szacharóz bevezetésére szolgáló bemenet, 3 glükóz elvezetésére szolgáló kimenet, 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenet, és egy 5 szeparátor, mely a glükózra permeábilis, de nem permeábilis a szacharózra, a fruktoziltranszferázra, vagy a fruktánra. A szacharózt a 2 szacharóz bevezetésére szolgáló bemeneten keresztül vezetjük be az 1 első reaktor β -2,1-fruktoziltranszferázt és β -2,6-fruktoziltranszferázt tartalmazó részébe. Egy ilyen elrendezés esetén, elkülönítés jön létre, azaz a fruktánok a szeparátor egyik oldalán koncentrálódnak. A reaktor egy 3 glükóz elvezetésére szolgáló kimenettel is el van látva, mely kimenet a 5 szeparátor glükóz felőli oldalán helyezkedik el. A 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet fel lehet szerelni egy szeparátorral (nincs ábrázolva), mely átengedi a fruktánt, de visszatartja a szacharózt, a glükózt vagy a fruktoziltranszferázokat. Amennyiben a fruktán elkülönítésére membránrendszert alkalmazunk, a membrán lehetővé teszi a glükóz és a szacharóz áthaladását, de visszatartja az elágazó fruktánt. Így a fruktánt hatékonyan el lehet különíteni.

Az 1.a ábrán bemutatott berendezésnek a következő elemei vannak: 1 első reaktor, az 1a első elkülönített reaktorrészt, 2 szacharóz bevezetésére szolgáló bemenet, 3 glükóz elvezetésére szolgáló kimenet, 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenet, és 5 egy szeparátor a glükóz elkülönítésére. A szacharózt 2 szacharóz bevezetésére szolgáló bemeneten keresztül vezetjük be az 1 reaktor, β -2,1-fruktoziltranszferázt és β -2,6-fruktoziltranszferázt tartalmazó, 1a első elkülönített reaktorrésztbe. Egy ilyen elrendezés esetén, a reakcióelegyből a glükózt azelőtt különítjük el az 5 szeparátorral, mielőtt kieresztenénk 3 glükóz elvezetésére szolgáló kimeneten. A glükózelválasztás során keletkezett maradékot visszacirkuláltatjuk az 1a első elkülönített reaktorrésztbe. A 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet fel lehet szerelni egy szeparátorral (nincs ábrázolva), mely átengedi a fruktánt, de visszatartja a szacharózt, a glükózt vagy a fruktoziltranszferázokat.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a reaktor tartalmaz egy, a szacharóz bevezetésére szolgáló, külső szeparátorral felszerelt bemenet, melynél a szeparátor elválasztja a szacharóztól mind a glükózt, mind pedig a fruktánt. Az el nem reagált szacharóz, amennyiben van, visszakerülhet a reaktorba.

A 2. ábrán bemutatott berendezésnek a következő elemei vannak: 1 első reaktor, 2 és 2' szacharóz bevezetésére szolgáló bemenetek, 3 és 3' glükóz elvezetésére szolgáló kimenetek, 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenet, 5 és 5' szeparátorok, amelyek a permeábilisak a glükózra, de nem

permeábilisak a szacharózra, a fruktoziltranszferázra, vagy a magasabbrendű fruktánra, 6 második reaktor, 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenet, 9 elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimenet. Két reaktort alkalmazunk, melyek mindegyike 5 és 5' szeparátorokkal van megosztva. A szeparátorok permeábilisak a glükózra, de nem permeábilisak a szacharózra, a fruktoziltranszferázra, vagy a lineáris, illetve elágazó fruktánra. Az 1 első reaktorban, a szacharóz koncentrációja olyan, amilyen a lineáris β -2,1-inulinfuktánok szintéziséhez szükséges. A termék ezután a 7 a lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemeneten keresztül a 6 második reaktorba jut. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, vagy a 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenet, vagy pedig a 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenet az aktív fruktoziltranszferázt nem engedi áthaladni. Ezt úgy lehet elérni, hogy vagy a 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet, vagy pedig a 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenetet egy olyan membránnal látjuk el, amely az aktív fruktoziltranszferázt nem engedi áthaladni. Esetleg, akár a 4 a fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet akár pedig a 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenetet egy, a fruktoziltranszferázt inaktiváló zónával szereljük fel. A zónában az inaktiválás történhet a megfelelő ideig tartó és megfelelő hőmérsékleten végrehajtott hőinaktivációval. A körülbelül 1 percig tartó hőinaktiváció jellemzően körülbelül 65-95°C-on, előnyösen körülbelül 70-90°C-on, még előnyösebben körülbelül 85°C-on történik. A 6 második reaktorban a β -2,6-

A 2.a ábrán bemutatott berendezésnek a következő elemei vannak: 1 első reaktor és a reaktor egy 1a első elkülönített reaktor rész, 2 és 2' szacharóz bevezetésére szolgáló bemenetek, 3 és 3' glükóz elvezetésére szolgáló kimenetek, 4 lineáris fruktán elvezetésére szolgáló kimenet, 5 és 5' szeparátorok, melyek a permeábilisak a glükózra, de nem permeábilisak a szacharózra, a fruktoziltranszferázra, vagy a lineáris, illetve elágazó fruktánra, 6 második reaktor és 6a második elkülönített reaktor rész, 7 a lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenet és 9 elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimenet. Két reaktort alkalmazunk, melyek 5 és 5' szeparátorokkal vannak felszerelve. A szeparátorok permeábilisak a glükózra, de nem permeábilisak a szacharózra, a fruktoziltranszferázra, vagy a lineáris, illetve elágazó fruktánra. Az 1a első elkülönített reaktor részben, a szacharóz koncentrációja olyan, amilyen a lineáris β -2,1-

inulinfruktánok szintéziséhez szükséges. A termék ezután a 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemeneten keresztül a 6a második elkülönített reaktorrészbe jut. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, vagy a 4 lineáris fruktán elvezetésére szolgáló kimenet, vagy pedig a 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenet az aktív fruktoziltranszferázt nem engedi áthaladni. Ezt úgy lehet elérni, hogy vagy a 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet, vagy pedig a 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenetet egy olyan membránnal látjuk el, amely az aktív fruktoziltranszferázt nem engedi áthaladni. Esetleg, akár a 4 fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet akár pedig 7 lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenetet egy, a fruktoziltranszferázt inaktiváló zónával szereljük fel. A zónában az inaktiválás történhet a megfelelő ideig tartó és megfelelő hőmérsékleten végrehajtott hőinaktivációval. A körülbelül 1 percre tartó hőinaktiváció jellemzően körülbelül 65-95°C-on, előnyösen körülbelül 70-90°C-on, még előnyösebben körülbelül 85°C-on történik. A 6 második reaktorban a β -2,6-fruktoziltranszferázt a 6a második elkülönített reaktorrész tartalmazza, és a lineáris fruktánt szacharózzal reagáltatjuk. A glükóz az 5' szeparátoron keresztül haladhat és a 3' glükóz elvezetésére szolgáló kimeneten keresztül elvezetjük. Az elágazó fruktánokat a 9 elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimeneten keresztül távolíthatjuk el. A 9 elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet fel lehet szerelni egy szeparátorral (nincs ábrázolva), amely átengedi az elágazó fruktánokat, de visszatartja

a szacharózt, a glükózt vagy a β -2,6-fruktoziltranszferázt. Az 5 és 5' szeperatorokat a jelen levő egyéb anyagok - a glükóz kivételével -, például szacharóz és alacsonyrendű fruktánok, szükség szerinti visszaforgatását jelző vonallal együtt ábrázoltuk.

A találmány szerinti eljárás kivitelezése előnyösen olyan reaktorban történik, mely kereskedelmi mennyiségű, elágazó fruktán előállítására alkalmas. A reaktor előnyösen tartalmaz egy vagy több bevezetést a szacharóz és/vagy a fruktoziltranszferázok számára és eszközöket az elágazó fruktánok kereskedelmi mennyiségeinek elkülönítésére. A reaktor állhat több tartályból - ahogyan azt a 2. és a 2.a ábrákon bemutattuk - melyek reaktorrendszerként üzemelnek.

A találmány oltalmi körébe tartoznak az enzimatikus úton előállított fruktánokon végrehajtott további, akár hagyományos kémiai eljárással, akár pedig további enzimatikus eljárással végzett, módosítások. A kémiai módosítások magukban foglalhatják többek között az alkilezést, dehidratációt, gyűrűképzést és részleges hidrolízist. Az enzimatikus módosítások magukban foglalhatják többek között a glikolizációt.

Az elágazó fruktán élelmiszerekben vagy olyan élelmiszerédesítőkben, melyek önmagukban is édesek, szaporítóanyagként fel lehet használni.

Miután a találmányt általánosságban leírtuk, azt részletekbe menően is bemutatjuk a kitanítás részét képező, egyes konkrét példák útján, mely példák a szemléltetés cél-

ját szolgálják, de a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

A klónozási és expressziós eljárás

A *Streptococcus mutans* fruktoziltranszferázt kódoló, az előre jelzett szignálszekvencia nélküli, szekvencia, PCR segítségével a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 törzsből izolálható. Két láncindítót terveztünk és szintetizáltunk. Az első, egy 5'-TCTGCGGGATCCCAGGCAGATGAAGCCAATTCAAC-3' szekvencia tartalmaz egy *Bam*HI restrikciós helyet, és az azt közvetlenül követő, *Streptococcus mutans* fruktoziltranszferázt kódoló szekvenciájának az előre jelzett szignálszekvenciájával azonos szekvenciát. A második láncindító, az 5'-TCTGCGAAGC TTTTATTTAAAACCAATGCTTACACA-3', *Hind*III restrikciós helyet tartalmaz, melyet a fordított, a *Streptococcus mutans* fruktoziltranszferázt kódoló szekvenciája C-terminálisával komplementer szekvencia követ. Mindkét láncindítót együttesen kombináltuk a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 törzsből izolált genomikus DNS-el, és PCR reakciót végeztünk. A kapott DNS-fragmentumot *Bam*HI-el és *Hind*III-al emésztettük, és *Bam*HI-el és *Hind*III-al emésztett, pGEX-KT-ext-plazmidba ligáltuk. A ligálás eredményeként megkaptuk a fent leírt *Streptococcus mutans* fruktoziltranszferázt leolvasó keretbe illesztve, glutathion-S-transzferázt (GST) kódoló szekvenciát 3'-irányban közvetlenül követően. A pGEX-KT-ext-*Streptococcus-mutans*-fruktoziltranszferáz-plazmiddal *E. coli* BL21-sejteket transzformáltunk. Az eredményül kapott transzformánsokkal végzett fehérjeexpresszió során, intracellulárisan felgyülemlett GST-ext-*Streptococcus-mutans*-fruktozil-

GST-ext-*Streptococcus*-mutáns-fruktoziltranszferáz-fúziósfehérjéhez jutottunk.

Nyilvánvalóan, a fenti kitanítás fényében, a találmány szerinti megoldás számos változtatása és módosítása lehetséges. Ezért nyilvánvaló, hogy az igénypontokban meghatározott oltalmi körön belül, a találmányt a leírásban konkrétan ismertettektől eltérő módon is gyakorlatba lehet venni.

Hivatkozási jelek jegyzéke

1	reaktor
1a	első elkülönített reaktorrészt
2, 2'	szacharóz (bevezetésére szolgáló) bemenet
3, 3'	glükóz (elvezetésére szolgáló) kimenet
4	fruktóz (elvezetésére szolgáló) kimenet
5, 5'	szeparátor
6a	második elkülönített reaktorrészt
6	második reaktor
7	lineáris fruktán bevezetésére szolgáló bemenet
9	elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimenet

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás a glükóz szacharózból történő előállítására azzal jellemezve, hogy:

i) szacharózt β -2,6-fruktoziltranszferázzal és β -2,1-fruktoziltranszferázzal érintkeztetünk, miáltal glükózt állítunk elő, és

ii) a glükózt elkülönítjük az elegyből.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy β -2,1-fruktoziltranszferázként *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus sydowi*, *Aureobasidium sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, *Streptococcus mutans*, *Penicillium jancezewskii* vagy magasabbrendű növények β -2,1-fruktoziltranszferázát alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a β -2,6-fruktoziltranszferáz és β -2,1-fruktoziltranszferáz legalább egyikeként fruktoziltranszferáz-génnek természetes körülmények között a gént nem tartalmazó gazdaszervezetben történő expresszáltatásával előállított fruktoziltranszferázt alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a glükózt folyamatosan, vagy félig szakaszosan különítjük el.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a reakciótermék-elegy tartalmaz elágazó fruktánt is, és az elegyből elágazó fruktánt is elkülönítjük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az elágazó fruktánt folyamatosan különítjük el.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a glükózt membránszűréssel vagy kromatografálással különítjük el.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az elágazó fruktánt membránszűréssel vagy kromatografálással különítjük el.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy β -2,1-fruktoziltranszferázként egy lánchosszabbító fruktoziltranszferázt alkalmazunk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy β -2,6-fruktoziltranszferázként egy elágazást képző fruktoziltranszferázt alkalmazunk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy β -2,1-fruktoziltranszferázként egy elágazást képző fruktoziltranszferázt alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy β -2,6-fruktoziltranszferázként egy lánchosszabbító fruktoziltranszferázt alkalmazunk.

13. Kereskedelmi mennyiségű glükóz előállítására szolgáló reaktor azzal jellemezve, hogy tartalmaz: (a) reaktortartályt; (b) szacharóz bevezetésére szolgáló bemenetet (2); (c) glükóz elvezetésére szolgáló kimenetet (3); és

(d) β -2,1-fruktozil-transzferázt és β -2,6-fruktoziltranszferázt.

14. A 13. igénypont szerinti reaktor azzal jellemezve, hogy egy az elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimenetet (9) is tartalmaz.

15. A 13. igénypont szerinti reaktor azzal jellemezve, hogy a szacharóz bevezetésére szolgáló bemenet (2) egy folyamatosan üzemeltethető bemenet.

16. A 13. igénypont szerinti reaktor azzal jellemezve, hogy az elágazó fruktán elvezetésére szolgáló kimenet (9) egy folyamatosan üzemeltethető kimenet.

17. A 13. igénypont szerinti reaktor azzal jellemezve, hogy a glükóz elvezetésére szolgáló kimenet egy folyamatosan üzemeltethető kimenet.

12+2=99 oldal

of 87

2001. 03. 19.

A meghatalmazott:

Danubia

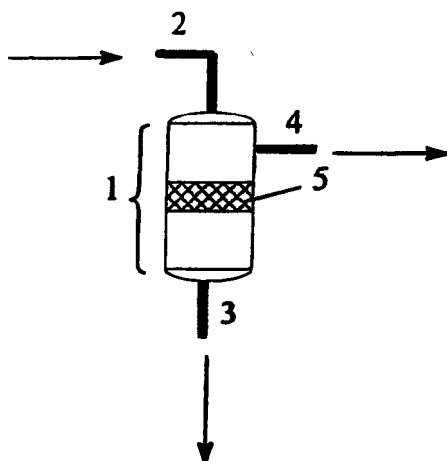
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Sv

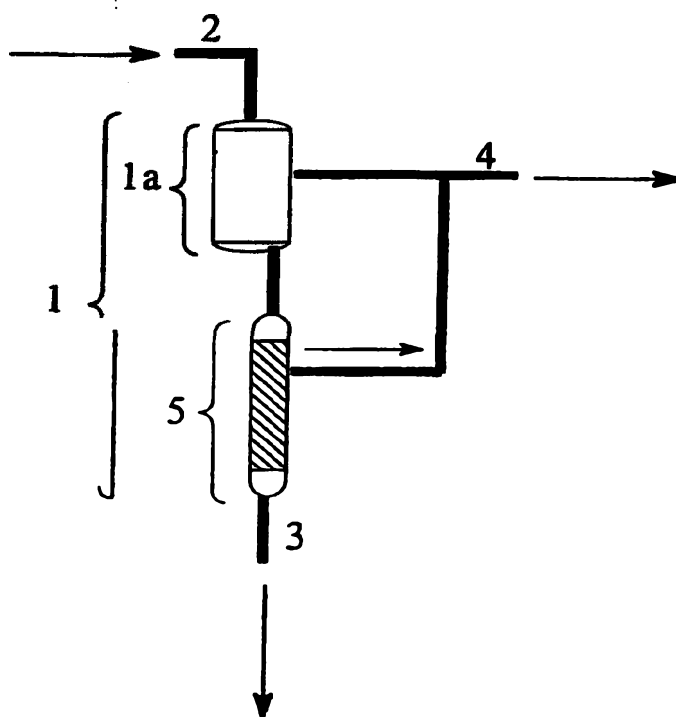
Svingor Ádám

P0102675

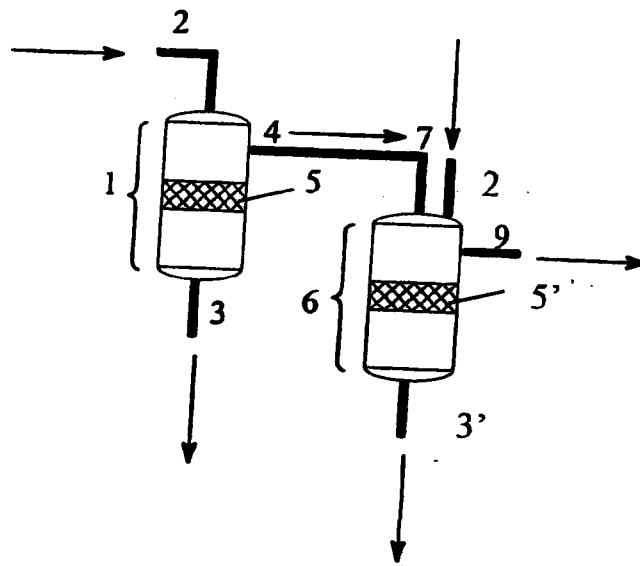
1. ábra



1a ábra



2. ábra



2a ábra

