

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147409 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **1891/81**

(51) Int.Cl.³: **C 12 P 19/14**

(22) Indleveringsdag: **29 apr 1981**

// **C 12 N 9/24**

(41) Alm. tilgængelig: **30 okt 1982**

(44) Fremlagt: **23 jul 1984**

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: —

(71) Ansøger: ***NOVO INDUSTRI A/S; Novo Alle, 2880 Bagsværd, DK.**

(72) Opfinder: **Lena Ellsabeth *Zittan; DK, Ivan Verner *Diers; DK, Karen Margrethe *Oxenbøll; DK, Birgitte *Højer-Pedersen; DK.**

(74) Fuldmægtig: —

(54) **Fremgangsmåde til hydrolysering af inulin ved hjælp af et aspergillus ficuum-inulinasepræparat**

(57) Sammendrag:

1891-81

Fremgangsmåde til fremstilling af fructose ud fra inulin ved hjælp af et nyt inulinasepræparat.

Fructosefremstillingen ud fra inulin foretages ved at ud-sætte en opløsning af inulin for enzymatisk hydrolyse ved pH 3,5 - 7 og ved 60 - 65°C; inulinasepræparatet, der indeholder exo- og endo-inulinase i et forhold mellem 1:10 og 10:1, udviser en meget høj termisk stabilitet (mindst 50% aktivitet efter 2 dage ved 60°C og pH 4,5 i oprindelig 20%'s inulinopløsning).

DK 147409 B

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til hydrolysering af inulin, der er egnet til anvendelse i en industriel proces til fructosefremstilling.

Fructose er det naturligt forekommende ernærings-
5 sukker med størst sødeevne, idet det har en sødeevne på ca. 1,4 gange sucroses sødeevne. Det er letopløseligt i vand og har en højere opløselighed end sucrose. Det kunne finde en udstrakt anvendelse inden for levnedsmiddelindustrien, f.eks. i alkoholfri drikke, hvis produktionsomkostningerne
10 kan reduceres væsentligt.

Fructose findes i et stort antal frugter og i honning. Fructose udgør 50% af sucrose og kan fremstilles ud fra sucrose ved hjælp af syre- eller enzymatisk hydrolyse efterfulgt af separation. Imidlertid er en separation af
15 lige store mængder af glucose og fructose, der kan udføres ved specielle krystallisationsteknikker eller ved kromatografisk separation, kostbar og er en af årsagerne til, at omkostningerne ved fructoseproduktion indtil nu har været betydeligt højere end for sucrose.

20 Fructose fremstilles også i store mængder ved enzymatisk isomerisering af glucosesirupper til fremstilling af sirupper, der har en sødeevne, der er sammenlignelig med sucroses. Ved isomeriseringen af sirupper er imidlertid fructoseindholdet begrænset til ca. 42% på grund af isomeri-
25 seringslignevægten mellem glucose og fructose. Sirupper med højere fructoseindhold, f.eks. 55% eller 90%, fremstilles ved hjælp af kromatografisk separationsteknik på isomeriserede sirupper.

En alternativ måde til at forøge fructoseindholdet
30 i isomeriserede sirupper ville være at blande dem med rene eller næsten rene fructosesirupper.

En potentiel kilde for fructose er inulin. Inulin er en ikke-forgrenet fructosepolymer, der i naturlig form består af ca. 35 beta-fructosefuranoserester afsluttet af et
35 glucosemolekyle bundet til fructose via en alfa-1, beta-2-binding som i sucrose.

Inulin forekommer som oplagsnæring i forskellige planter, især i sådanne, der hører til familien Compositae, idet gode kilder er jordskokrodknolde, dahliarodknolde, cikorierødder og mælkebøtterødder. Inulin er næsten uopløselig i koldt vand, men kan opløses i varmt vand. (Jf. Yanousuy et al., J.A.C.S. 55, (1933) 3658 - 3663).

Inulin kan ekstraheres med varmt vand fra vegetabilsk materiale på velkendt måde, f.eks. ved modstrømsdiffusion af snittede plantedele ved forøget temperatur eller ved at presse saften ud. Den rå saft renses ved filtrering gennem aktivt kul eller alternativt ved behandling med kalk, som ved sukkerroebearbejdningen, og affarvning med kul.

Foruden inulin kan ekstrakten indeholde polymerer med lavere kædelængde, f.eks. fructosepolymerer og fructosepolymerer afsluttet med glucose. Middelkædelængden af sådanne polymerer kan variere med plantekilden og dyrknings-, høstnings- og opbevaringsbetingelser, men vil ofte ligge mellem DP_5 til DP_{15} (DP = polymerisationsgraden).

Inulin kan hydrolyseres med syre under forholdsvis milde betingelser, pH-værdi 1 - 2, 1 - 2 timer ved 80 - 90°C. Imidlertid giver syrehydrolyse anledning til farve- og biproduktdannelse, f.eks. af ca. 5% difructosedianhydrid, der reducerer udbyttet tilsvarende. (Whistler et al., "Polysaccharide Chemistry" Academic Press, Inc., N.Y. 1953, side 287).

Da fructose i opløsning synes at være mest stabil inden for et pH-område på 4 - 6, antages en fremgangsmåde til hydrolysering af inulin udført inden for dette område at være fordelagtig for at undgå biproduktdannelse og isomerisering.

Enzymer, der er i stand til at hydrolysere inulin, er beskrevet i litteraturen som værende tilgængelige fra vegetabiliske materialekilder (inulinholdige rødder og rodknolde) og fra mikroorganismer. De mikrobielle enzymer kan opnås fra gær, f.eks. *Kluyveromyces fragilis*, *Candida pseudotrophicalis* eller kefir, samt fra svampe, såsom *Aspergillus*-, *Fusarium*- og *Penicillium*-arter.

De mikrobielle enzymer beskrives at have pH-optima i området fra pH 3,5 - 5,5 og temperaturoptima mellem 45°C og 55°C. Enzymerne angives hurtigt at tabe aktiviteten ved 60°C.

5 De mikrobielle inulinaser fremstilles både intra- og ekstracellulært. Enzymernes evne til at hydrolysere både inulin og sucrose er i nogle tilfælde (*Kluyveromyces fragilis*) tilskrevet et enzym med to aktiviteter. (Nahm et al., "Purification and Characterization of Inulase from
10 *Kluyveromyces fragilis*", Korean Biochem. J., Vol. 10 (2), side 95 - 108, 1977).

Både endo- og exo-inulinase er blevet rensset fra *Aspergillus niger*. Endekomponenten har sin maksimumsaktivitet ved pH 5,3 og 45°C. Exekomponenten har sin maksimumsaktivitet ved pH 5,0 og 55°C. (Nakamura et al., "Studies on
15 Microbial Inulase part IV," Nippon Nogeikagaku Kaishi, Vol. 52 (4), side 159 - 166, 1978 og Nakamura et al., "Studies on Microbial Inulase Part V", N.N.K., Vol. 52 (12), side 581 - 587, 1978).

20 På grund af den forholdsvis begrænsede opløselighed af inulin skal en hydrolyse af inulin udføres i forholdsvis fortyndede opløsninger, og som det allerede er blevet understreget fortrinsvis inden for et pH-område på ca. 4 - 6. En 20% vægt/vægt opløsning af ren inulin ud fra
25 dahliarødder fremstilles ved 60°C, men en sådan opløsning er overmættet og udfælder ved henstand. Den maksimale mængde af inulin, der er opløselig i vand ved 50 - 60°C, vil naturligvis afhænge af polymeriseringsgraden af fructosepolymeren. Desto lavere procestemperaturen er, desto lavere er natur-
30 ligvis opløseligheden af inulin, og desto mere fortyndet vil inulinopløsningen være.

For at undgå mikrobielle infektioner af de forholdsvis fortyndede inulinopløsninger bør den industrielle procestemperatur være mindst ca. 60°C og fortrinsvis 60 -
35 65°C. Dette temperaturniveau er sædvanlig praksis inden for stivelsesindustrien, hvor f.eks. forsukringsprocessen sædvanligvis udføres ved 60°C og 30% vægt/vægt DS i 2 - 5 dage.

Uheldigvis er de enzymer, der er beskrevet i den kendte teknik, dårligt egnede til kommerciel anvendelse ved 60°C, idet de deaktiveres for hurtigt. Ikke desto mindre er af praktiske årsager 60°C det laveste, fornuftige hydrolyse-
5 temperaturniveau både på grund af inulins opløselighed og for at undgå mikrobiel kontaminering.

Der eksisterer derfor et behov for et effektivt inulinasepræparat, der er tilstrækkeligt termostabilt til at kunne anvendes ved 60 - 65°C i forøgede perioder, f.eks. 1 -
10 5 dage, for at tillade hydrolyse af inulin på en økonomisk måde. Hidtil er der ikke ifølge opfindernes viden blevet beskrevet et inulinasepræparat, der har disse egenskaber.

Da den foreliggende opfindelse beskæftiger sig med kommerciel anvendelighed, skal et enzymatisk fremstillet
15 hydrolyseprodukt være meget overlegent hvad angår omkostninger og kvalitet i forhold til et syrehydrolyseret produkt, da fructose af høj kvalitet er tilgængelig enten fra inversion af sucrose eller fra fraktioneret separation af isosirupper. Inulinhydrolysatet bør således indeholde over 98
20 vægt% monosaccharid i forhold til tørstofindholdet. Udtrykket "fuldstændig hydrolyse", som det anvendes i det følgende, refererer til fremstillingen af et inulinhydrolysat, der indeholder over 98 vægt% glucose + fructose på basis af tørre, faste bestanddele.

25 Den foreliggende opfindelse bygger på den overraskende erkendelse, at inulin hydrolyseres mest effektivt, når inulinasepræparatet indeholder både endo- og exokomponenten, og når forholdet mellem disse komponenter ligger inden for et bestemt område, samt at et inulinasepræparat med det
30 korrekte forhold og desuden en forbedret termostabilitet kan fås ved dyrkning af *Aspergillus ficuum* - stammer.

Inulinaseenzympræparatet, der anvendes ifølge opfindelsen, har sit temperaturoptimum ved 60°C, men kan anvendes ved 65°C ved pH-værdier mellem 3,5 og 7, fortrins-
35 vis mellem 4 og 6, og især ved en pH-værdi mellem 4,5 og 5,0. Det bevarer mindst 50% af sin oprindelige aktivitet ved 60°C i 20% inulin vægt/vægt efter 48 timer.

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangsmåde til hydrolyse af inulin, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en opløsning af inulin ved en pH-værdi i området fra 3,5 til 7 ved en temperatur i området fra 60
5 til 65°C underkastes en enzymatisk fuldstændig hydrolyse i nærværelse af et mikrobielt inulinasepræparat, der har et forhold mellem endo-inulinase og exo-inulinase i området fra 1:10 til 10:1 på vægtbasis, hvilket inulinasepræparat stammer fra en *Aspergillus ficuum*-stamme.

10 Ved en industriel proces vil substratet for hydrolysen enten være en ekstrakt af inulinholdige planter, f.eks. cikorie, jordskok eller dahlia, eller en suspension af snittet plantemateriale i vand. Ekstrakten fremstilles på velkendt måde, og kan renses ved kalkbehandling, kulbe-
15 handling eller ionbytning, før hydrolysen udføres.

Inulinhydrolysen kan udføres som en batchproces i et konventionelt (dextrin) forsukringsudstyr. Fuldstændig hydrolyse af inulin (d.v.s. 98% eller mere glucose + fructose) opnås ved processen. Reaktions tiden afhænger af enzymdoseringen og kan udstrække sig til 2 - 4 dage for mere effektiv anvendelse af enzymet uden biprodukt- eller farvedannelse. Den totale inulasedosering (exo og endo kombineret) er af størrelsesordenen 0,25 - 10 Somogyi-enheder pr. g inulin, fortrinsvis 1 - 5 Somogyi-enheder.

25 Både i laboratorieskala og i industriel skala vil inulineksrakterne ofte være forholdsvis fortyndede, f.eks. 5 - 25% tørstof. Inulinekstrakten kan koncentrerer til grænseværdien for opløseligheden af inulin eller fructosepolymerne deri ved procestemperaturen. Som det allerede er blevet understreget vil inulinopløsninger være ømfindtlig overfor mikrobiel infektion, hvis reaktionstemperaturen ikke er tilstrækkelig høj til at undgå mikrobiel vækst. Konserveringsmidler kan naturligvis anvendes, men dette vil forøge procesomkostningerne både hvad angår udgifter til konserveringsmidler og til dets fjernelse efter bearbejdningen.
30
35

Ifølge en foretrukket udførelsesform for den foreliggende opfindelse ligger forholdet mellem endo- og exokom-

ponenten fortrinsvis i området fra 7:1 til 1:7 og mest foretrukket i området fra 1:2 til 4:1.

Det hidtil ukendte inulinasepræparat, der anvendes ifølge opfindelsen, fremstilles ved dyrkning af *Aspergillus* 5 *ficuum*-stammer. Disse hidtil ukendte inulinaser er tilstrækkelig termostabile til at kunne udøve opfindelsen. Deres pH-optimum er egnet til udøvelse af opfindelsen. De ovennævnte mikroorganismer producerer både endo- og exoinulinaser. Imidlertid har forholdet mellem endo- og exo-inulinase- 10 aktiviteten af inulinasen fremstillet af *Aspergillus ficuum* vist sig at være stammespecifikke. Det har således vist sig, at inulinaseenzymet fremstillet ud fra *Aspergillus ficuum*, stamme CBS 55565, der er identisk med ATCC 16882, indeholder endo- og exokomponenten i det optimale forhold til udøvelsen 15 af opfindelsen, hvorfor dens anvendelse til fremstilling af inulinasepræparatet foretrækkes.

Opfindelsen skal forklares nærmere under henvisning til tegningen, som viser kromatogrammer, der illustrerer den forskellige enzymatiske virkning af endo- og exo- 20 inulinasekomponenterne fra *A. Ficuum* A-524 (ATCC 16882).

Endo- og exoenzymet kan adskilles ved ionbytning på CM-sepharose CL-6B, der er en kationisk ionbytter, der leveres som en gel, se "Ion-Exchange Chromatography, Principles and Methods", udgivet af Pharmacia Fine Chemicals, 25 side 18. Endoaktiviteten bevæger sig ved pH 4,1 i 0,01 M acetatpuffer, mens exoaktiviteten bindes til ionbytteren, hvorefter exoaktiviteten kan elueres ved hjælp af en saltgradient i pufferen (NaCl 0 M - 0,3 M). Ved hjælp af efterfølgende gelfiltrering på Sephacryl S-200 (fremstillet ved 30 covalent tværbinding af allyldextran med N,N'-methylenbisacrylamid, jfr. "Gel Filtration, Theory and Practice," udgivet af Pharmacia Fine Chemicals, side 12), fremstilles praktisk taget ren exoaktivitet. Endoaktivitetsfrontfraktionen blev ultrafiltreret og pufferen blev ændret til en 0,01 M 35 fosfatpuffer med pH 7,0. Denne endoenzymopløsning blev ionbyttet på en anionisk ionbytter DEAE-Sephacryl CL-6B, se "Ion-Exchange Chromatography, Principles and Methods", udgivet af Pharmacia Fine Chemicals, side 18. Under disse ændre-

de betingelser fikseres endoenzymet på ionbytteren, og det elueres derpå ved hjælp af en saltgradient i pufferen (NaCl, 0 M - 0,3 M). Endoenzymet blev yderligere rensat ved adsorptionskromatografi på hydroxyapatitagarosegel (HA-Ultrogel).
5 På denne måde blev der fremstillet meget rene endo- og exo-komponenter.

Ved hjælp af de rene endo- og exoaktiviteter blev specifikke antisera fremstillet ved immunisering af kaniner. På basis af disse antisera kunne der udføres en kvantitativ
10 analyse på endo- og exokomponenterne ved hjælp af raketimmunelektroforese som beskrevet i N.H. Axelsen et al., "A Manual of Quantitative Immunoelktrophoresis," 1977, side 37. Ved hjælp af raketimmunelektroforese af opløsningerne af endo- og exokomponenterne med kendt koncentration (fortyn-
15 dingsserier) har det vist sig, at der eksisterer en næsten lineær sammenhæng mellem logaritmen af koncentrationen og arealet under raketten. På basis af de tilsvarende standardkurver kan det ovenfor angivne område mellem endo- og exokomponenten beregnes for et inulinasepræparat. Det har vist
20 sig, at den maksimalt opnåelige inulinomdannelse (ca. 99%) opnås i løbet af forholdsvis kort tid, når der anvendes inulinasepræparater med de ovenfor angivne forhold mellem endo- og exokomponenterne.

På grund af det faktum, at raketimmunelektroforeseanalysen ikke nødvendigvis skelner mellem aktiv og inaktiv inulinase, bestemmes imidlertid inulinaseaktiviteten og invertaseaktiviteten af inulinasepræparaterne, der anvendes ifølge opfindelsen, yderligere ved hjælp af de nedenfor angivne enzymaktivitetsbestemmelser. Inulinaseaktiviteten
30 (dækkende både endo- og exoaktivitet) bestemmes på følgende måde:

Substrat:	5% inulin i acetatpuffer (0,1 M) pH 4,7
Inkubation:	1 ml substrat + 1 ml enzym 20 min., 50°C
Stopreagens:	4 ml 0,5 N NaOH

35

Det frigjorte reducerende sukker (fructose og små mængder glucose) bestemmes kvantitativt ved hjælp af Somo-

gyi-Nelson metoden, se Journal of Biological Chemistry, Vol. 153, side 375 - 380, 1944.

En inulaseaktivitetsenhed defineres som mængden af enzym, der er i stand til at danne et micromol reducerende 5 sukker pr. minut under de ovenfor angivne betingelser.

Invertaseaktiviteten (hovedsagelig dækkende exoaktiviteten) bestemmes på følgende måde:

Substrat: 10% sucrose i acetatpuffer (0,1 M)
pH 4,7

10 Inkubation: 1 ml substrat + 1 ml enzym 20 min.,
50°C

Stopreagens: 1 ml 0,1 N NaOH

Den frigjorte glucose bestemmes kvantitativt ved hjælp af GOD-PERID metoden, se Instruction Sheets for Manual 15 Assays '77, Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica, Sheet 277.439.6 (1).

Sammenfattet hydrolyseres inulin ved 60 - 65°C, og hydrolysen er mest effektiv, når forholdet mellem endo- og exokomponenterne i inulinasen ligger inden for det ovenfor 20 beskrevne foretrukne område på 1 - 7 og 7 - 1. Der dannes næsten ingen biprodukter under hydrolyseprocessen. Den dannede fructosesirup kan koncentrerer og renses på konventionel måde til blandingsformål. Alternativt krystalliseres fructose eventuelt efter adskillelse fra glucose til frem- 25 stilling af krystallinsk fructose.

Den foreliggende opfindelse skal yderligere illustreres ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

Dyrkning af en inulinaseproducerende mikroorganisme

30 *Aspergillus ficuum* ATCC 16882 (A 524) blev dyrket på følgende måde:

Dyrkning af podestof

Podekulturen blev dyrket på skråagar ved 37°C i 7 dage på en agar med følgende sammensætning:

		g/liter
	Gærekstrakt (Difco)	4
	K_2HPO_4	1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
5	Glucose	15
	Agar (Difco)	15
	H_2O op til	1000 ml

Podning af rysteflasken

Dyrkningen af den inulinaseproducerende mikroorga-
 10 nisme blev udført i 500 ml Erlenmeyerkolber udstyret med en
 not og en podegummiåbning.

Podematerialet fra en agarskråkultur blev frem-
 stillet ved at hælde 9 ml sterilt vand indeholdende 0,1%
 polyoxyethylen-sorbitan-monooleat "Tween 80" over en agar-
 15 skråkultur med efterfølgende rystning på en Whirlingblander.
 Den totale suspension blev anvendt til podning af én ryste-
 flaske.

Dyrkning

Dyrkning i rysteflasker udførtes ved 37°C i 7 dage
 20 under anvendelse af 100 ml af et substrat med følgende sam-
 mensætning:

		g/liter
	Majsstøbevand	20
	$NH_4H_2PO_4$	12
25	KCl	0,7
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
	K_2HPO_4	10,0
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
	Sucrose	25
30	$CaCO_3$	0,05
	Pluronic	0,1
	(overfladeaktivt stof af typen polyoxypropylen- polyoxyethylen)	

Før autoklaving blev pH-værdien af substratet indstillet til 4,5. Følgende udbytter blev opnået:

	Inulinaseaktivitet enheder/ml	Invertaseaktivitet enheder/ml
5		
A. ficuum A 524	3	19

Eksempel 2

Virkemåde af de to inulinasekomponenter

90 g inulin fra dahliarødder Sigma nr. I-3754, herefter betegnet som Sigmainulin, blev opløst i varmt vand til en totalvægt på 450 g. pH-værdien blev ved 60°C indstillet til 4,5, og to kolber blev hver fyldt med 150 g af opløsningen. Kolberne blev udstyret med en magnetisk omrører og anbragt i et vandbad ved 60°C. Til den første kolbe blev der sat 0,175 ml ren exoinulinasekomponent svarende til 2,2 inulinaseenheder pr. g inulin. Til den anden kolbe blev der sat 0,7 ml ren endokomponent svarende til 1,4 enheder pr. g inulin.

Exo- og endoenzymerne blev fremstillet ud fra A. ficuum A 524 dyrket som beskrevet i eksempel 1 og adskilt som beskrevet ovenfor.

Prøver blev udtaget med faste intervaller og opvarmet i et kogende vandbad i 10 minutter til inaktivering af enzymerne. Efter afkøling blev prøverne filtreret og derpå opvarmet med en "mixed bed" ionbytterharpiks (Bio-Rad AG 501-X8 (D)) til fjernelse af aske og opløselig N før de blev analyseret ved hjælp af gelkromatografi.

Kromatogrammerne efter 4 og 48 timers reaktion er afbildet på tegningen. Det fremgår, at virkemåden af de to enzymer er helt forskellig.

Exoenzymet danner hovedsagelig DP_1 og kun små toppe mellem DP_2 og DP_{14} ses. Dette indikerer en virkemåde, hvor inulinmolekylet nedbrydes trinvis til fructose og glucose fra fructoseenheden. I modsætning hertil giver endoen-

zymet anledning til dannelse af hovedsagelig DP_3 og DP_6 og kun mindre toppe af DP_1 og DP_2 . Dette er et typisk endoangrebsmønster. Med dette endoinulinase kan imidlertid øjensynlig også DP_1 - og DP_2 -grupper fraspaltes, men med en meget 5 langsommere hastighed end det ses ved exoenzymet.

Eksempel 3

Blanding af exo- og endokomponenterne

160 g Sigmainulin blev opløst i varmt vand til en totalvægt på 800 g. pH-værdien blev ved ca. 60°C indstillet 10 til 4,5. 7 kolber blev hver fyldt med 100 g af opløsningen og udstyret med magnetiske omrørere og derpå anbragt i et vandbad ved 60°C.

Endo- og exokomponenterne blev sat til kolberne, idet den totale enzyemmængde på proteinbasis blev holdt konstant, men under variation af forholdet mellem endo- og 15 exoenzymet ifølge følgende skema:

	Endo/exo- forhold	ml Endo	ml Exo	Total aktivitet/g inulin Somogyi-enheder
1	∞	0,192	0	0,54
20 2	7	0,168	0,024	0,92
3	3	0,144	0,048	1,3
4	1	0,096	0,096	2,1
5	3/1	0,048	0,144	2,8
6	1/7	0,024	0,168	3,2
25 7	0	0	0,192	3,6

1 ml endoenzym og 1 ml exoenzym indeholder den samme mængde enzym på proteinbasis.

Med faste intervaller blev prøver udtaget og opvarmet i kogende vandbad i 10 minutter for at inaktivere 30 enzymaktiviteten. Efter afkøling blev prøverne filtreret og derefter behandlet med en "mixed bed" ionbytterhapiks (Bio-Rad AG 501-X8 (D)) til fjernelse af aske og N før analyse

med HPLC. Resultaterne er angivet i tabelform i det følgende.

På kromatogrammet kan glucose i alle tilfælde adskilles fra en anden top, sandsynligvis difructose. Større mængder af denne forbindelse afspejler sig i en lille ændring af retentionstiden for glucose. DP_4 omfatter saccharider med kædelængde på 4 eller mere.

$DP_1 - DP_3$ er saccharider med kædelængde fra 1 (undtagen glucose og fructose) til 4.

10 Eksemplet illustrerer, at den mest effektive hydrolyse opnås, når endo/exo-forholdet er ca. 1.

Endo/exo- forhold		24 timer	48 timer	72 timer
5	- Fructose	14,3	29,1	47,3
	Glucose	9,3	12,5	12,6
	DP ₄ ⁺	31,9	19,8	11,8
	DP ₁ -DP ₃	44,6	38,5	28,4
10	7 Fructose	62,2	83,6	89,3
	Glucose	10,1	7,0	5,2
	DP ₄ ⁺	13,8	3,2	1,2
	DP ₁ -DP ₃	14,0	6,2	4,4
15	3 Fructose	84,8	90,4	91,2
	Glucose	4,8	5,5	5,8
	DP ₄ ⁺	6,2	1,5	0,9
	DP ₁ -DP ₃	4,2	2,6	2,1
20	1 Fructose	93,3	94,3	93,7
	Glucose	3,8	4,7	5,4
	DP ₄ ⁺	1,9	0,6	0,4
	DP ₁ -DP ₃	1,0	0,4	0,4
25	1/3 Fructose	91,1	93,8	94,3
	Glucose	3,9	4,8	4,8
	DP ₄ ⁺	4,1	1,0	0,5
	DP ₁ -DP ₃	0,9	0,5	0,4
30	1/7 Fructose	90,0	93,5	94,4
	Glucose	3,9	4,6	4,3
	DP ₄ ⁺	5,3	1,5	0,8
	DP ₁ -DP ₃	0,8	0,4	0,4
	0 Fructose	84,8	89,6	90,4
	Glucose	3,4	4,1	5,0
	DP ₄ ⁺	11,3	5,7	3,4
	DP ₁ -DP ₃	0,5	0,5	1,3

Eksempel 4

Hydrolyse af inulineksrakt under anvendelse af forskellige
endo-exo-komponentforhold

Fremstilling af substrat

35 22,8 kg tørrede snittede cikorierødder blev
ekstraheeret med 227 kg vand ved 75°C i ca. 1 time ved natur-

ligt pH 5,3. Blandingen blev filtreret, og de våde rødder ekstraheredes igen med 150 kg vand ved 75°C i 30 minutter.

De to ekstrakter gav totalt 295 liter ekstrakt med et tørstofindhold målt til 3,5 °Brix.

- 5 Ekstrakten blev rensat ved kalkbehandling. To portioner på hver 687 g Ca(OH)_2 tilsattes lidt efter lidt ved en temperatur på 35 - 40°C. Filtrering udførtes ved 40 - 45°C. CO_2 sættes til filtratet, hvorved pH-værdien faldt til ca. 7. Der sås intet bundfald. Opløsningen blev behand-
- 10 let med aktivt kul (2% kul på basis af tørrede rødder) ved 75°C i 30 minutter. Kullet fjernedes ved filtrering, og opløsningen blev inddampet under vacuum til et tørstofindhold på ca. 24 °Brix. Den resulterende inulinopløsning havde en brunlig farve.

15 Hydrolyse af inulineksrakten

- Ca. 800 ml af den ovennævnte inulinopløsning blev fortyndet til en Brix-værdi på 20°, pH-værdien blev indstillet til 4,5, og opløsningen deltes i 7 kolber med 100 g opløsning i hver. Kolberne blev udstyret med en magnetisk
- 20 omrører og anbragtes i et vandbad i 60°C.

Endo- og exoenzymerne sættes til kolberne, idet den totale enzyemmængde på proteinbasis blev holdt konstant, men idet endo-exokomponentforholdet varieredes efter følgende tabel:

25	Endo/exo-	ml	ml	Total aktivitet/°Brix DS
	forhold	Exo	Endo	Somogyi-enheder
	∞	0	0,096	0,27
	7	0,012	0,084	0,46
	3	0,024	0,072	0,65
30	1	0,048	0,048	1,05
	1/3	0,072	0,024	1,4
	1/7	0,084	0,012	1,6
	0	0,096	0	1,8

- 1 ml endoenzym og 1 ml exoenzym indeholder på
- 35 proteinbasis omtrent den samme mængde enzymkomponent.

Med faste intervaller blev prøver udtaget og opvarmet i kogende vand i 10 minutter til inaktivering af enzymaktivitet. Efter afkøling blev prøverne, omfattende en prøve af substrat uden tilsat enzym, filtreret og derpå 5 behandlet med en "mixed-bed"-ionbytterharpiks (Bio-Rad AG 501-X8 (D)) til fjernelse af aske og opløselig N før HPLC analyse. Resultaterne er angivet i tabellerne III og IV.

"Glucose" er de kombinerede mængder af glucose og en anden komponent, muligvis difructose, der ikke er adskilt 10 på kromatogrammerne. DP_4+ omfatter saccharider med en kædelængde på 4 eller mere samt urenheder i denne prøve, f.eks. salt og protein.

DP_1 - DP_3 er saccharider med en kædelængde på fra 1 til 4, undtaget glucose og fructose.

15 Det endelige glucoseudbytte i dette forsøg er ret højt, hvilket viser en lav middelhkædelængde af fructosepolymererne.

Her ses det imidlertid også, at den mest effektive hydrolyse udføres, når endo/exoenzymforholdet er tæt på 1.

Tabel III

Sammensætning af inulinsubstrat

	Fructose	0,7%
	Glucose	0,2%
5	Sucrose	5,5%
	DP ₄ ⁺	90,4%
	DP ₁ -DP ₃	3,2%

Tabel IV

	Endo/exo- forhold	24 timer	48 timer
10	∞	Fructose 12,7	21,5
		"Glucose" 7,1	9,2
		DP ₄ ⁺ 42,7	31,8
		DP ₁ -DP ₃ 37,6	37,5
15	7	Fructose 49,6	71,2
		"Glucose" 10,9	11,0
		DP ₄ ⁺ 18,4	4,9
		DP ₁ -DP ₃ 21,1	12,9
20	3	Fructose 68,9	82,2
		"Glucose" 11,4	12,3
		DP ₄ ⁺ 8,2	2,4
		DP ₁ -DP ₃ 11,6	3,2
25	1	Fructose 81,5	84,0
		"Glucose" 12,2	13,0
		DP ₄ ⁺ 4,1	1,8
		DP ₁ -DP ₃ 2,2	1,2
30	1/3	Fructose 79,5	83,7
		"Glucose" 12,8	13,1
		DP ₄ ⁺ 4,5	2,0
		DP ₁ -DP ₃ 3,2	1,1
35	1/7	Fructose 79,0	83,6
		"Glucose" 12,5	12,8
		DP ₄ ⁺ 5,6	2,5
		DP ₁ -DP ₃ 2,9	1,1
	0	Fructose 79,4	83,4
		"Glucose" 12,5	12,2
		DP ₄ ⁺ 6,5	3,0
		DP ₁ -DP ₃ 1,5	1,4

Eksempel 5Hydrolyse af inulin under anvendelse af forskellige
endo/exokomponentforhold

6 kolber, der hver indeholdt 100 g af en 20%
5 Sigmmainulinopløsning ved pH 4,5, blev fremstillet. Kolberne
blev udstyret med en magnetisk omrører og anbragt i et vand-
bad ved 60°C.

Endo- og exo-inulinaseenzymerne blev tilsat til
kolberne, idet enzymaktiviteten blev holdt inden for et mere
10 snævert område end i eksempel 3, men igen ved at variere
forholdet mellem endo- og exoenzymerne vægtmæssigt som det
fremgår af følgende tabel:

	Endo/exo-forhold på proteinbasis	Endo/exo-forhold på aktivitetsbasis	Sum af aktivite- ter pr. g inulin
15	∞	∞	0,67
	4,1	0,6	0,90
	2,7	0,4	0,88
	1,35	0,2	0,95
	0,45	0,07	1,00
20	0	0	1,09

Med faste intervaller blev prøver udtaget og
opvarmet i kogende vand i 10 minutter til inaktivering af
enzymaktivitet. Efter afkøling blev prøverne filtreret og
derpå behandlet med en "mixed-bed"-ionbytterharpiks (Bio-Rad
25 AG 501-X(D)) til fjernelse af aske og opløselig N, før de
blev analyseret ved hjælp af HPLC. Resultaterne er vist i
Tabel V.

Glucose er de kombinerede mængder af glucose og en
anden komponent, muligvis difructose, der ikke kan adskilles
30 på kromatogrammet. DP₄⁺ omfatter saccharider med en kæde-
længde på 4 eller mere. DP₁-DP₃ er saccharider med kæde-
længder fra 1 til 4 undtaget glucose og fructose.

I dette forsøg findes den mest effektive hydrolyse for en dosering på ca. 1 enhed, når forholdet er 4,1, bestemt gravimetrisk.

Tabel V

5	Endo/exo forhold	Komponenter	24 timer	48 timer	72 timer
10	∞	Fructose	3,7	5,6	33,8
		"Glucose"	5,1	6,8	13,1
		DP ₄ ⁺	37,1	17,1	15,3
		DP ₁ -DP ₃	54,2	70,5	37,9
15	4,1	Fructose	77,4	91,5	94,7
		"Glucose"	5,5	3,8	3,3
		DP ₄ ⁺	10,0	2,9	1,4
		DP ₁ -DP ₃	7,1	1,8	0,6
20	2,7	Fructose	80,0	92,9	94,5
		"Glucose"	5,4	3,3	3,4
		DP ₄ ⁺	9,1	2,6	1,7
		DP ₁ -DP ₃	5,5	1,2	0,5
25	1,35	Fructose	75,9	90,0	92,8
		"Glucose"	3,8	3,5	3,3
		DP ₄ ⁺	16,8	5,1	3,1
		DP ₁ -DP ₃	3,5	1,5	0,8
30	1,45	Fructose	71,0	88,1	92,5
		"Glucose"	3,1	3,7	3,4
		DP ₄ ⁺	23,8	7,3	3,5
		DP ₁ -DP ₃	2,1	0,9	0,7
30	0	Fructose	64,8	75,5	82,8
		"Glucose"	2,3	2,9	3,2
		DP ₄ ⁺	31,9	20,8	13,2
		DP ₁ -DP ₃	1,0	0,8	0,8

Eksempel 6

2 kolber hver indeholdende 100 g 20% vægt/vægt Sigmmainulinopløsning ved pH 4,5 blev fremstillet. Kolberne

blev udstyret med magnetisk omrører og anbragt i et vandbad ved henholdsvis 60 og 65°C.

Inulinaseenzymet fra *A. ficuum* (A 524 = ATCC 16882) blev tilsat i en dosering på 2,8 enheder/g inulin.

5 Inulinasen fra *A. ficuum* havde et endo/exo-forhold på 1.

Prøver blev udtaget med faste intervaller og behandlet som i de foregående eksempler.

Følgende resultater blev opnået:

Temp.	Dosering		24	48	72	96	
10 °C	enheder/g	Komponenter	timer	timer	timer	timer	
	inulin						
	60	2,8	Fructose	94,0	95,5	95,3	95,1
			Glucose	4,9	4,3	4,3	4,4
			DP ₄ ⁺	0,8	0,2	0,2	0,1
15			DP ₁ -DP ₃	0,3	0,1	0,2	0,3
	65	2,8	Fructose	93,5	95,0	95,4	95,3
			Glucose	4,7	4,2	4,0	4,2
			DP ₄ ⁺	1,2	0,5	0,2	0,1
			DP ₁ -DP ₃	0,6	0,3	0,3	0,4

20 Det fremgår, at der opnås fuldstændig hydrolyse, fructose + "glucose"-indhold $\geq$ 99%, ved begge temperaturer under anvendelse af dette enzympræparat og denne dosering.

PATENTKRAV

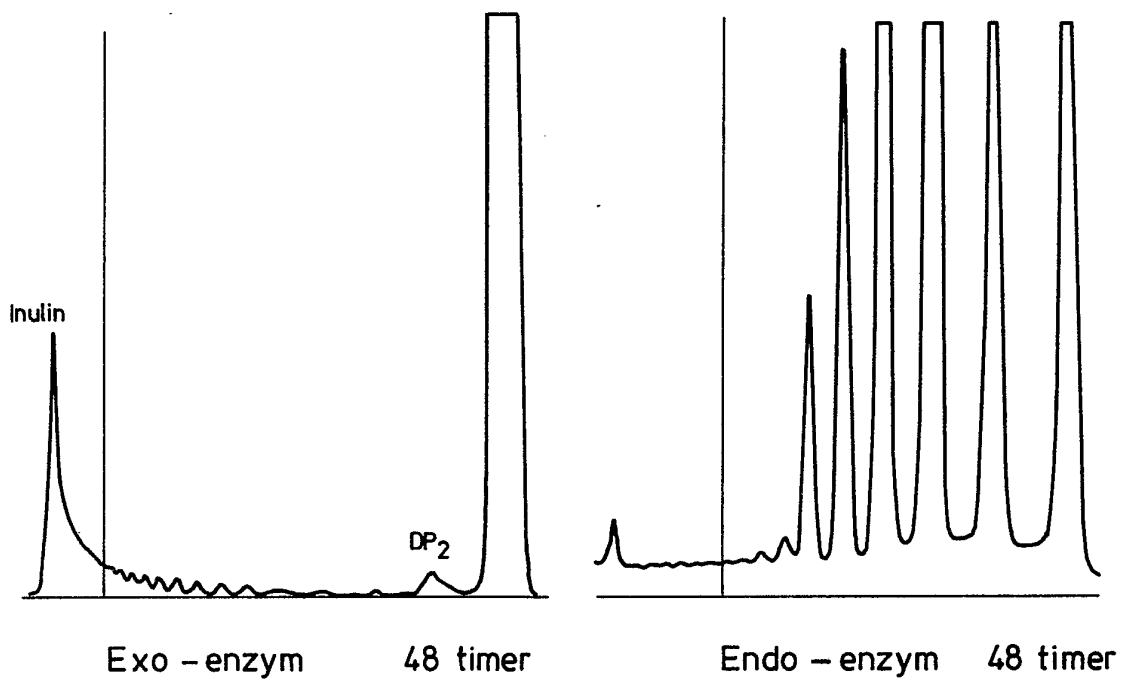
1. Fremgangsmåde til hydrolysering af inulin,
k e n d e t e g n e t ved, at en opløsning af inulin ved en
pH-værdi i området fra 3,5 til 7 og ved en temperatur i
5 området fra 60 til 65°C underkastes en enzymatisk fuldstæn-
dig hydrolyse i nærværelse af et mikrobielt inulinasepræpa-
rat, der har et forhold mellem endo-inulinase og exo-inuli-
nase i området fra 1:10 til 10:1 på vægtbasis, hvilket
inulinasepræparat stammer fra en *Aspergillus ficuum*-stamme.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at nævnte forhold ligger i området fra 7:1 til
1:7.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at nævnte forhold ligger i området fra 1:2 til
15 4:1.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g-
n e t ved, at inulinasepræparatet stammer fra en *Aspergil-*
lus ficuum-stamme ATCC 16882.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
20 n e t ved, at doseringen af inulinasepræparatet ligger
inden for området fra 0,25 til 10 Somogyi-enheder pr. g
inulin.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 2831/81 (PL § 2.2.3)

DP₁
Glucose + Fructose

147409



DP₁
Glucose + Fructose

