



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGNINGSSKRIFT

87577

C (12) Patentti julkistettu
Patent publicat 05 01 1988

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12C 9/02, C 12N 9/24

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	864897
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	01.12.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	01.12.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	04.06.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.10.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
03.12.85 EP 85202016 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Gist-Brocades S.A., Rue de Liege, 59121 Prouvy, France, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Ducroo, Paul, Rue Mermoz 6, 59133 Phalempin, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä parantuneen suodatettavuuden ja/tai alhaisemman viskositeetin omaavan vierteen ja oluen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av vört och öl med förbättrad filtrerbarhet och/eller lägre viskositet

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 24562 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB A 2150933 (C 12N 9/24),
Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, Symposium 1975-03-12-14, Aulanko, Finland, p. 351-373,
Carbohydrate Research, vol. 118, 1983, p. 215-231

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä vierteen ja oluen suodatettavuuden (ja siten myös saannon) parantamiseksi lisäämällä niihin Disporotrichum-kaylanaasia.

Uppfinningen avser ett förfarande för förbättring av filtrerbarheten (och således även utbytet) av vört och öl genom att tillsätta dessa Disporotrichum-xylanas.

Menetelmä parantuneen suodatettavuuden ja/tai alhaisemman viskositeetin omaavan vierteen ja oluen valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av vört och öl med förbättrad filtrerbarhet och/eller lägre viskositet

Tämä keksintö koskee parannuksia oluen valmistuksessa, erityisesti, muttei yksinomaan, pohjahiivalla fermentoidun oluen valmistuksessa. Aivan erityisesti se koskee menetelmää vierteen tai oluen suodatettavuuden ja siten niiden saannon lisäämiseksi ja oluen kolloidisen stabiilisuuden parantamiseksi kypsymisprosessin aikana.

Oluita valmistetaan jyvistä, joissa on luonnostaan vähän käymiskelpoisia sokereita. Jyvien tärkkelys täytyy sen vuoksi sokeroida (so. hydrolysoida käymiskelpoisiksi sokereiksi, maltoosiksi ja glukooksiksi) ennen fermentoimista hiivoilla. Ohra sisältää vähän tai ei yhtään amylaasia, mutta idättämisen aikana syntyy suuria määriä amylaasia. Sen vuoksi ohra kostutetaan, sen annetaan itää ja sitten se kuivataan ja säilytetään tulevaa käyttöä varten. Tällaista kuivattua, idätettyä ohraa kutsutaan maltaaksi. Euroopassa käytetään perinteisesti ohramallasta oluen valmistuksessa. Ohran tärkkelyksen sokeroimiseksi käytetään ohramaltaan itsensä sisältämiä tärkkelystä hydrolysoivia entsyymeitä (amylaaseja).

Siten ensimmäinen vaihe oluen valmistuksessa on mallastus. Sitten mallas jauhetaan ja suspendoidaan veteen, jotta tärkkelys edelleen hydrolysoituisi ja käymiskelpoiset sokerit uuttuisivat. Uutteen fermentoitavuuden parantamiseksi voidaan suspensioon lisätä useita tärkkelystä hajottavia entsyymeitä, esimerkiksi alfa-amylaasia, beta-amylaasia, amyloglukosidaasia ja sivuketjuja katkaisevia entsyymeitä kuten pullulanaasia. Kun sokeroituminen on saavuttanut halutun asteen, seos keitetään entsyymaattisten lisämuutosten lopettamiseksi ja sitten se suodatetaan. Suodokseen lisätään humalautetta, joka osittain aikaansaa oluen kitkerän flavorin, ja joka myös toimii säilöntäaineena bakteerikasvun estämiseksi. Humaloitu, suodatettu käymiskelpoisia sokereita si-

sältävä uute, jota kutsutaan vierteeksi, on tämän jälkeen valmis fermentointia varten.

Olutkäymisissä vierre ympätään aina voimakkaasti erityisillä hiivakannoilla, jotka ovat peräisin edellisestä käymisestä. Käyminen etenee alhaisissa lämpötiloissa 5-10 päivän ajan. Useimmat oluenvalmistuksessa käytetyt hiivakannat kuuluvat Saccharomyces carlsbergensis- ja Saccharomyces cerevisiae-lajeihin. Käymisen aikana käymiskelpoiset sokerit muuttuvat etanoliksi ja syntyy luonteenomaisia flavoriyhdisteitä.

Käymisen jälkeen suurin osa hiivasta poistetaan ja nuorolutta säilytetään varastotankeissa vaihtelevia aikoja, jotta se kypsyisi.

Mikäli panimossa käytetään huonolaatuista mallasta tai osa maltaasta korvataan ohralla tai vehnällä, on tarpeen lisätä vierteeseen beta-glukanaasia ja joskus alfa-amylaasia ja proteaasia vierteen viskositeetin vähentämiseksi ja keittosaannon lisäämiseksi. Beta-glukaanaasia voidaan myös lisätä olueen varastoinnin tai kylmäsäilytyksen aikana suodatettavuuden, oluen kirkkauden ja kolloidisen stabiilisuuden parantamiseksi, jolloin samalla vastaavasti suodatusapuaaineita ei tarvita niin paljoa. Beta-glukaanit koostuvat hyvin pitkistä 1,4-beta-D-glukopyranoosiketjuista (70 % sidoksista) ja 1,3-D-glukopyranoosiketjuista (30 % sidoksista). Niiden molekyyllipaino on n. 200 000. Beta-glukaanien liuokset ovat hyvin viskooseja, ja beta-glukaanit aiheuttavat sen vuoksi usein suodatusongelmia oluenpanossa. Nykyään Bacillus subtilis-, Aspergillus niger- ja Penicillium emersonii-organismeista peräisin olevia beta-glukaanaaseja on kaupallisesti saatavana beta-glukaanien aiheuttamien suodatusongelmien ratkaisemiseksi teollisuusmittakaavassa. Ohran ja vehnän kumiaineosassa on paitsi beta-glukaaneja myös joitakin pento-
saaneja. Pentosaanit tunnetaan huonommin kuin beta-glukaanit ja niiden rakenne on monimutkaisempi, koska niissä on pitkiä

1,4-beta-D-ksylopyranoosiketjuja ja yksittäisiä 1,2- tai 1,3-alfa-L-arabinofuranoosi-sivuketjuja (suhteessa 1 arabi-noosi kahta ksyloosiyksikköä kohti); katso liitteenä oleva kuvio 1, esittäneet H. Neukom, L. Providoli, H. Gremli ja P.O. Jui, Cereal Chem., 44, 238 (1967).

Pentosaanien ominaisuudet vaihtelevat riippuen peptidien, ferulihapon ja arabinogalaktaanin läsnäolosta tai poissaolosta. Noin 2/3 kokonaispentosaaneista on liukenemattomia suuren molekyyllipainonsa johdosta, ja koska ne ovat liittyneet proteiineihin ja muihin aineosiin. Niillä on erittäin suuri vedenpidätyskyky ja niistä saadaan hyvin kuohkeita (suuren tilavuuden omaavia) suodatusjäännöksiä. Kun liukoisten pentosaanien arabinofuranoosisivuketjut hydrolysoidaan, havaitaan substituomattomien ksylaanien yhteenkeräytyminen ja saostuminen.

Seuraavassa on esitetty eri viljakasvien keskimääräisiä pentosaanipitoisuuksia (ks. Handbuch der Lebensmittelchemie, vol. 5, s. 32, 1867, Springer Verlag):

Viljakasvin jyvä	Pentosaaneja (% kuivapainosta)
Ohra (kuoret mukaanlukien)	10,3
Vehnä	7,4
Ruis	10,6
Kaura (kuoret mukaanlukien)	7,5
Maissi	6,2
Riisi	2,0
Hirssi	2,0

GB-patenttijulkaisussa n:o 1,421,127 kuvataan menetelmä beta-1,4/beta-1,3-glukanaasiaktiivisuutta omaavan entsyymliuoksen valmistamiseksi Penicillium emersoniista, ja sitä suositellaan käytettäväksi oluen valmistuksessa vierteen suodatettavuuden parantamiseksi.

Coote ja Kirsop [J. Inst Brew., 82, 34 (1976)] esittävät, että tietynlaiset samentumat, joita esiintyy high gravity-oluessa, sisältävät 88 % pentosaaneja.

GB-patenttijulkaisussa n:o 2,150,933 kuvataan pentosanaasi, joka on saatu fermentoimalla Talaromyces (so. Penicillium) emersoniita. Tämän entsyymin esitetään kykenevän katalysoimaan ksylaanin hajoamista ja olevan käyttökelpoinen käymiskelpoisten sokerien tuoton ja uuttumisen parantamiseksi oluen valmistuksessa ja tietyn tyyppisten samentumien estämiseksi ja käsittelemiseksi.

Olemme nyt yllättäen havainneet, että endoksylanaasilla, jota tuottaa sieni Disporotrichum, on erityisen arvokkaita ominaisuuksia aineena, joka parantaa vierteen tai oluen saantoa ja suodatettavuutta.

Disporotrichum, ja erityisesti Disporotrichum dimorphosporum, on kuvattu artikkelissa J.A. Stalpers, Studies in Mycology, 24, 1 (1984).

Tämän keksinnön kohteena on siten menetelmä vierteen tai oluen valmistamiseksi, joilla on parantunut suodatettavuus ja/tai alhaisempi viskositeetti, jossa menetelmässä mainittu vierre tai olut saatetaan Disporotrichum-ksylanaasin vaikutukselle alttiiksi.

Mieluiten käytetään ksylanaasivalmistetta, joka on peräisin Disporotrichum dimorphosporumista. Hyvin tyydyttäviä tuloksia saadaan, kun käytetään ksylanaasivalmistetta, joka on peräisin Disporotrichum dimorphosporum kannasta ATCC 24562, joka on saatavissa American Type Culture Collection-talletuslaitoksesta, ja joka on identtinen kannan CBS 484.76 kanssa, joka kanta on saatavissa Centraal Bureau voor Schimmelcultures-talletuslaitoksesta (Baarn, Hollanti). Nämä kannat ovat edullisia tämän keksinnön tarkoituksiin.

Muita ksylanaasivalmisteita, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisesti, ovat sellaiset, joilla on olennaisesti samat tunnusmerkit kuin ksylanaasivalmisteella, jota saadaan Disporotrichum dimorphosporum kannasta ATCC 24562 (tai CBS 484.76). Tällaisia ovat myös valmisteet, jotka saadaan transformoidusta isäntä-mikro-organismista, joka sisältää geenin, joka koodittaa mainitun Disporotrichum kannan ATCC 24562 (tai CBS 484.76) tuottamaa ksylanaasia.

Tekniseltä kannalta katsottuna endo-tyyppinen entsyymi on yleensä suositeltavampi, koska se hydrolysoi suurimolekyyli-painoisia polysakkarideja hyvin nopeasti. Ekso-tyyppinen entsyymi vaatii enemmän aikaa ja suuremman entsyymikonsentraation saman teknisen tuloksen saavuttamiseksi.

Yleensä pentosanaasien tai ksylanaasien aktiivisuudet mitataan kaupallisilla substraateilla, joita saadaan lehtikuusen ksytaanista tai kaurankuoriksytaanista ja joiden rakenne on täysin erilainen kuin viljakasveista peräisin olevilla ksytaanisubstraateilla. Kun entsyymi on saanut vaikuttaa tarkoissa pH- ja lämpötilaolosuhteissa, entsyymiaktiivisuus arvioidaan määrittämällä pelkistävät sokerit. Tällä menetelmällä ei ole mahdollista saada selville onko entsyymi endo- vai ekso-tyyppiä vai niiden seos. Edelleen nykyiset kaupalliset substraatit ovat enemmän tai vähemmän puhdistuskäsittelyissä denaturoituneita.

Disporotrichum-ksylanaasikonsentraatti, joka on sopiva tämän keksinnön mukaiseen käyttöön, voidaan saada seuraavalla tavalla. Fermentointi suoritetaan steriilissä tankissa ja kasvualustassa tunnetulla tavalla. Kasvualusta sisältää selluloosaa, pektiiniä, hiivauutetta ja sopivia suoloja. Se ympäntään Disporotrichum dimorphosporum-puhdasviljelmällä. Fermentointi suoritetaan vakiolämpötilassa välillä 20°C - 37°C, mieluiten noin 32°C:ssa, ja pH pidetään välillä 3,0 - 6,0, mieluiten välillä 4,0 - 4,5. Fermentointi voi olla joko

panos- tai jatkuvatoiminen fermentointi. Ksylanaasiaktiivisuutta seurataan prosessin aikana. Entsyymien tuottoa ei tarvitse välttämättä indusoida lisäämällä ksylaaneja sisältäviä aineita (esim. maissintähkiä tai maissijauhoja), ja sellaisten aineiden lisääminen yleensä aiheuttaa eksoksylanaasin tuottoa, mikä on keksinnön kannalta vähemmän hyödyllistä. Kun tarvittava entsyymiaktiivisuus on saavutettu, massa kerätään ja konsentroidaan vakuuissa tai ultrasuodatuksella. Konsentraatti voidaan myydä joko nestepreparaattina tai spray-kuivattuna jauheena. Endoksylanaasi hydrolysoi pentoosaniketjujen 1,4-beta-ksyloosisidoksia.

Puhdistamattoman entsyymituotteen ominaisuuksia on tutkittu viskosimetrisesti substraatilla, joka sisältää $\pm 1\%$ ksylaaneja (katso liitteenä olevia kuvioita 2 ja 3). Optimi-pH on 4,7, mutta pH-välillä 3,0 - 6,0 on suhteellinen aktiivisuus yli 50%. Optimilämpötila on 55°C, mutta vielä 65°C:ssa yli puolet suhteellisesta aktiivisuudesta on jäljellä. Tämän Disporotrichum-ksylanaasin puhdistamista ovat tutkineet Comtat et al. [J. Comtat, K. Ruel, J.-P. Joseleau ja F. Barnoud, Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, SITRA, Helsinki, Suomi, 351 (1975); J. Comtat ja J.-P. Joseleau, Carbohydr. Res., 95 101 (1981)]:

Disporotrichum-ksylanaasia voidaan käyttää oluenpanoprosessissa muiden lisäaineiden, esim. tavallisten sameudenestoaineiden (chillproofing agents), esimerkiksi papaiinin, polyvinyylipyrrolidonin ja parkkihapon kanssa, ja useiden muiden entsyymien kanssa, joita on kuvattu mm. US-patenteissa n:o 3,061,439, 3,095,358, 3,749,582 ja 3,770,454 sekä kanadalaisessa patentissa n:o 743,524. On yllättävää, että ksylanaasi on tehokasta oluenpanossa, koska beta-glukaani-pentosaanisuhde ohran kumiaiaineosassa (barley gum) on 4:1, mutta tämä saattaa johtua pentosaanien suuremmasta vedenpidätyskyvystä.

Papaiinia, joka on kasviproteiini, käytetään laajalti parantamaan oluen kolloidista stabiliteettia proteiinihydrolyysin

avulla. Disporotrichum-ksylanaasin lisääminen papaiiniin varastotankissa saa aikaan täydentävän vaikutuksen kolloidissa stabiliteetissa ja parantaa oluen suodatettavuutta. Ksylanaasin lisääminen on erityisen edullista silloin kun mäsissä käytetään vehnää tai ohraa tai kun maltaan laatu on huono.

Disporotrichum-ksylanaasi näyttää soveltuvan käytettäväksi oluen valmistuksessa paremmin kuin muut ksylanaasit. Kun verrataan esimerkiksi Trichoderma- ja Disporotrichum-ksylanaasia, niiden tehokkuudessa viskositeettikokeissa on suuri ero, jolloin Disporotrichum-ksylanaasi on ylivoimainen.

Ksylanaasilla (pentosanaasilla), joka on kuvattu GB-patenttijulkaisussa n:o 2,150,933, esitetään olevan optimiaktiivisuus kauran kuoren ksylaania vastaan 87 ± 2 °C ja säilyttävän 50 % alkuperäisestä aktiivisuudestaan, kun sitä oli kuumennettu 95 °C:ssa kuusi minuuttia pH:ssa 5,0. Näin voimakasta lämpöstabiilisuutta ei toivota entsyymille, jota käytetään oluen valmistuksessa fermentointivaiheessa, koska se tarkoittaa sitä, että entsyymi ei olennaisesti denaturoidu oluen normaalin pastörintiprosessin aikana. Disporotrichum-ksylanaasi kuitenkin denaturoituu lähes täydellisesti näissä olosuhteissa.

Disporotrichum-ksylanaasia voidaan lisätä beta-glukanaasi-entsyymiliuoksiin niiden ominaisuuksien parantamiseksi.

Disporotrichum-ksylanaasin lisääminen aikaansaa parannetun vaikutuksen vierteen ja oluen viskositeettiin, uutepitoisuuteen ja suodatettavuuteen. Pienentämällä vierteen viskositeettia ja jäännösmäskin (spent grain) vedenpidätyskykyä Disporotrichum-ksylanaasi mahdollistaa panimon kapasiteetin lisäämisen tuottamalla vahvempia panimotuotteita.

Erityisesti kun panimossa käytetään vehnää tai ohraa (joissa pentosaanipitoisuus on suuri), Disporotrichum-ksylanaasia

voidaan käyttää ratkaisemaan vierteen ja oluen suodatettavuuteen liittyviä ongelmia.

Penicillium emersoniiista peräisin olevalla ksylanaasilla (GB-patenttijulkaisu n:o 2,150,933) on samantyyppistä viskositeettia vähentävää aktiivisuutta kuin Disporotrichum-ksylanaasilla on osoitettu olevan, mutta P. emersonii-ksylanaasin aktiivisuustaso on paljon alhaisempi (tavallisesti n. 10 - n. 40 % Disporotrichum-ksylanaasin aktiivisuudesta). Kuitenkin tästä alhaisemmasta aktiivisuudesta johtuen Disporotrichum-ksylanaasin lisääminen P. emersonii-entsyymiliuokseen parantaa tuotteen tehokkuutta. P. emersonii-ksylanaasi on lämpöstabiili (optimilämpötila 85-87 °C), mutta beta-glukaanit ja pentosaanit vapautuvat vierteeseen vain noin 65 °C:ssa, kun tärkkelys gelatinoituu. Tässä lämpötilassa Disporotrichum-ksylanaasi säilyttää yli 50 %:n jäännösaktiivisuuden, mikä on riittävä hydrolysoimaan loput pentosaanit, jotka vapautuvat tässä lämpötilassa. Lisäksi 85 °C:n lämpötilaa ei milloinkaan käytetä panimoprosessissa, jonka lämpötila ei koskaan nouse yli 76 °C:n.

Disporotrichum-ksylanaasin toiminta panimossa vaikuttaa oluen suodatettavuuteen, mutta kun Disporotrichum-ksylanaasia ei ole käytetty panimossa, on vielä mahdollista lisätä sitä varastotankkiin ilman beta-glukanaasia tai sen kanssa oluen suodatettavuuden parantamiseksi ja tästä seuraavien säästöjen saavuttamiseksi (esim. työ, suodattimet, häviöt jne.). Disporotrichum-ksylanaasia voidaan tietenkin käyttää sekä panimossa että varastotankissa. Näin valmistettu olut tarvitsee vähemmän painetta suodatuskierron aikana, on kirkkaampaa suodatuksen jälkeen, ja sillä on parantunut kolloidinen stabiilisuus. Näyttää vaikealta käyttää Penicillium emersonii-ksylanaasia varastotankissa, koska se ei inaktivoitu oluen normaalissa pastöroinnissa.

Disporotrichum-ksylanaasilla käsitellyn oluen kolloidinen stabiilisuus on tutkittu alkoholijäähdytyskokeella. Bacillus

subtilis-bakteerista peräisin olevan beta-glukanaasin lisäys ylimäärän kanssa papaiinia (annos, joka ylittää määrän, joka aikaansaa maksimivaikutuksen stabiilisuuteen) varastotankkiin ei muuta oluen kolloidista stabiilisuutta verrattuna pelkän papaiinin lisäämiseen. Kuitenkin jos Disporotrichum-ksylanaasia lisätään papaiinin ylimäärän kanssa, oluen minimi-sameusarvo vielä alittuu.

Disporotrichum-ksylanaasin edulliset ominaisuudet ovat myös hyödyllisiä valmistettaessa vaaleata olutta pintahiivan avulla.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä. Esimerkeissä endoksylanaasin aktiivisuusmäärittäminen, jota käytettiin, ellei toisin mainita, suoritettiin seuraavalla tavalla.

Endoksylanaasin aktiivisuuden määrittäminen

Analyttinen menetelmä on johdettu esimerkissä I esitetystä menetelmästä.

A. Periaate

Menetelmä perustuu entsyymin viskosimetrin aktiivisuuden mittaamiseen luonnollisella rukiin pentosaanisubstraatilla.

Spesifisen viskositeetin käänteisarvon ($1/\eta$) vaihtelu entsyymin vaikutusajan suhteen tekee mahdolliseksi määrittää näennäisen kinetiikkavakion, joka on verrannollinen entsyymipreparaatin spesifiseen aktiivisuuteen.

B. Välineet

- Vesihaude $42\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$
- Kapillaariviskosimetri, jonka virtausvakio on lähellä 0,03:a
- Ubbelohde-viskosimetri n° IC tai Prolabo-viskosimetri

tyyppiä UF

- kaksi sekuntikelloa
- suodatin
- pH-mittari
- sentrifuugi

C. Reagenssit

C1. Pentosaanisubstraatti

Tämä substraatti uutetaan ruisjauhoista (tyyppi 170, Ranskan lainsäädännön mukainen, "harmaajauholaatu").

Tämä ruisjauho valittiin, koska sillä on

- suuri viskoosisten pentosaanien konsentraatio (Drewsin menetelmän mukaisesti, ks. esimerkki I)
- alhainen luonnonpentosanaasiaktiivisuus

Valmistetaan liete, jossa on 300 g ruisjauhoja ja 1 litra tislattua vettä 42 °C:ssa, ja sitä sekoitetaan 30 minuuttia tässä lämpötilassa. pH säädetään arvoon 10,0 lisäämällä NaOH:a ja pidetään tässä arvossa 2 tunnin ajan tässä lämpötilassa. Tämän pH-käsittelyn tarkoituksena on inhiboida luonnollinen pentosanaasiaktiivisuus muuttamatta substraatin ominaisuuksia. Kun on pidetty 2 tuntia pH:ssa 10,0, pH säädetään arvoon 4,70 etikkahapolla. Liukenematon osa erotetaan sentrifugoimalla ja/tai suodattamalla. pH korjataan 4,70:aan mikäli tarpeen. Tätä substraattia säilytetään pakastettuna 100 ml:n erissä muovipulloissa.

C2. Entsyymiliuokset

Entsyymituote laimennetaan vedellä kunnes liuos sisältää 6-15 ksylanaasiyksikköä millilitraa kohti. Liukenemattomia aineita sisältävät liuokset suodatetaan ennen käyttöä.

D. Mittaus

Viskosimetriä tasapainotetaan 42 °C:n vesihauteessa vähintään 30 minuuttia ennen mittausta. Putki, joka sisältää täsmälleen 20 ml substraattia, pannaan hauteeseen ja odotetaan kunnes lämpötila on vakio. 2 ml entsyymiliuosta lisätään nollapisteessä, josta lähtien otetaan aikaa ensimmäisellä sekuntikellolla, sekoitetaan ja siirretään viskosimetriin tarvittava määrä. Seoksen viskositeetti mitataan kolmen minuutin kuluttua, sitten joka kolmas minuutti noin 15 minuutin ajan.

Liuos vedetään ylempään säiliöön ja liuoksen annetaan valua alas; heti kun nesteen pinta saavuttaa ylemmän merkin, käynnistetään toinen sekuntikello ja luetaan samalla hetkelä ensimmäisen sekuntikellon lukema T.

Heti kun nesteen pinta saavuttaa alemman merkin, toinen sekuntikello pysäytetään ja merkitään muistiin aika Δt sekunneissa, mikä osoittaa ajan, jonka kuluessa neste valuu kappilariputken läpi. Toinen sekuntikello käynnistetään uudelleen ja Δt -määritys toistetaan eri T:n arvoilla, kuten edellä esitettiin.

Kustakin määrityssarjasta määritetään minimiviskositeetti, joka vastaa entsyymaattisen reaktion loppua, antamalla substraatin ja entsyymiliimäärän reagoida substraatin kanssa koeolosuhteissa (Δt_m).

Edelleen määritetään Δt_0 , joka vastaa 20 ml:n substraattia ja 2 ml:n vettä viskositeettia. Tämän arvon stabiilisuus tarkistetaan kunkin analyysin kuluessa.

Sama analyysi suoritetaan standardientsyymipreparaatilla.

E. LaskeminenE1. K-vakioiden määrittäminen

Kullekin määrittäykselle ja standardille lasketaan kunkin mitauksen aika (t) sekunneissa

$$t = T + \frac{\Delta t}{2}$$

$$\text{kullekin } t\text{:lle lasketaan suhde } I/nS = \frac{\Delta t_0 - \Delta t_m}{\Delta t - \Delta t_m}$$

Koordinaatistoon merkitään peräkkäiset t:n arvot vastaan vastaavat I/nS:n arvot. Piirretään käyrä, jonka pitäisi olla suora viiva, ja määritetään tämän viivan kulmakerroin K (sekuntia⁻¹), joka otetaan näennäiseksi kineettiseksi vakioksi.

E2. Aktiivisuuden laskeminen

Ksylanasaasistandardille saadaan

- vertailuaktiivisuus A_s (ksylanasaasiyksikköä/g)
- määritetyn liuoksen entsyymikonsentraatio C_s (g/l)
- näennäinen kineettinen vakio K_s

Tuntemattomalle mitattavalle ksylanasaasille saadaan

- määritetyn liuoksen entsyymikonsentraatio C_e (g/l)
- näennäinen kineettinen vakio K_e

Lasketaan tuntematon aktiivisuus verrattuna standardiin:

$$\text{aktiivisuus} = A_s \times \frac{C_s}{C_e} \times \frac{K_e}{K_s} = \text{ksylanasaasiyksikköä/g tai ml.}$$

Esimerkki I

Disporotrichum dimorphosporum-, Trichoderma- ja Aspergillus niger-peräisten ksylanaasien endoksykanaasiaktiivisuuden vertailu Drewsin menetelmällä

Endoksykanaasiaktiivisuus määritettiin Drewsin ja Weipertin esittämällä menetelmällä [Die Müllerei, 15, 369 (1970)]. Tällä tavoin määritetty aktiivisuus näytti olevan hyvin sopu-
soinnussa ksylanaasin teknologisten vaikutusten kanssa oluenpanossa.

Valmistettiin dispersio, jossa oli 150 g harmaita ruisjauhoja (tyyppi 170) 350 ml:ssa vesijohtovettä, 42 °C:ssa. Liete pantiin Brabender-viskosigrafin maljaan, lämpötila pidettiin 42 °C:ssa. Viskositeetin stabiloitumisen jälkeen viskosigrafiin pantiin entsyymiliuos, joka sisälsi 60 ksylanaasiyksikköä, mitattuna pelkistävien sokereiden avulla suoritettulla määrityksellä. Kun entsyymaattinen hydrolyysi oli tapahtunut 10, 20 ja 30 minuuttia, viskositeetin alenemisen prosentuaalinen määrä mitattiin.

42 °C:ssa tärkkelys ei gelatinoitunut eikä alfa-amylaasilla ollut mitään vaikutusta. Osoitettiin myös, että amylaaseilla, proteaaseilla ja beta-glukanaaseilla ei ollut merkittävää vaikutusta.

Viskoosina substraattina on mahdollista käyttää nestemäistä fraktiota, joka saadaan, kun ruisjauhodispersio sentrifugoidaan. Brabender-viskosigrafin sijasta voidaan silloin käyttää Ostwald-tyyppistä viskosimetriä. Nämä kaksi menetelmää antavat samanlaiset tulokset (vrt. menetelmä, joka on kuvattu sivulta 10 alkaen).

Kuviot 4, 5 ja 6 esittävät Aspergillus-, Disporotrichum- ja Trichoderma-ksylanaasien vaikutuksen samaan aktiivisuusyk-

sikkömäärään, mitattuna pelkistävien sokerien avulla suoritettulla määrityksellä (tavanomainen menetelmä).

Kuvio 4 osoittaa, että Aspergillus-ksylanaasilla ei ollut mitään vaikutusta pentosaaniviskositeettiin, joka pysyy stabiilina ajan funktiona. Tämä tuote sisältää ainoastaan ekso-ksylanaasia.

Kuvio 5 osoittaa Disporotrichum-ksylanaasin vaikutuksen, jolle on tyypillistä jatkuva viskositeetin aleneminen ajan funktiona. Tämä käyrä on tyypillinen endoksylanaasiaktiivisuudelle.

Kuvio 6 osoittaa Trichoderma-ksylanaasin vaikutuksen: nopea viskositeetin aleneminen ensimmäisen 1-2 minuutin aikana, jonka jälkeen viskositeetti pysyy stabiilina loppuajan. Tämä käyrä on ominainen tällä entsyymillä esiintyvälle steerisen esteen aiheuttamalle inhibiovaikutukselle.

Talaromyces emersonii-ksylanaasilla on samanlainen tyypillinen käyrä kuin Disporotrichum-ksylanaasilla, mutta ksylanaasiaktiivisuuden taso on dramaattisesti alhaisempi Talaromyces-entsyymien kaupallisilla tuotteilla (50-150 endoksylanaasiyksikköä/ml lisättynä Glaxon kaupalliseen beta-glukanaasiin).

Esimerkki II

Disporotrichum- ja Trichoderma-peräisten ksylanaasien ksylanaasiaktiivisuuksien vertailu eri substraateilla ja eri menetelmillä

ANALYYTTISET MENETELMÄT	AKTIIVISUUSSUHDE <u>Trichoderma</u> -ksylanaasi/ <u>Disporotrichum</u> -ksylanaasi
Reduktimetrinen aktiivisuus maissintähkän ksylaaneihin	21,8
Viskosimetrinen menetelmä Brabender-viskosigrafilla (Drews) - täydellinen ruis- substraatti, ks. Esim. I	noin 6
Viskosimetrinen menetelmä Ostwald-viskosimetrillä - liukoinen ruissubstraatti, ks. menetelmä s. 10	noin 9
Viskosimetrinen menetelmä Ostwald-viskosimetrillä - alkoholisaostuksella puhdistettu ruissubstraatti	3,4 - 15
Viskosimetrinen menetelmä Ostwald-viskosimetrillä - etukäteen 20 min. 90 °C:ssa kuumennettu liukoinen ruissubstraatti	31,5

Ensimmäinen analyysi suoritettiin maissintähkän ksylaaneilla monosakkaridimäärityksenä reduktimetrisesti. Tässä tapauksessa mitattiin sekä ekso- että endoksylanaasiaktiivisuudet. Trichoderma-ksylanaasien aktiivisuutta on vaikea arvioida käyttäen Brabender- tai Ostwald-viskosimetriä, koska tulokset olivat suuresti riippuvaisia käytetystä entsyymikonsentraatiosta. Tämä viittaa inhibitiovaikutukseen.

Etanolilla saostettujen ruiskusyloaanien käyttö puhdistettuna substraattina ei muuttanut tuloksia. Lisäksi osoitettiin myös, että useiden proteaasien vaikutus ei muuttanut liukoista substraattia eikä myöskään inhibitiovaikutusta Trichoderma-ksylanaasiin. Liukoisen substraatin kuumentaminen kuitenkin edisti 65 % proteiineja ja 35 % hiilihydraatteja, pääasiassa ksyloosia, arabinoosia ja glukoosia sisältävän liukenemattoman aineksen saostumista. Tällä kuumennetulla liukoisella substraatilla saavutettiin Disporotrichum-ksylanaasin aktiivisuuden paraneminen viisinkertaiseksi ja Trichoderma-ksylanaasin 20-kertaiseksi. Siten inhibitiovaikutus on tärkeämpi jälkimmäisellä ksylanaasilla.

Esimerkki III

Ksylanaasien vaikutus vierteeseen laboratoriomittakaavassa

Olosuhteet

Käytetään huonolaatuista mallasta, so. mallasta, jolla saadaan matala uutepitoisuus ja huono suodatettavuus panimoteollisuudessa, koska siinä on paljon ei-hajonneita beta-glukaaneita ja hemiselluloosia.

Mallas jauhetaan EBC MIAG-myllyllä "lauter tun"-suodatuksen standardivaatimusten mukaisesti.

Standardi panimoprosessi:

Yksi osa mallasta kostutetaan kolmella osalla vettä 50 °C:ssa (huomioitava kunkin kokeen lähtöpaino). Tätä lämpötilaa ylläpidetään 20 minuutin ajan.

Kuumennetaan 63 °C:seen 1 °C/min. Tätä lämpötilaa ylläpidetään 30 minuutin ajan.

Kuumennetaan 72 °C:seen 1 °C/min. Tätä lämpötilaa ylläpidetään 20 minuutin ajan täydellisen sokeroitumisen saavuttamiseksi (keltainen väri jodikokeessa).

Kuumennetaan 76 °C:seen. Tätä lämpötilaa ylläpidetään 5 minuuttia.

Kunkin kokeen paino tarkistetaan ja lisätään vettä lähtöpainon saavuttamiseksi (veden haihtuminen). Mäski kaadetaan suodatusta varten suppiloon, jossa on Schleicher-Schüllin suodatinpaperi (EBC). Suodatetun vierteen tilavuus ajan funktiona mitataan. Tämän arvon avulla voidaan laskea uute-pitoisuus ja saanto.

Vierteen viskositeetti mitataan kapillaariviskosimetrillä 20 °C:ssa. Suurimolekyyllipainoiset beta-glukaanit määritetään 30 %:isella ammoniumsulfaatilla saostamisen jälkeen. Sakka pestään alkoholilla ennen happohydrolyysiä ja glukoosimäärittystä orsinolireagenssilla.

Jäljempänä olevissa taulukoissa esitetty ksylanaasiaktiivisuus on mitattu viskosimetrisellä menetelmällä, joka on kuvattu alkaen sivulta 10.

a) Disporotrichum- ja Trichoderma-ksylanaasien vertailu

Tulokset on esitetty taulukossa 1. Nämä kokeet osoittavat selvästi Disporotrichum-ksylanaasin paremman tehokkuuden verrattuna Trichoderma-ksylanaasiin. Katso myös selitykset esimerkeissä I ja II.

Taulukko 1

Vierteen analysointi	<u>Disporotrichum</u> -ksylanaasi		<u>Trichoderma</u> -ksylanaasi		
	100 yks./ kg mallas- ta	300 yks./ kg mallasta	125 yks./ kg mallas- ta	250 yks./ kg mallas- ta	375 yks./ kg mallas- ta
suodatettu tila- vuus (ml)	2 min	45	30	31	31
	4 min	69	45	48	47
	6 min	88	56	60	58
	8 min	103	66	69	68
	10 min jälkeen	116	73	77	74
ominais- paino	1.0798	1.0806	1.0798	1.0796	1.0796
viskositeetti (mPa/s)	2.57	2.51	2.82	2.78	2.75

b) Vierteen suodatettavuutta lisäävien erilaisten beta-glukanaasia sisältävien kaupallisten tuotteiden vertailu, Disporotrichum-ksylanaaseja joko lisätty tai ei

Kolmen kaupallisen, beta-glukanaasia sisältävän tuotteen vaikutusta vierteen suodatettavuuteen verrattiin sellaisen preparaatin vaikutukseen, jossa oli yhtä näistä ja lisäksi Disporotrichum-ksylanaasia. Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Nämä kokeet vahvistavat Disporotrichum-ksylanaasin paremman vaikutuksen vierteen viskositeettiin, uutepitoisuuteen ja suodatettavuuteen. Glaxon beta-glukanaasivalmisteella saadut suhteellisen hyvät tulokset johtuvat siinä olevasta ksylanaasiaktiivisuudesta (165 u/g).

Taulukko 2

Vierteen analyysointi	ei entsyymikontrollia	0.1 % beta-glukanaasia (<u>Penicillium emersonii</u> , Glaxo)	0.1 % beta-glukanaasia Grindazym (<u>Aspergillus niger</u> , Grindstedt)	0.1 % beta-glukanaasia filtraasi/AM (<u>Bacillus subtilis</u> , Gist-Brocades)	0.1 % beta-glukanaasia filtraasi/AM + 600 u/g <u>Disporotrichum</u> -ksylanaasia
suodatettu tilavuus (ml)					
2 min	18	25	22	22	39
4 min	25	47	36	37	82
6 min	29	58	47	50	107
8 min	34	69	54	60	126
10 min jälkeen	39	77	62	69	146
uutepitoisuus g/100 g	20.46	20.64	20.64	20.73	20.79
viskositeetti (mPa/s)	3.58	2.88	3.33	3.20	2.73

c) Erilaisten vierteen suodatettavuutta parantavien valmisteiden välinen vertailu: Bacillus subtilis-beta-glukanaasin ja Disporotrichum-ksylanaasin seos, Penicillium emersonii-beta-glukanaasi ja Penicillium emersonii-beta-glukanaasin ja Disporotrichum-ksylanaasin seos

1) Vierteessä on 100 % Menuet 81-mallasta Stella Artois-panimosta. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

2) Vierteessä on 100 % mallasta "Enfants de Gayant"-panimosta. Tulokset on esitetty taulukossa 4.

Yhdistelmillä Penicillium emersonii-beta-glukanaasi + Disporotrichum-ksylanaasi ja Bacillus subtilis-beta-glukanaasi + Disporotrichum-ksylanaasi saadaan suunnilleen samanlaiset tulokset.

3) Vierteessä on 60 % Menuet 81-mallasta (Stella Artois-panimo) + 40 % Menuet 82-ohraa. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Jos taulukon 5 tuloksia verrataan taulukoiden 3 ja 4 tuloksiin, käy selvästi ilmi, että maskissä käytetystä ohraa johtuva suurempi viskositeetti pienenee kaikkein tehokkaimmin, kun käytetään Disporotrichum-ksylanaasia.

Taulukko 3

	ei entsyy- mikontrol- lia	Seos 300 u/g + 400 u/g <u>B. subtilis</u> - <u>Disporotri-</u> <u>β-glukanaasi</u> <u>chum</u> - ksylanaasi	<u>Penicillium</u> <u>emersonii</u> <u>β-glukanaasi</u> (Glaxo)	<u>P. emersonii</u> <u>β-glukanaasi</u> + 150 u/g <u>Disporotrichum</u> ksylanaasi
		0.05%	0.1%	0.1%
suodatettu tila- vuus (ml)				
2 min	22	60	62	62
4 min	50	84	94	92
6 min	63	112	102	118
8 min	75	134	138	142
10 min jälkeen	82	152	156	162
ominaispaino (20°C/20°C)	1.0827	1.0832	1.0831	1.0838
Uute (g/100 g)	19.95	20.05	20.03	20.18
saanto/k.a.(%)	82.66	83.18	83.07	83.84
viskositeet-(mPa/s)	3.14	2.66	2.77	2.63
β -glukaaneit-(mg/l)	1 105	260	660	280

Taulukko 4

	ei entsyy- mikontrol- lia	Seos 300 u/g + 400 u/g <u>B. subtilis</u> <u>Disporotri-</u> <u>β-glukanaasi</u> <u>chum</u> -ksylanaa- si	<u>Penicillium</u> <u>emersonii</u> <u>β-glukanaasi</u> (Glaxo)	<u>P. emersonii</u> <u>β-glukanaasi</u> + 150 u/g <u>Disporo-</u> <u>trichum</u> -ksylanaasi
		0.05%	0.1%	0.1%
suodatettu tila- vuus (ml)				
2 min	32	68	54	78
4 min	50	100	78	118
6 min	63	132	104	158
8 min	74	154	122	182
10 min jälkeen	83	172	138	196
ominaispaino (20°C/20°C)	1.0825	1.0834	1.0828	1.0840
Uutepi- toisuus (g/100 g)	19.89	20.10	19.96	20.23
saanto/sek. (%)	80.46	81.52	80.81	82.18
viskosi- teetti (mPa/s)	3.20	2.69	2.73	2.66
β -glukaaneita(mg/l)	2 500	340	1 540	940

Taulukko 5

	ei entsyy- mikontrol- lia	Seos 300 u/g + 400 u/g <u>B. subtilis</u> <u>Disporotri-</u> <u>β-glukanaasi</u> <u>chum-ksyla-</u> <u>naasi</u>	Penicillium <u>emersonii</u> <u>β-glukanaasi</u> (Glaxo)	<u>P. emersonii</u> <u>β-glukanaasi</u> + 150 u/g <u>Disporo-</u> <u>trichum-ksylanaa-</u> <u>si</u>
		0.05% 0.1%	0.1%	0.1%
suodatettu tila- vuus (ml)				
2 min	31	78	80	90
4 min	48	118	120	140
6 min	57	150	150	172
8 min	66	176	168	198
10 min	70	196	176	208
ominaispaino (20°C/20°C)	1.0760	1.0797 1.0806	1.0780	1.0805
uutepi- toisuus (g/100 g)	18.42	19.26 19.47	18.98	19.44
saanto/sek (%)	78.06	81.36 82.46	79.89	82.30
viskosi- teetti (mPa/s)	3.37	2.67 2.55	2.69	2.58
β -glukaane- ta (mg/l)	3 910	840 659	2 800	1 890

Esimerkki IVOluen kolloidisen stabiilisuuden parantaminen
Disporotrichum-ksylanaasilla

Suodatetun, käsittelemättömän oluen kolloidinen stabiilisuus määritettiin laboratoriomittakaavassa samoissa olosuhteissa käyttäen alkoholijäähdytyskoetta, jonka ovat esittäneet M. Moll, V. That, A. Smith ja M. Parisot, J. Amer. Soc. Brew. Chem., 34, 187 (1976): tietty määrä taulukossa 6 spesifioitua entsyymiä pantiin pienessä tilavuudessa pulloihin. Entsyymiliuos kiinteytettiin, jotta vältettäisiin laimentuminen olutta lisättäessä. Pullot suljettiin heti oluen lisäämisen jälkeen hapettumisen estämiseksi. Pulloja varastoitiin viikon ajan huoneenlämmössä ja entsyymikäsittelyn tehokkuus alkoholijäähdytyskokeessa mitattiin. Mitä alhaisempi EBC-sameusarvo, sitä tehokkaampi entsyymituote. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa 6.

Taulukko 6

Papaiini- konsentraatio NF-yks./Hl	Sameusarvo (sameusmittari) E.B.C.-yksikköä			
	pelkkä. papaiini	papaiini + 1500 u/Hl <u>B.subtilis</u> β -gluka- naasi	papaiini + 1200 u/Hl <u>Disporo-</u> <u>trichum</u> ksylanaasi	papaiini + 3000 u/Hl <u>Disporo-</u> <u>trichum</u> ksylanaasi
6100	10,5	10,4	9,8	7,8
9200	3,6	3,7	3,9	2,3
12200	2,1	3,1	0,6	0,8
18400	1,9	2,5	0,4	0,6

(u = units = yksikköä)

Pienin sameusarvo, joka saatiin ylimääräannoksella papaiinia, pieneni vielä, kun Disporotrichum-ksylanaasia käytettiin papaiinin lisäksi.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä parantuneen suodatettavuuden ja/tai alhaisemman viskositeetin omaavan vierteen ja oluen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu vierre tai olut saate-
taan alttiiksi Disporotrichum dimorphosporum -ksylanaasin vaikutukselle.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu ksylanaasi on peräisin Disporotrichum dimorphosporum ATCC 24562:sta.

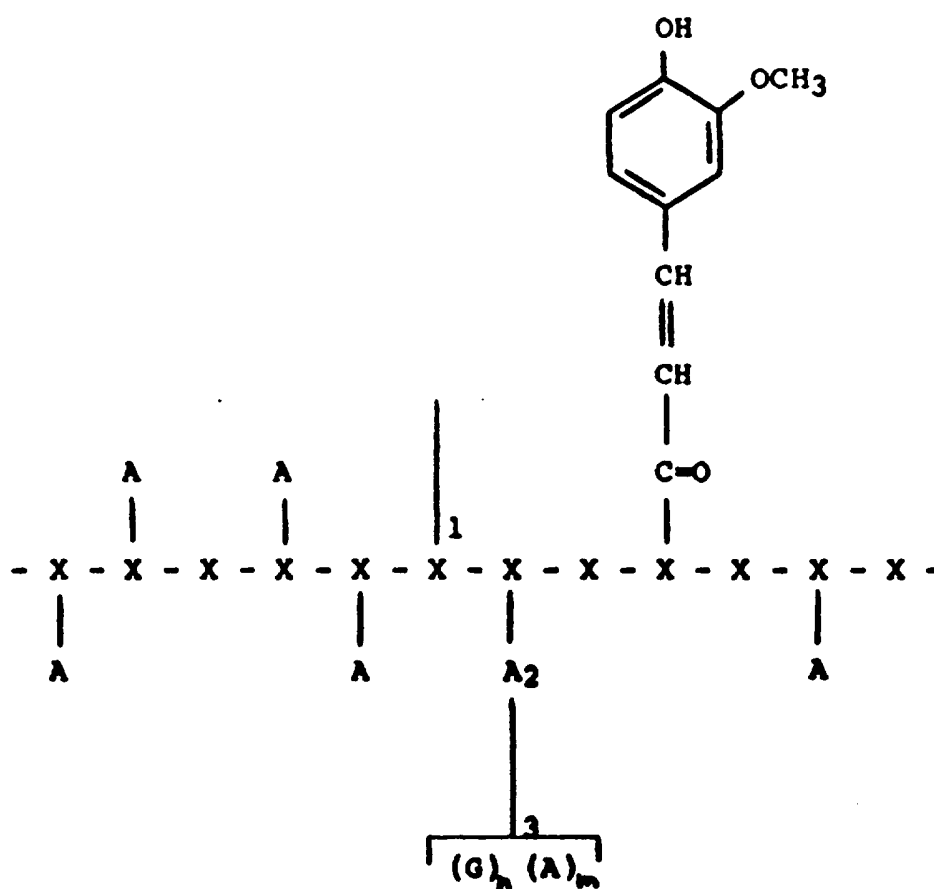
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitulla ksylanaasilla on olennaisesti samantyyppiset ominaisuudet kuin ksylanaasilla, jota saadaan Disporotrichum dimorphosporum ATCC 24562:sta.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vierteeseen tai olueen lisätään myös papaiinia.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mallastamatonta vehnää tai ohraa käytetään vierteen tai oluen valmistuksessa.

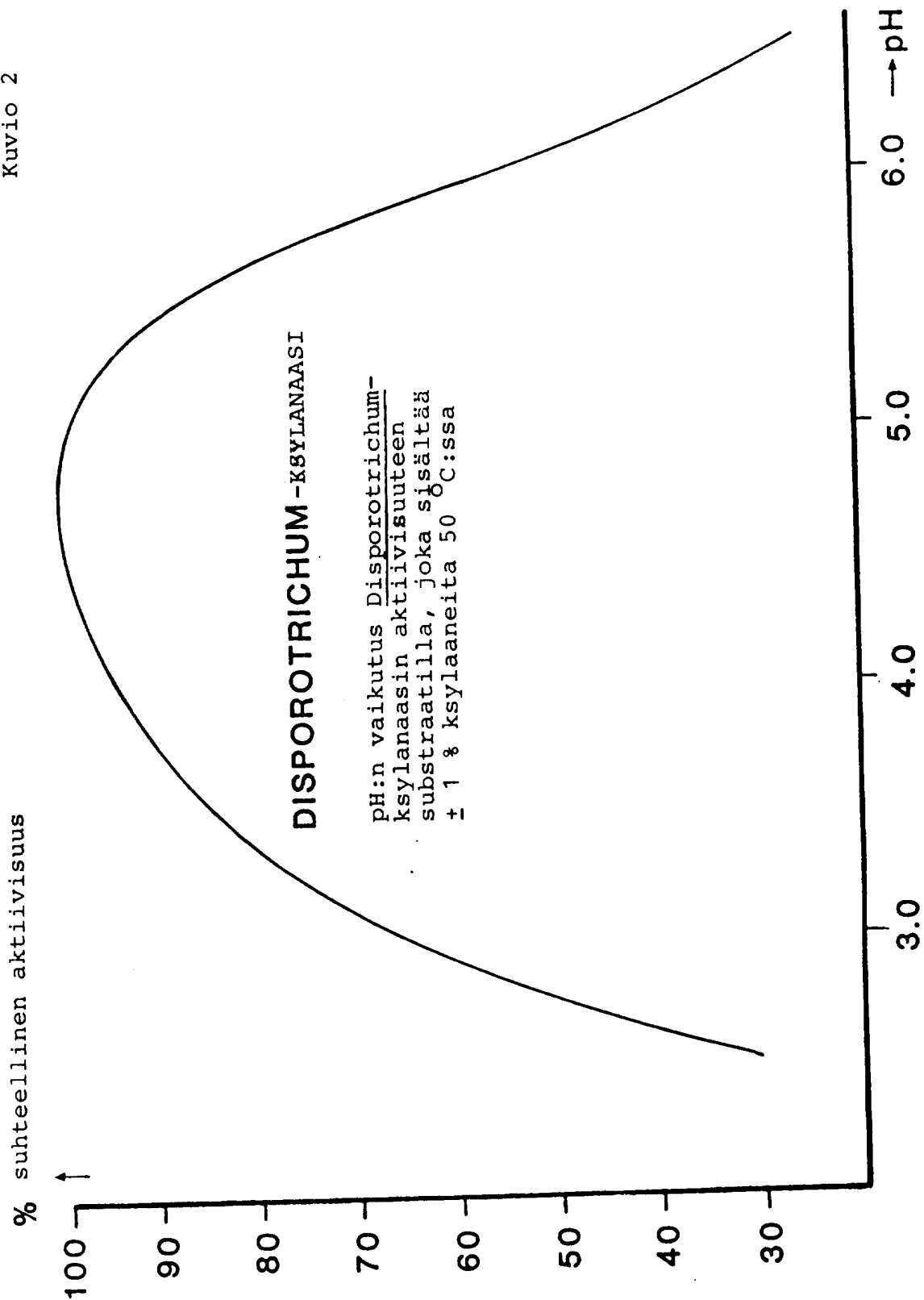
Patentkrav:

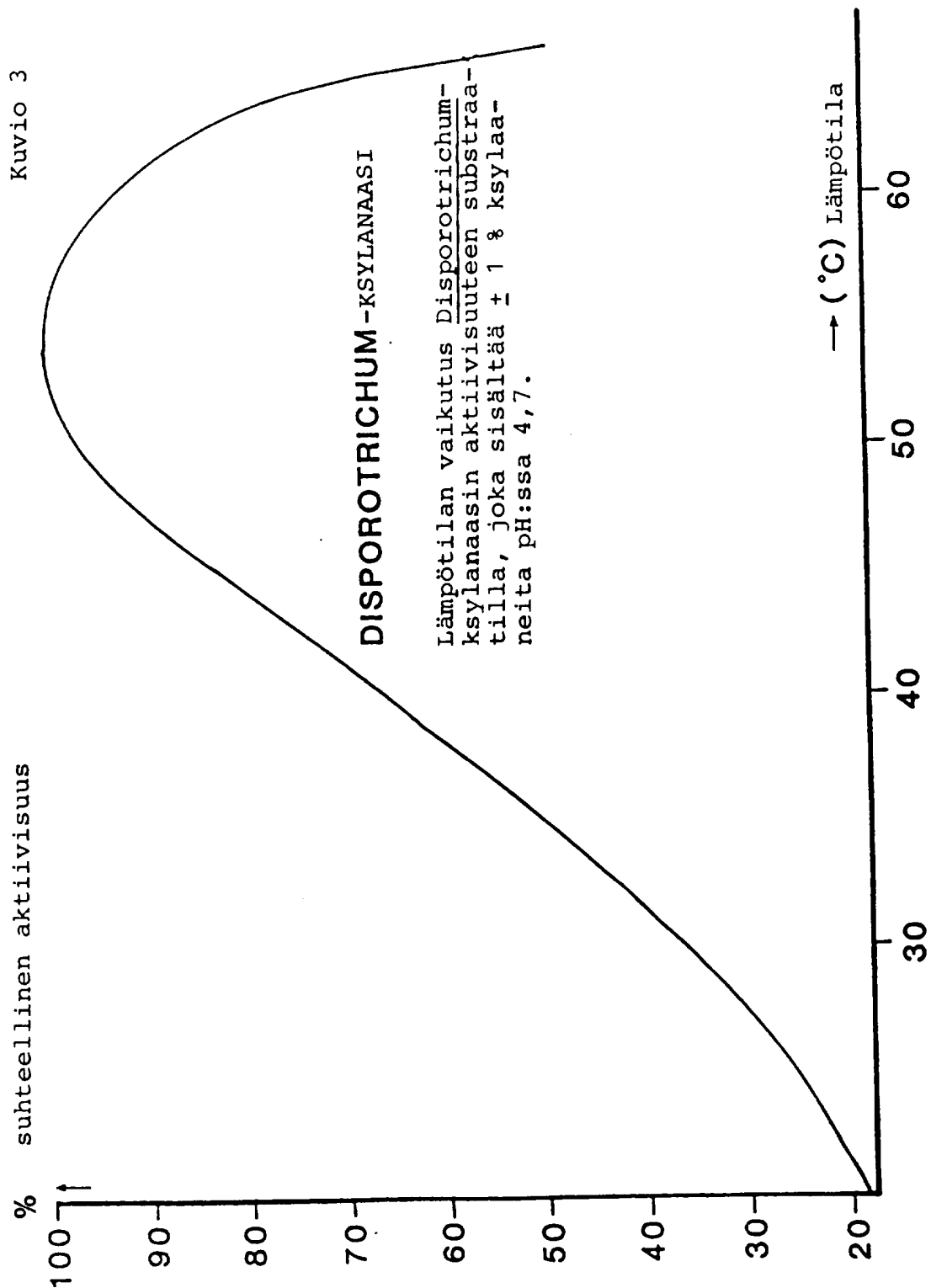
1. Förfarande för framställning av vört och öl med förbättrad filtrerbarhet och/eller lägre viskositet, k ä n n e t e c k n a t därav, att den nämnda vörten eller det nämnda ölet utsättes för inverkan av Disporotrichum dimorphosporum -xylanase.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det nämnda xylanaset härstammar från Disporotrichum dimorphosporum ATCC 24562.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det nämnda xylanaset har väsentligen samma egenskaper som xylanase, som erhållits från Disporotrichum dimorphosporum ATCC 24562.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att vörten eller ölet tillsätts även papain.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att för framställning av vörten eller ölet används omältat vete eller korn.

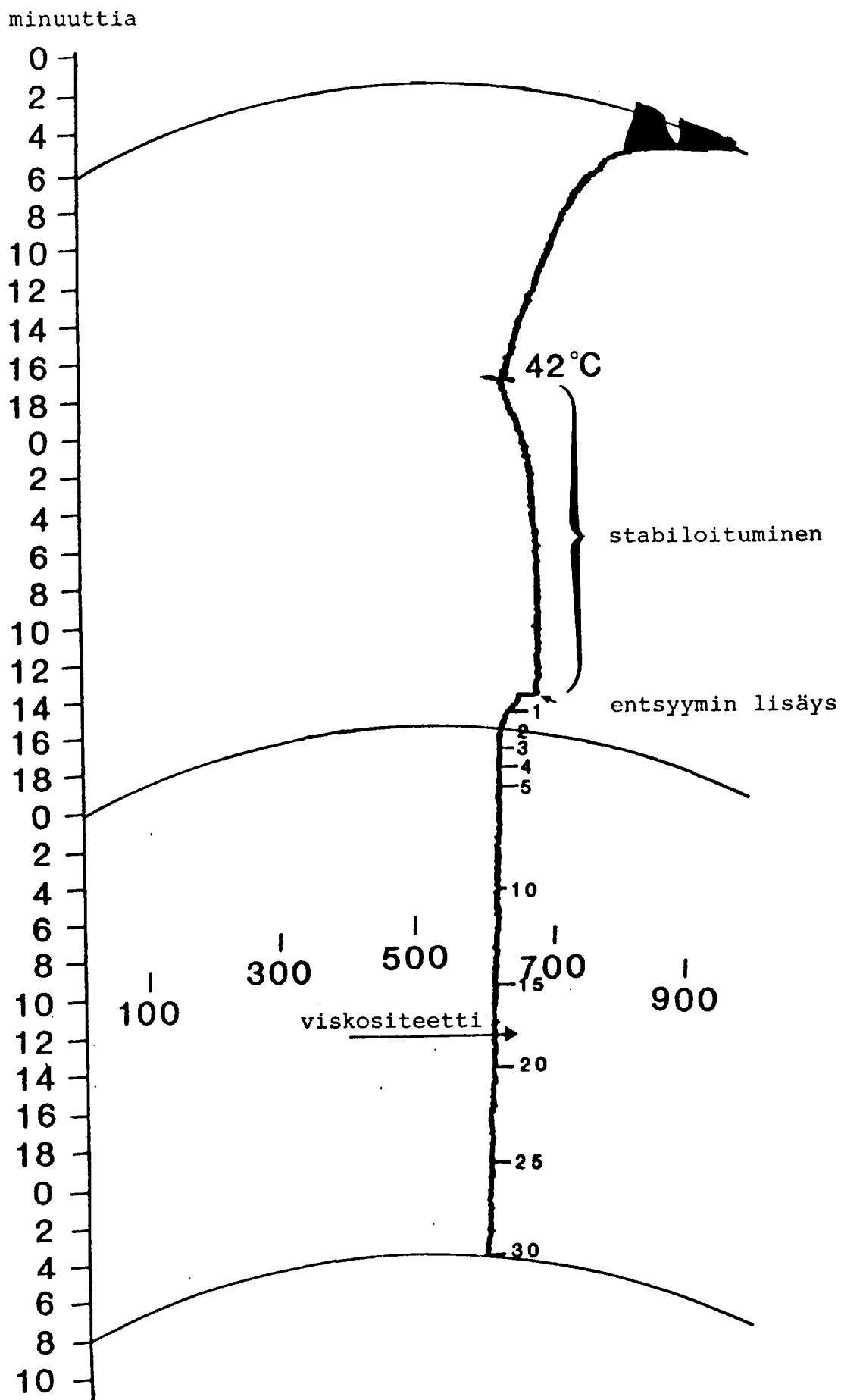


Vehnäjauhoista peräisin olevan "glykoproteiini 2:n" hypoteettinen rakenne, ehdottanut H. Neukom et al., *Cereal Chem.* **44**, 238 (1967). Pystysuora viiva numeron 1 vieressä tarkoittaa polypeptidiketjua; X = beta-D-ksylopyranoosiyksiköitä; A = alfa-L-arabinofuranoosiyksiköitä; G = galaktoosiyksiköitä; 1, 2, 3 = mahdollisia sidoksia hiilihydraattien ja proteiinin välillä. 3-asemassa olevan sidoksen osoitettiin myöhemmin esiintyvän galaktoosin ja hydroksiproliinin välillä, G.B. Fincher, W.H. Sawyer ja B.A. Stone, *Biochem J.*, **139**, 535 (1974).

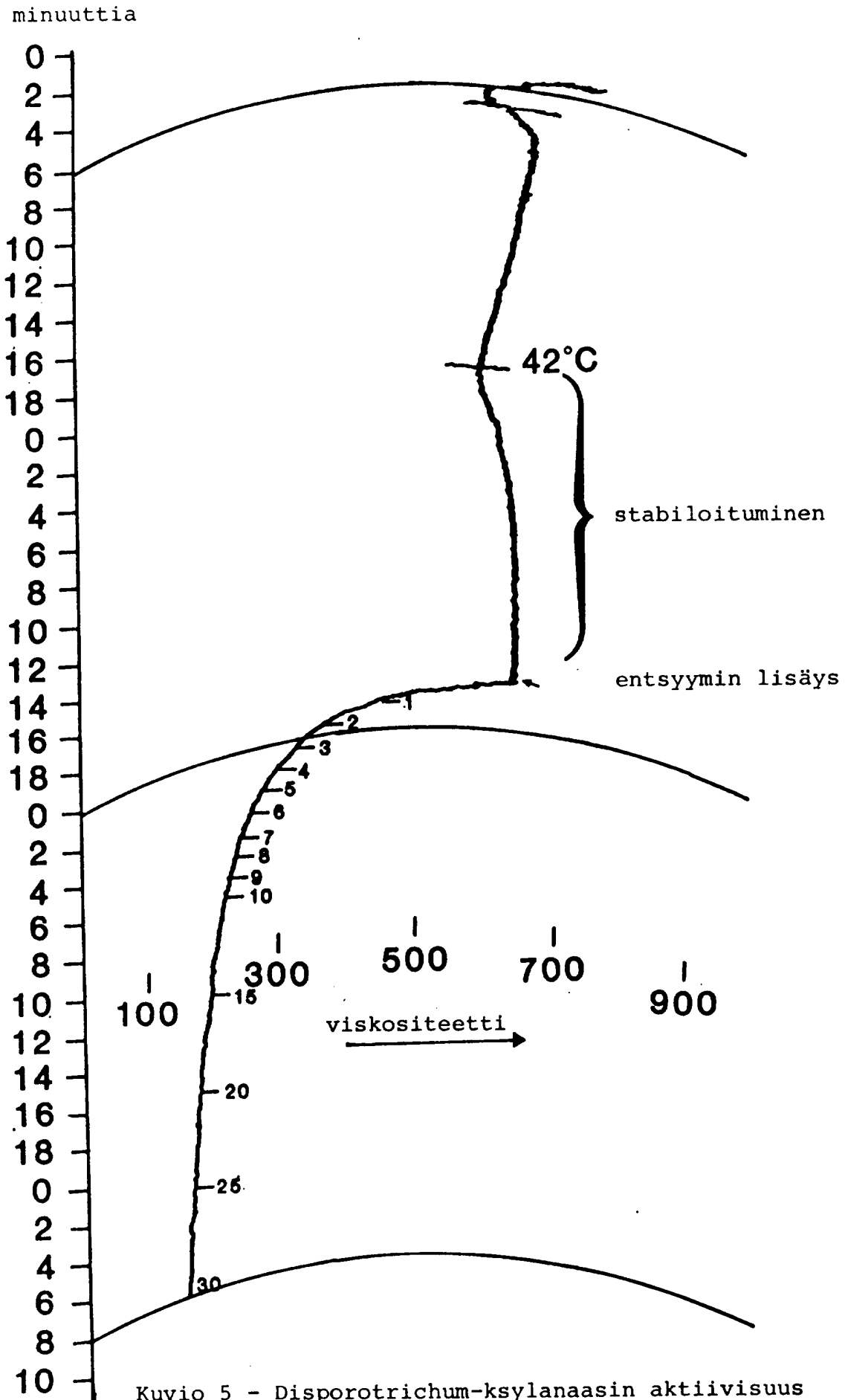
Kuvio 2



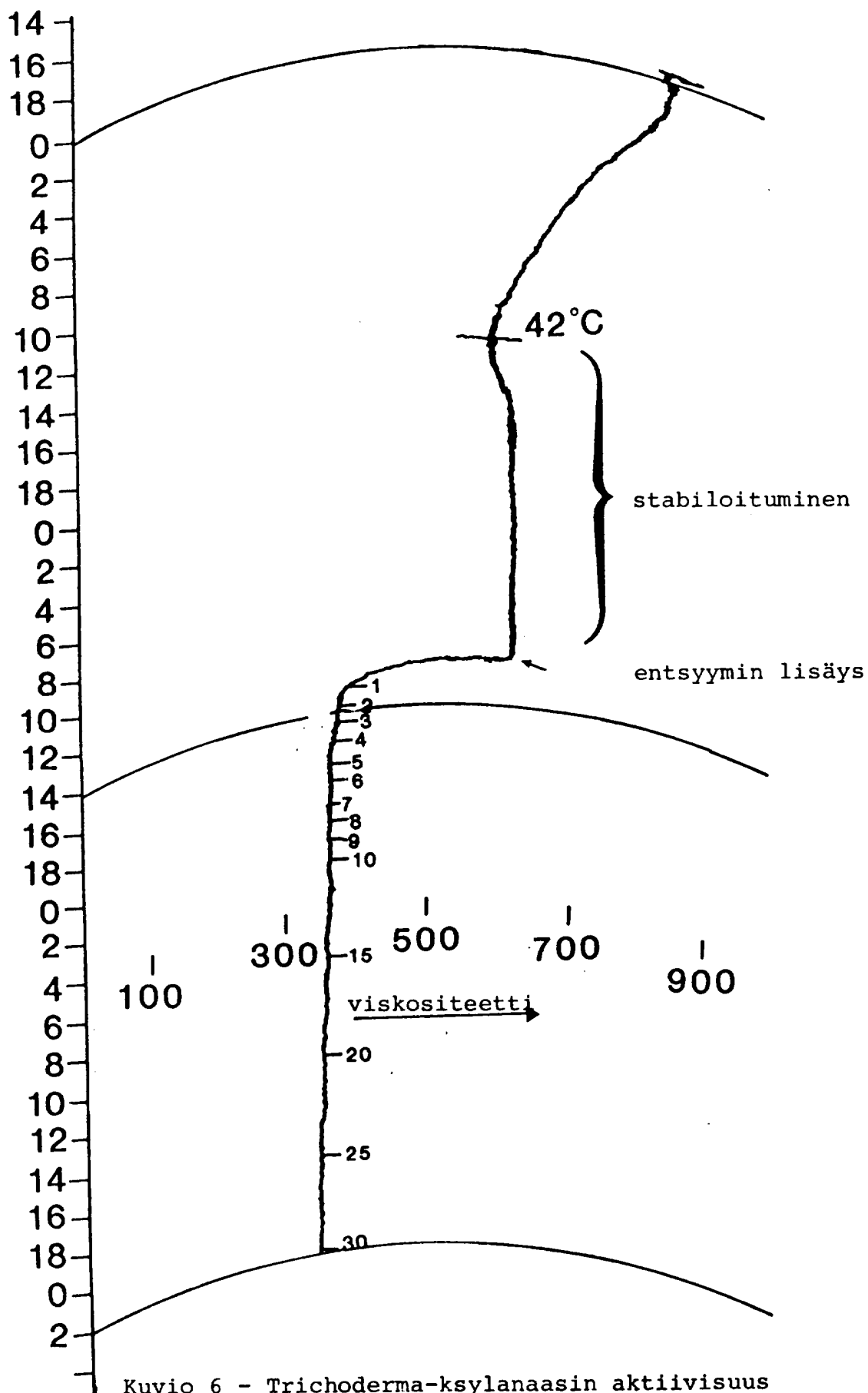




Kuvio 4 - Aspergillus niger-ekso-ksylanaasin aktiivisuus

Kuvio 5 - Disporotrichum-ksylanaasin aktiivisuus

minuuttia

Kuvio 6 - *Trichoderma*-ksylanaasin aktiivisuus