F I 0000983368

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 98336

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 06 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

A 23L 1/236, 1/307, 2/00, C 07H 3/06, A 61K 47/26

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **891763**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **13.04.89**

(24) Alkupäivä - Löpdag **13.04.89**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **15.10.89**

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad **28.02.97**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

14.04.88 FR 8804944 P

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. **Roussel-Uclaf**, 35, Boulevard des Invalides, 75007 Paris, France, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Biton, Jacques**, 3, rue des Veneurs, 60610 La Croix Saint Ouen, France, (FR)
2. **Gellef, Gérard**, 1, Avenue du Stade, 60610 La Croix Saint Ouen, France, (FR)
3. **Michel, Jean-Marc**, 22, rue des Domeliers, 60200 Compiegne, France, (FR)
4. **Paul, Francois Bernard**, 69, Chemin Malepére, 31400 Toulouse, France, (FR)
5. **Monsan, Pierre Frédéric**, Renoufail, Mondonville, 31700 Blagnac, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: **Kolster Oy Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Fruktoosia sisältävien oligosakkaridien käyttö vähäkalorisina makeutusaineina ja menetelmä ihmisen tai eläimen saaman kokonaisenergian määrän vähentämiseksi
Användning av fruktos innehållande oligosackarider såsom kalorifattiga sötningsmedel och förfarande för att minska den erhållna totala energimängden hos människa eller djur

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 2210128 (C 07C 49/18), GB A 2105338 (C 13K 13/00), GB A 2072679 (C 12P 19/00), US A 3894146 (A 61k 7/16)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää, jonka tarkoituksena on vähentää ihmisen tai eläimen saamaa päivittäistä kokonaisenergian määrää ja jolle on tunnusomaista, että yksi tai useampi fruktosyloitu oligosakkaridi, jossa on 3-8 sokeriyksikköä β-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneinä, korvaa kokonaan tai osittain kaloripitoiset sokerit tuotteissa, jotka on tarkoitettu elintarvikkeiksi tai dieettivalmisteiksi.

Keksintö koskee myös ruoka- tai dieettivalmisteita tai ruoka- tai dieettijuomia, joille on tunnusomaista, että niiden sisältämät kaloripitoiset sokerit on korvattu kokonaan tai osittain tällaisilla fruktosyloiduilla oligosakkarideilla.

Uppfinningen avser ett förfarande för reducering av den dagligen intagna, totala energimängden hos människor eller djur, varvid förfarandet karakteriseras av att en eller flera fruktosylerade oligosackarider, vilka har 3-8 sockerenheter som med β-glykosidbindningar förenats med varandra, helt eller delvis ersätter de kalorihaltiga sockren i produkter, vilka avsetts som livsmedel eller dietpreparat.

Uppfinningen avser även livsmedel- eller dietpreparat eller som livsmedel använda närings- eller dietdrycker, vilka karakteriseras av att deras kalorihaltiga sockerarter helt eller delvis ersatts med dylika fruktosylerade oligosackarider.

Fruktoosia sisältävien oligosakkaridien käyttö vähäkalorisina makeutusaineina ja menetelmä ihmisen tai eläimen saaman kokonaisenergian määrän vähentämiseksi

Tämä keksintö koskee fruktosyloitujen oligosakkaridien käyttöä vähäkalorisina makeutusaineina ja menetelmää ihmisen tai eläimen saaman kokonaisenergian vähentämiseksi niiden avulla.

Suurin osa ruoan sisältämästä sokerista on sakkaroosia, joka on glukoosista ja fruktoosista anomeeristen hiiliatomiensa välityksellä muodostunut disakkaridi.

Paitsi ruoka-aineissa käytettävänä makeutusaineena sakkaroosi on myös energian lähde, koska 1 g sakkaroosia synnyttää elimistössä palaessaan 4 kcal. Funktionaalisten ominaisuuksiensa perusteella (sulamislämpötila, liukoisuus, kyky kiteytyä) se toimii myös rakenneosana ja säilöntäaineena elintarvikkeissa.

Viime aikoina on ollut voimakas pyrkimys vähentää elintarvikkeista saatavaa energiaa liikalihavuuden välttämiseksi ("kevytruokalajit", "dieettijuomat") ja sen seurauksena tarve sokerien korvaamiseksi vähäkalorisilla sakkaroosin korvikkeilla.

Nyt on jo huomattu, että eräillä fruktosyloiduilla oligosakkarideilla on samanaikaisesti sopiva makeutuskyky ja heikosti kariesta aiheuttava ja/tai kariesta estävä ominaisuus (FR 2 450 876), mutta yhtäkään mainintaa ei ole niiden sisältämästä kalorimäärästä.

Nyt on kuitenkin keksitty, että fruktosyloidut oligosakkaridit voivat myös vähentää odottamattomasti päivittäistä kalorimäärää sakkaroosiin verrattuna. On painotettava, että sokerin kariesta estävä tai sitä lievästi aiheuttava vaikutus ei missään tapauksessa osoita niiden olevan vähäkalorisia.

Voidaan muun muassa mainita ksylitoli (J.J. BEEREBOOM CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition

May 1979, ss. 401-413), leukroosi eli 5-O-α-(D-glukopyranosyyli)-D-fruktopyranoosi (USP 4 693 974) ja "coupling sugars" (TSUJI Y. et al., J.Nutr. Sci. Vitaminol., 32, 93-100, 1986), fruktosyloidut oligosakkaridit, jota valmistaa yhtiö nimeltä HAYASHIBARA (FR 2 559 490) ja jotka ovat lievästi kariesta aiheuttavia, mutta osoittautuvat kaloripitoisiksi.

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä, jonka tarkoituksena on vähentää ihmisen tai eläimen saamaa päivittäistä kokonaisenergian määrää. Menetelmälle on tunnusomaista, että korvataan kulutettavan ruoan tai juoman sisältämät energiapitoiset sokerit kokonaan tai osittain yhdellä tai useammalla fruktosyylioligosakkaridilla, joka sisältää 3 - 8 sokeriyksikköä, jotka ovat liittyneet yhteen β-sidoksilla, jolloin mainittujen fruktosyylioligosakkaridien määrä on riittävä vähentämään ihmisen tai eläimen saamaa energiamäärää 5 - 20 %:lla verrattuna energiamäärään, joka saadaan energiapitoisia sokereita sisältävästä tuotteesta.

Menetelmän tarkoitus on erityisesti parantaa ihmisen fyysistä ulkonäköä painon pudottamisella.

Elintarvikkeissa olevat kaloripitoiset sokerit ovat pääasiassa sakkaroosia, mutta käytetään myös muita sokereita, kuten fruktoosia, glukoosia, glukoosi/fruktoosisiirappia, joka on mahdollisesti fruktoosilla rikastettu.

Vähäkalorisilla sokereilla tarkoitetaan sokereita, jotka päinvastoin kuin sakkaroosi hajoavat vähän tai eivät lainkaan ruoansulatusentsyymeillä: syljen amylaasilla, haiman amylaasilla, ohutsuolen nukan disakkaridaaseilla.

Jäljempänä esimerkeissä 1 - 3 esitetyt tulokset osoittavat, että keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetyt oligosakkaridit eivät hajoa syljen eikä haiman amylaaseilla ja hyvin vähän tai eivät lainkaan ohutsuolen suolinukan di-sakkaridaaseilla.

Nämä tulokset huomioon ottaen voidaan otaksua, että keksinnön mukainen menetelmä vähentää ihmisen päivittäistä kokonaisenergiamäärää 5 - 20 %.

Tämä vähentäminen toteutetaan korvaamalla kokonaan tai osittain elintarvikkeissa olevat kaloripitoiset sokerit, kuten sakkaroosi, keksinnön mukaisilla fruktosyloiduilla oligosakkarideilla.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetyt fruktosyloidut oligosakkaridit ovat muodostuneet yksinkertaisista sokeriyksiköistä, jotka ovat liittyneet toisiinsa ß-glykosidisilla sidoksilla ja joiden viimeinen sokeriyksikkö on fruktoosimolekyyli.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä fruktosyloidut oligosakkaridit ovat erityisesti trisakkarideja.

Keksinnön kohteena on erityisesti menetelmä, jolle on tunnusomaista, että käytetyt trisakkaridit ovat muodostuneet yhdestä sakkaroosimolekyylistä ja yhdestä glukoosimolekyylistä ja että glykosidiset yksiköt ovat sitoutuneet joko $ß_{1-2}$-sidoksella muodostaen soforofruktoosia tai $ß_{1-3}$-sidoksella muodostaen laminaaribiofruktoosia tai $ß_{1-4}$-sidoksella muodostaen sellobiofruktoosia tai $ß_{1-6}$-sidoksella muodostaen gentiobiofruktoosia.

Keksinnön kohteena on vielä menetelmä, jolle on tunnusomaista, että käytetyt trisakkaridit ovat muodostuneet yhdestä sakkaroosimolekyylistä ja yhdestä glukoosimolekyylistä ja että glykosidiset yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa joko $ß_{1-4}$-sidoksilla muodostaen sellobiofruktoosia tai $ß_{1-6}$-sidoksella muodostaen gentiobiofruktoosia.

Keksinnön kohteena on myös menetelmä, jolle on tunnusomaista, että käytetyt trisakkaridit ovat muodostuneet yhdestä sakkaroosimolekyylistä ja yhdestä glukoosimolekyylistä ja että glykosidiset yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa $ß_{1-6}$-sidoksella muodostaen gentiobiofruktoosia.

Esimerkkiosassa esitetyt tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaisilla fruktosyloiduilla oligosakkari-

deilla on sellaiset organoleptiset ja fysikokemialliset ominaisuudet, että niillä voidaan korvata sakkaroosi kokonaan tai osittain rakenteen, hapon- ja lämmönkestävyyden, liukoisuuden, viskositeetin, veden sitomiskyvyn ja makeuttamisen puolesta. Niiden akuutti myrkyttömyys annoksella 2 g/kg on osoitettu hiirillä.

Toisaalta kuten sakkaroosikin, nämä ovat ei-pelkistäviä sokereita, jotka eivät aiheuta Maillard'in reaktiota.

Kaikki nämä ominaisuudet tekevät niistä täysin käyttökelpoisia elintarvikkeissa tai dieettivalmisteissa.

Paitsi elintarvikkeissa, dieettivalmisteissa tai juomissa oligosakkarideja voidaan käyttää yksinään tai tarvittaessa yhdessä muiden makeutusaineiden kanssa, kuten sakkaroosin, glukoosin, isomerisoidun sakkaroosin, glukoosi/fruktoosi-siirapin kanssa, joka voi olla rikastettu fruktoosilla, maltoosin, sorbitolin, maltitolin, laktitolin, ksylitolin, aspartaamin, asesulfaami K:n, sakariinin kanssa. Niitä voidaan myös sekoittaa kantajiin, kuten polydekstroosiin, tärkkelykseen, maltodekstriineihin, lykasiiniin ja laktoosiin, väriaineisiin, hajusteisiin ja makuaineisiin.

Keksinnön mukaista menetelmää voidaan soveltaa ruoka- tai dieettivalmisteiden tai ruoka- tai dieettijuomien valmistukseen, korvaamalla niiden sisältämät kaloripitoiset sokerit kokonaan tai osittain yhdellä tai useammalla fruktosyloidulla oligosakkaridilla, joka on muodostunut 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä.

Keksintöä voidaan erityisesti soveltaa sellaisten tuotteiden tai juomien valmistukseen, jotka sisältävät painostaan vähintään 5 % yhtä tai useampaa fruktosyloitua oligosakkaridia, joka on muodostunut 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä.

Keksintöä voidaan aivan erityisesti soveltaa sellaisten tuotteiden tai juomien valmistukseen, jotka sisältävät painostaan 5 - 70 % yhtä tai useampaa fruktosyloitua oligosakkaridia, joka on muodostunut 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä.

Keksintöä voidaan soveltaa etenkin sellaisten tuotteiden tai juomien valmistukseen, jotka sisältävät sellobiofruktoosia, gentiobiofruktoosia, laminaaribiofruktoosia ja soforofruktoosia.

Keksintöä voidaan erityisesti soveltaa sellaisten tuotteiden tai juomien valmistukseen, jotka sisältävät sellobiofruktoosia tai gentiobiofruktoosia, ja aivan erityisesti gentiobiofruktoosia.

Fruktosyloituja oligosakkarideja voidaan käyttää kaikissa elintarvikkeissa ja juomissa siirappeina, jauheina, lyofilisoituina, kiteisenä tai paloina.

Termi elintarvikkeet ja juomat tarkoittaa kaikkia elintarvikkeita ja juomia yleensä, kuten säilykkeitä, hilloja, kakkuja, jäätelöitä ja jäädykkeitä, kiisseleitä, erilaisia jälkiruokia, piiraita, mausteita, arkiruokia, hiilihappoisia tai hapottomia juomia, kotieläinten ruokia ja yleensä kaikkia suun kautta nautittavia tuotteita sekä makeutusaineita, jotka sisältävät fruktosyloituja oligosakkarideja.

Keksintöä voidaan soveltaa myös farmaseuttisten tuotteiden valmistukseen.

Näitä tuotteita käytetään esimerkiksi ihmisen painon pudottamiseen hoidettaessa liikalihavuutta, sokeritautia; fruktosyloituja oligosakkarideja voidaan myös käyttää sokeroivana täyteaineena hammastahnoissa, kaikissa suun kautta annosteltaviksi tarkoitetuissa lääkkeissä, esimerkiksi lääkesiirapeissa, pastilleissa, juotavissa tipoissa.

Keksintö koskee myös fruktosyloitujen oligosakkaridien, jotka ovat muodostuneet 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla

sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä, käyttöä ruokavaliossa, jonka tarkoitus on vähentää päivittäistä energiamäärää, ja etenkin gentiobiofruktoosin, laminaaribiofruktoosin, soforofruktoosin ja sellobiofruktoosin käyttöä tähän tarkoitukseen.

Fruktosyloitujen oligosakkaridien, jotka ovat muodostuneet 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä, etenkin gentiobiofruktoosin, laminaaribiofruktoosin, soforofruktoosin ja sellobiofruktoosin käyttö vähäkalorisina sokereina on myös keksinnön kohteena.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyjä fruktosyloituja oligosakkarideja voidaan valmistaa esimerkiksi S.HESTRINin ja G.AVIGADin kuvaamalla menetelmällä (Biochem J., 69, 388-398, 1958) saattamalla levaanisakkaraasi (E.C. 2.4.1.10) (Enzyme Nomenclature, Academic Press. 1984-IUB) reagoimaan substraattiliuoksen kanssa, jossa on sakkaroosia yksin tai sekoitettuna muihin sokereihin, kuten gentiobioosiin, sellobioosiin, oligosakkarideihin, joiden polymeroitumisaste on 3-14 ja jotka on valmistettu glykosidisten polymeerien osittaishydrolyysillä, kuten selluloosasta, jonka sokeriyksiköt ovat liittyneet toisiinsa ß-glykosidisilla sidoksilla.

Näin saadaan siis puhtaana tai seoksena kaikkia fruktosyloituja oligosakkarideja, joita käytetään keksinnön mukaisessa menetelmässä, ja etenkin gentiobiofruktoosia, sellobiofruktoosia ja fruktosyloituja oligosakkarideja, joiden polymerisoitumisaste on 3 - 15.

Fruktosyloituja oligosakkarideja voidaan myös valmistaa käänteisellä entsymaattisella hydrolyysimemetelmällä, joka suoritetaan suuressa substraattikonsentraatiossa.

Patenttijulkaisussa no. WO 87/05936 kuvataan oligosakkaridien entsymaattista synteesiä käyttämällä sellaista menetelmää. Kuitenkin tällä tavalla valmistetut oligosak-

karidit ovat täysin erilaisia kuin tämän keksinnön mukaiset fruktosyloidut oligosakkaridit eikä siinä mainita sakkaroosin käyttöä glykosiditähteen akseptorina.

Seos, jossa on väkevää sakkaroosiliuosta ja jota käytetään glykosiditähteiden akseptorina ja yksinkertaisia sokereita tai glykosidisia polymereerejä, saatetaan reagoimaan yhden tai useamman hiilihydraattihydrolaasin kanssa.

Tässä menetelmässä käytettävät hiilihydraattihydrolaasit, jotka kuuluvat glykosidaasien luokkaan, hydrolysoivat polymeerien ß-glykosidisia sidoksia (E.C. 3.2.1.X), ja aivan erityisesti sellulaasit tai sellulolyyttiset kompleksit (E.C. 3.2.1.4), laminarinaasit (E.C. 3.2.1.6), ß-glukosidaasit (3.2.1.21), endo-1,3-ß-glukosidaasit (E.C. 3.2.1.39), glukan-1,3-ßglukosidaasit (E.C. 3.2.1.58), glukan-endo-1,2-ß-glukosidaasit (E.C. 3.2.1.71), lichenaasit (E.C. 3.2.1.73), glukan-1,4-ß-glukosidaasit (E.C. 3.2.1.74), glukan-endo-1,6-ß-glukosidaasit (E.C. 3.2.1.75) ja oksosellobiohydrolaasit (E.C. 3.2.1.91) väkevissä sakkaroosi-, glukoosi-, metyyli-ß-glukosidi-, sellobioosi-, gentiobioosi-, soforoosi-, laminaaribioosi-, oligodekstriiniliuoksissa, joiden yksinkertaiset sokeriyksiköt ovat liittyneet toisiinsa ß-glykosidisilla sidoksilla, väkevissä glykosidipolymeeriliuoksissa, joiden yksinkertaiset sokeriyksiköt ovat liittyneet toisiinsa ß-glykosidisilla sidoksilla.

Kaikkia glykosiditähteiden luovuttajia käytetään sellaisenaan tai seoksina.

Jollakin edellä olleella menetelmällä muodostuneiden fruktosyloitujen oligosakkaridien analyysit voidaan suorittaa esimerkiksi käänteisfaasi-HPLC:llä käyttämällä Nucleosil C18-pylvästä.

Muodostuneiden fruktosyloitujen oligosakkaridien rakenne voidaan varmistaa esimerkiksi hiili-13- tai proto-

ni-NMR:llä puhtaasta oligosakkaridista, joka on eristetty preparatiivisella Nucleosil C18-pylvällä käänteisfaasi-HPLC:llä. Eluenttina on vesi oligosakkarideilla, joiden polymeroitumisaste on 3 - 5, ja sopiva veden ja metanolin seos sellaisilla, joiden polymeroitumisaste on suurempi tai yhtäsuuri kuin 5.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyjä fruktosyloituja oligosakkarideja voidaan eristää ja puhdistaa preparatiivisesti käyttämällä esimerkiksi aktiivihiilijauheella suoritettavaa kromatografiaa, ioninvaihtokromatografiaa, lähtien menetelmällä saadusta sokeriseoksesta.

Voidaan myös käyttää oligosakkaridien seosta sellaisenaan.

Jäljempänä olevat esimerkit valaisevat keksintöä.

Esimerkki 1: Gentiobiofruktoosin ja sellobiofruktoosin hydrolyysi ihmisen syljen ja sian haiman amylaaseilla.

1.1 : Gentiobiofruktoosi- tai sellobiofruktoosiliuoksen valmistaminen.

Gentiobiofruktoosin ja sellobiofruktoosin synteesi suoritetaan saattamalla levaanisakkaraasi reagoimaan substraattiliuoksen kanssa, joka sisältää sakkaroosia ja gentiobioosia (sellobioosia), S.HESTRINin ja G. AVIGADin kuvaamalla menetelmällä.

Muodostunut gentiobiofruktoosi (sellobiofruktoosi) eristetään ja puhdistetaan sitten reaktioseoksesta semipreparatiivisella käänteisfaasi-HPLC:llä (pylväs: Nucleosil C18 - eluantti:vesi), konsentroidaan ja sitten lyofilisoidaan.

Tuote liuotetaan sitten 0.1 M natriumfosfaattipuskuriin (pH 7.0) niin, että fruktosyloidun oligosakkaridin loppukonsentraatioksi tulee 3 g/l.

1.2. Hydrolyysikoe ihmisen syljen amylaasilla.

Seosta, jossa on 2 ml fruktosyloitua oligosakkaridiliuosta (valmistettu kohdassa 1.1) ja 17.8 yksikköä ihmisen syljen α-amylaasia (SIGMA nro A 0521) inkuboidaan 2 tuntia 37 ^{o}C:ssa.

Kahden tunnin kuluttua reaktio lopetetaan kuumentamalla. Muodostunut glukoosi mitataan entsymaattisella glukoosioksidaasi/peroksidaasimenetelmällä (Boehringerin testi no. 124036). Samalla tavalla suoritetaan kontrollikoe glucidex 21-tyyppisillä maltodekstriineillä (Sté Roquette, Ranska).

Saadut tulokset annetaan mikromooleina glukoosia, jota on muodostunut yhdellä entsyymiyksiköllä tunnissa.

Substraatti	Ihmisen syljen α-amylaasiaktiivisuus
Maltodekstriinit	235
Gentiobiofruktoosi	0
Sellobiofruktoosi	0

1.3: Hydrolyysikoe sian haiman amylaasilla.

Seosta, jossa on 2 ml fruktosyloitua oligosakkaridiliuosta (valmistettu kohdassa 1.1) ja 19 yksikköä sian haiman α-amylaasia (SIGMA nro A 1278) inkuboidaan 2 tuntia 37 oC:ssa.

Kahden tunnin kuluttua reaktio lopetetaan kuumentamalla. Muodostunut glukoosi mitataan entsymaattisella glukoosioksidaasi/peroksidaasimenetelmällä (Boehringerin testi no. 124036).

Kontrollikoe suoritetaan glucidex 21-tyyppisillä maltodekstriineillä (Sté Roquette, Ranska).

Saadut tulokset annetaan mikromooleina glukoosia/ entsyymiyksikkö/tunti.

Substraatti	Sian haiman α-amylaasiaktiivisuus
Maltodekstriinit	224
Gentiobiofruktoosi	0
Sellobiofruktoosi	0

Esimerkki 2: Fruktosyloitujen oligosakkaridien hydrolyysi rotan jejunumin homogenaatilla.

2.1 : Fruktosyloitujen oligosakkaridien valmistus.

Fruktosyloitujen oligosakkaridien synteesi suoritetaan saattamalla levaanisakkaraasi reagoimaan substraattiliuoksen kanssa, joka sisältää sakkaroosia ja gentiobioosia (sellobioosia tai selluloosan hydrolysaattia), S.HESTRINin ja G. AVIGADin kuvaamalla menetelmällä.

Muodostuneet oligosakkaridit eristetään ja puhdistetaan semipreparatiivisella käänteisfaasi-HPLC:llä (pylväs: Nucleosil C18 - eluantti:vesi), sitten lyofilisoidaan.

Tuotteet liuotetaan sitten 0,05 M natriumfosfaattipuskuriin (pH 6,0) niin, että konsentraatioksi tulee 2,924 mmol/l.

2.2 : Rotan jejunumin homogenaatin valmistus.

Poistetaan 5 cm jejunumia koiraspuoliselta Sprague Dawley rotalta (joka on sitä ennen ollut paastolla 24 tuntia) ja huuhdellaan fysiologisella seerumiliuoksella.

Jejunum (joka painaa noin 150 mg) hienonnetaan 0,9 % (w/v) NaCl:ssa "Polytron"-tyyppisellä homogenisaattorilla, homogenaatti laimennetaan 10 ml:ksi (0,9 %:lla NaCl:lla).

2.3 Fruktosyloitujen oligosakkaridien hydrolyysi rotan jejunumin homogenaatilla.

Reaktioseosta, joka sisältää 2 ml fruktosyloitua oligosakkaridiliuosta ja 2 ml homogenaattia, inkuboidaan 24 tuntia 37 °C:ssa magneettisekoituksessa.

Näytteet otetaan säännöllisin väliajoin ja ruoansulatusentsyymit inaktivoidaan lämpökäsittelyllä.

Kontrolliksi suoritetaan samanlainen koe sakkaroosia sisältävällä liuoksella.

Ajan funktiona vapautunut glukoosi määritetään entsymaattisella glukoosioksidaasi/peroksidaasimenetelmällä.

Hydrolyysiaste lasketaan seuraavasti:

$$H.A\ \% = \frac{\text{vapautunut glukoosi (µg)}}{\text{koko vapautunut glukoosi (µg)}} \times 100$$

TAULUKKO I

Aika (tuntia)	Sakkaroosi HA%	Gentiobio-fruktoosi HA%	Sellobio-fruktoosi HA%
0	0	0	0
8t 30	57.6	0	0
17t 30	66.7	0.4	3.7
24t 00	92.7	0.4	5.4

Toisessa koesarjassa seurattiin ajan funktiona fruktosyloidun oligosakkaridin koostumusta käänteisfaasi-HPLC:llä (pylväs Nucleosil C18 - eluantti : vesi), sakkaroosin ollessa aina kontrollisokerina.

Tulokset on annettu taulukossa II.

TAULUKKO II

Tutkittava tuote	Aika tuntia	Hiilihydraattikoostumus % *1					
		Glukoosi+fruktoosi	Sakkaroosi	Gentiobiofruktoosi	Sellobiofruktoosi	PA_3F	PA_4F
Sakkaroosi	0t	0	100	-	-	-	-
	8t 30	-	-	-	-	-	-
	24t 00	96	4	-	-	-	-
Gentiobiofruktoosi	0t	0	-	100	-	-	-
	8t 30	0	ND *2	100	-	-	-
	24t 00	0,4	ND	99,6	-	-	-
Sellobiofruktoosi	0t	0	-	-	100	-	-
	8t 30	3,0	ND	-	97,0	-	-
	24t 00	6,4	ND	-	93,6	-	-
PA_3F	0t	0	-	-	-	100	-
	24t	5	-	-	-	95	-
PA_4F	0t	0	-	-	-	-	100
	24t	5	-	-	-	-	95

PA = polymeroitumisaste

Esimerkki 3: Fruktosyloitujen oligosakkaridien hydrolyysi ihmisen jejunumin limakalvon homogenaatilla.

3.1: Gentiobiofruktoosi- tai sellobiofruktoosiliuosten valmistus.

Valmistus on samanlainen kuin esimerkissä 2 kohdassa 2.1.

3.2: Ihmisen jejunumin limakalvon homogenaatin valmistus.

Jejunumin limakalvoa (noin 40 mg) homogenisoidaan 0,9 %:lla (paino/tilavuus) NaCl:lla "Polytron"-tyyppisellä homogenisaattorilla, sitten homogenaatti laimennetaan 12 ml:aan (0,9%:lla NaCl:lla).

3.3: Gentiogiofruktoosin tai sellubiofruktoosin hydrolyysi ihmisen jejunumin limakalvolla.

Reaktioseosta, joka sisältää 2 ml fruktosyloitua oligosakkaridiliuosta ja 2 ml homogenaattia, inkuboidaan 24 tunnin ajan 37 ^{o}C:ssa magneettisekoituksessa.

Näytteet otetaan säännöllisin väliajoin ja ohutsuolen entsyymit inaktivoidaan lämpökäsittelyllä.

Kontrolliksi suoritetaan samanlainen koe sakkaroosia sisältävällä liuoksella.

Vapautunut glukoosi ajan funktiona määritetään entsymaattisella glukoosioksidaasi/peroksidaasimenetelmällä.

Hydrolyysiaste lasketaan seuraavasti:

$$H.A\ \% = \frac{\text{vapautunut glukoosi (µg)}}{\text{koko vapautunut glukoosi (µg)}} \times 100$$

TAULUKKO III

Aika (tuntia)	Sakkaroosi HA%	Gentiobio-fruktoosi HA%	Sellobio-fruktoosi HA%
0	0	0	0
10t	57.1	0	0
24t 00	88.0	0	0

Johtopäätökset esimerkeistä 1 - 3.

Kuten taulukoista 1 - 3 voidaan todeta, tulokset osoittavat, että fruktosyloidut oligosakkaridit hydrolysoituvat vähän rotan ja ihmisen suoliston suolinukan entsyymeillä sakkaroosiin verrattuna.

Lisäksi esimerkin 1 tulokset osoittavat, etteivät yhdisteet hydrolysoidu lainkaan ihmisen syljen α-amylaasilla eikä sian haiman α-amylaasilla.

Voidaan päätellä, että fruktosyloidut oligosakkaridit sopivat vähäkalorisiksi makeutusaineiksi.

Esimerkki 4:

Vadelmajäädyke (kontrolli)

- 200 g sakkaroosia
- 200 g vettä
- 40 g glukoosia Cristal R, CPC-merkki
- 400 g vadelmia
- 2 g omenapektiiniä
- 1 ruokalusikallinen sitruunamehua
- sokerisiirappia, joka on säädetty 18° Baume':hen

Sama vadelmajäädyke tehtiin kuten kontrollijäädykekin, paitsi että 200 g sakkaroosin tilalla oli sellobiofruktoosia, joka oli valmistettu S. HESTRINin ja G.AVIGADin kuvaamalla menetelmällä.

Koeolosuhteet olivat täsmälleen samat molemmissa kokeissa.

Kymmenen ihmisen muodostaman raadin mielestä ei havaittu mitään merkittävää eroa sokerin maussa kontrollina käytetyn sakkaroosin ja sellobiofruktoosin välillä.

Lisäksi nämä henkilöt havaitsivat keksinnön mukaisen jäädykkeen olevan konsistenssiltaan parempi, kun se nesteytyi hitaammin kuin kontrollijäädyke.

Esimerkki 5 :

Seuraavan reseptin mukaisesti valmistettiin vaniljamunajäätelöä, joka sisältää sakkaroosia:

Vaniljamunajäätelö (kontrolli):

- 100 g sakkaroosia
- 500 ml kevytmaitoa
- 20 g rasvatonta maitojauhetta
- 40 g Trimolin R (inverttisokeria)
- 1 g omenapektiiniä
- puolikas vaniljatankoa
- 3 munankeltuaista (60 g:n munista)
- 40 g ranskankermaa

Tutkittava vaniljamunajäätelö tehtiin samoissa olosuhteissa yksinkertaisesti korvaamalla 100 g sakkaroosia 100 g:lla sellobiofruktoosia, joka oli valmistettu S. HESTRINin ja G. AVIGADin kuvaamalla menetelmällä.

Kymmenestä henkilöstä koostunut raati ei havainnut mitään merkittäviä eroja tutkittavan valmisteen ja kontrollin välillä.

Kaikki henkilöt olivat yksimielisiä siitä, että tutkittavalla valmisteella oli parempi konsistenssi.

Esimerkki 6:

Seuraavanlaisella reseptillä valmistettiin briossi, joka sisälsi sakkaroosia:

Briossi (kontrolli):

- 20 g sakkaroosia
- 7,5 g leivinhiivaa
- 250 g jauhoja (tyyppi 45)
- 5 g suolaa
- 2 munaa (60 g)
- 100 g voita
- 4 ruokalusikallista vettä.

Tutkittava briossi valmistettiin samalla tavalla yksinkertaisesti korvaamalla 20 g sakkaroosia 20 g:lla sellobiofruktoosia, joka oli valmistettu S. HESTRINin ja G.AVIGADin kuvaamalla menetelmällä.

Kymmenestä henkilöstä koostuvan raadin mielestä tutkittavan valmisteen ja kontrollivalmisteen välillä ei ollut mitään merkittävää eroa.

Esimerkki 7:

Seuraavalla reseptillä valmistettiin "Genova"-leivos, joka sisälsi sakkaroosia :

"Genova"-leivos (kontrolli):

- 100 g sakkaroosia
- 3 munaa
- 50 g jauhoja
- 50 g Difal-keksijauhetta.

Tutkittava "Genova"-leivos valmistettiin samalla tavalla yksinkertaisesti korvaamalla 100 g sakkaroosia 100 g:lla sellobiofruktoosia, joka oli valmistettu S.HESTRINin ja G.AVIGADin kuvaamalla menetelmällä.

Esimerkki 8:

Seuraavalla reseptilla valmistettiin leivoskreemi, joka sisältää sakkaroosia:

Leivoskreemi (kontrolli):

- 100 g sakkaroosia
- 500 ml kevytmaitoa
- 1 muna (60 g)
- 1 munankeltuainen
- 20 g jauhoja
- 20 g Difal-kreemijauhetta

Leivoskreemi valmistettiin samalla tavalla yksinkertaisesti korvaamalla 100 g sakkaroosia 100 g:lla sellobiofruktoosia, joka oli valmistettu S.HESTRINin ja G. AVIGADin kuvaamalla menetelmällä, valmisteessa oli lisäksi 0,6 g ASPARTAAMIa.

Kymmenestä henkilöstä koostuva raati ei havainnut merkittävää eroa näiden kahden valmisteen välillä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ihmisen tai eläimen saaman kokonaisenergian määrän vähentämiseksi, t u n n e t t u siitä, että korvataan kulutettavan ruoan tai juoman sisältämät energiapitoiset sokerit kokonaan tai osittain yhdellä tai useammalla fruktosyylioligosakkaridilla, joka sisältää 3 - 8 sokeriyksikköä, jotka ovat liittyneet yhteen β-sidoksilla, jolloin mainittujen fruktosyylioligosakkaridien määrä on riittävä vähentämään ihmisen tai eläimen saamaa energiamäärää 5 - 20 %:lla verrattuna energiamäärään, joka saadaan energiapitoisia sokereita sisältävästä tuotteesta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fruktosyloidut oligosakkaridit ovat trisakkarideja.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trisakkaridit ovat muodostuneet yhdestä sakkaroosimolekyylistä ja yhdestä glukoosimolekyylistä ja glykosidiset yksiköt ovat sitoutuneet joko β_{1-2}-sidoksella muodostaen soforofruktoosia tai β_{1-3}-sidoksella muodostaen laminaaribiofruktoosia tai β_{1-4}-sidoksella muodostaen sellobiofruktoosia tai β_{1-6}-sidoksella muodostaen gentiobiofruktoosia.

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trisakkaridit ovat muodostuneet yhdestä sakkaroosimolekyylistä ja yhdestä glukoosimolekyylistä ja glykosidiset yksiköt ovat sitoutuneet joko β_{1-4}-sidoksella muodostaen sellobiofruktoosia tai β_{1-6}-sidoksella muodostaen gentiobiofruktoosia.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 2 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trisakkaridit ovat muodostuneet yhdestä sakkaroosimolekyylistä ja yhdestä glukoosimolekyylistä ja glykosidiset yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa β_{1-6}-sidoksella muodostaen gentiobiofruktoosia.

6. Fruktosyloitujen oligosakkaridien, jotka ovat muodostuneet 3 - 8:sta, β-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä, käyttö ruoka- tai dieettivalmisteiden tai ruoka- tai dieettijuomien valmistukseen, t u n n e t t u siitä, että valmisteiden sisältämät energiapitoiset sokerit korvataan kokonaan tai osittain yhdellä tai useammalla mainitulla fruktosyloidulla oligosakkaridilla, jolloin näiden määrä on riittävä vähentämään ihmisen tai eläimen saamaa energiamäärää 5 - 20 %:lla verrattuna energiamäärään, joka saadaan energiapitoisia sokereita sisältävästä tuotteesta.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että ruoka- tai dieettivalmiste tai ruoka- tai dieettijuoma sisältää vähintään 5 paino-% mainittua fruktosyloitua oligosakkaridia.

8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että ruoka- tai dieettivalmiste tai ruoka- tai dieettijuoma sisältää 5 - 70 paino-% mainittua fruktosyloitua oligosakkaridia.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 6 - 8 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että ruoka- tai dieettivalmiste tai ruoka- tai dieettijuoma sisältää sellobiofruktoosia, gentiobiofruktoosia, laminaaribiofruktoosia tai soforofruktoosia.

10. Fruktosyloitujen oligosakkaridien, jotka ovat muodostuneet 3 - 8:sta, β-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä, käyttö farmaseuttisten valmisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että valmisteiden sisältämät energiapitoiset sokerit korvataan kokonaan tai osittain yhdellä tai useammalla mainitulla fruktosyloidulla oligosakkaridilla, jolloin näiden määrä on riittävä vähentämään ihmisen tai eläimen saamaa energiamäärää 5 - 20 %:lla verrattuna energiamäärään, joka saadaan energiapitoisia sokereita sisältävästä tuotteesta.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että fruktosyloitu oligosakkaridi on gentiobiofruktoosi, laminaaribiofruktoosi, soforofruktoosi tai sellobiofruktoosi.

12. Fruktosyloitujen oligosakkaridien, jotka ovat muodostuneet 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä, käyttö ruokavaliossa, joka vähentää päivittäistä kokonaisenergian määrää, t u n n e t t u siitä, että ruokavalion sisältämät energiapitoiset sokerit korvataan kokonaan tai osittain yhdellä tai useammalla mainitulla fruktosyloidulla oligosakkaridilla, jolloin näiden määrä on riittävä vähentämään ihmisen tai eläimen saamaa energiamäärää 5 - 20 %:lla verrattuna energiamäärään, joka saadaan energiapitoisia sokereita sisältävästä tuotteesta.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että fruktosyloitu oligosakkaridi on gentiobiofruktoosi, laminaaribiofruktoosi, soforofruktoosi tai sellobiofruktoosi.

14. Fruktosyloitujen oligosakkaridien, jotka ovat muodostuneet 3 - 8:sta, ß-glykosidisilla sidoksilla toisiinsa liittyneestä sokeriyksiköstä, käyttö vähäkalorisina sokereina.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että fruktosyloitu oligosakkaridi on gentiobiofruktoosi, laminaaribiofruktoosi, soforofruktoosi tai sellobiofruktoosi.

Patentkrav

1. Förfarande för att minska den erhållna totala energimängden hos människa eller djur, k ä n n e t e c k n a t därav, att de energihaltiga sockren i maten eller drycken som skall konsumeras helt eller delvis ersätts med en eller flera fruktosyloligosackarider, som innehåller 3 - 8 sockerenheter, vilka bundits samman medelst ß-bindningar, varvid mängden av nämnda fruktosyloligosackarider är tillräcklig att minska den erhållna energimängden hos människa eller djur med 5 - 20 % jämfört med energimängden, som erhålls från en produkt innehållande energihaltiga socker.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att de fruktosylerade oligosackariderna är trisackarider.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att trisackariderna bildats av en sackarosmolekyl och en glukosmolekyl och de glykosidiska enheterna bundits antingen via en $ß_{1-2}$-bindning under bildning av laminarbiofruktos eller via en $ß_{1-4}$-bindning under bildning av cellobiofruktos eller via en $ß_{1-6}$-bindning under bildning av gentiobiofruktos.

4. Förfarande enligt patentkrav 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att trisackariderna bildats av en sackarosmolekyl och en glukosmolekyl och de glykosidiska bindningarna bundits via en $ß_{1-4}$-bindning under bildning av cellobiofruktos eller via en $ß_{1-6}$-bindning under bildning av gentiobiofruktos.

5. Förfarande enligt något av patentkrav 2 - 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att trisackariderna bildats av en sackarosmolekyl och en glukosmolekyl och de glykosidiska enheterna bundits till varandra via en $ß_{1-6}$-bindning under bildning av gentiobiofruktos.

6. Användning av fruktosylerade oligosacakrider, som bildats av 3 - 8 sockerenheter bundna till varandra via ß-glykosidiska bindningar, vid framställning av mat- eller dietpreparat eller mat- eller dietdrycker, k ä n n e t e c k n a d därav, att de kalorihaltiga sockren i preparaten helt eller delvis ersätts med en eller flera av nämnda fruktosylerade oligosackarider i en mängd, som är tillräcklig att minska den erhållna energimängden hos människa eller djur med 5 - 20 % jämfört med energimämgden, som erhålls från en produkt innehållande energihaltiga socker.

7. Användning enligt patentkrav 6, k ä n n e t e c k n a d därav, att mat- eller dietpreparatet eller mat- eller dietdrycken innehåller minst 5 vikt-% av nämnda fruktosylerade oligosackarider.

8. Användning enligt patentkrav 6 eller 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att mat- eller dietpreparatet eller mat- eller dietdrycken innehåller 5 - 70 vikt-% av nämnda fruktosylerade oligosakarider.

9. Användning enligt något av patentkrav 6 - 8, k ä n n e t e c k n a d därav, att mat- eller dietpreparatet eller mat- eller dietdrycken innehåller cellobiofruktos, gentiobiofruktos, laminarbiofruktos eller soforobiofruktos.

10. Användning av fruktosylerade oligosackarider, som bildats av 3 - 8 sockerenheter bundna till varandra via ß-glykosidiska bindningar, vid framställning av farmaceutiska preparat, k ä n n e t e c k n a d därav, att de energihaltiga sockren i preparaten helt eller delvis ersätts med en eller flera av nämnda fruktosylerade oligosackarider i en mängd, som är tillräcklig att minska den erhållna energimängden hos människa eller djur med 5 - 20 % jämfört med energimängden, som erhålls från en produkt innehållande energihaltiga socker.

11. Användning enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a d därav, att den fruktosylerade oligosackariden är gentiobiofruktos, laminarbiofruktos, soforofruktos eller cellobiofruktos.

12. Användning av fruktosylerade oligosackarider, som bildats av 3 - 8 sokerenheter bundna till varandra via ß-glykosidiska bindningar, i en diet som minskar den dagliga totala energimängden, k ä n n e t e c k n a d därav, att de energihaltiga sockren i dieten helt eller delvis ersätts med en eller flera av nämnda fruktosylerade oligosackarider i en mängd, som är tillräcklig att minska den erhållna energimängden hos människa eller djur med 5 - 20 % jämfört med energimängden, som erhålls från en produkt innehållande energihaltiga socker.

13. Användning enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a d därav, att den fruktosylerade oligosackariden är gentiobiofruktos, laminarbiofruktos, soforofruktos eller cellobiofruktos.

14. Användning av fruktosylerade oligosackarider, som bildats av 3 - 8 sockerenheter bundna till varandra via ß-glykosidiska bindningar, som kalorifattiga socker.

15. Användning enligt patentkrav 14, k ä n n e t e c k n a d därav, att den fruktosylerade oligosackariden är gentiobiofruktos, laminarbiofruktos eller cellobiofruktos.