



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 79556

C
(45) P. 01.1991 P. 01.1991
P. 01.1991 P. 01.1991 10.11.1991

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 12 P 19/24, C 12 N 9/92, 11/12

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21)	Patentihakemus - Patentansökning	832403
(22)	Hakemispäivä - Ansökningsdag	30.06.83
(24)	Alkupäivä - Giltighetsdag	30.06.83
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	31.12.83
(44)	Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.09.89
(86)	Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32) (33) (31)	Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	30.06.82
USA(US) 393845 Toteennäytetty-Styrkt		

(71) Nabisco Brands, Inc., Nabisco Brands Plaza, Parsippany, N.J., USA(US)

(72) Norman E. Lloyd, Rodgefield, Conn., USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä glukoosin isomeroimiseksi fruktoosiksi -
Förfarande för isomerisering av glukos till fruktos

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää glukoosin
isomeroimiseksi entsyymaattisesti fruk-
toosiksi lämpötilassa n. 90 - n. 140°C
saattamalla se kosketukseen kemiallisesti
stabiloidun glukoosi-isomeraasin kanssa.

(57) Sammandrag

Uppfinningen hänför sig till ett förfarande för enzymatisk
isomerisering av glukos till fruktos vid en temperatur av
ca. 90 - 140°C genom kontakt med kemiskt stabiliserat glukos-
isomeras.

Menetelmä glukoosin isomeroimiseksi fruktoosiksi

Tämä keksintö koskee entsyymaattista menetelmää glukoosin (dekstroosin) isomeroimiseksi fruktoosiksi (levuloosiksi).

Suurin osa elintarvikelaatuaisesta glukoosista on tarjolla maissitärkkelyksestä entsyymaattista tietä saatuna hydrolysaattina eli kaupallisena maissisiirappina. Glukoosin makeudeksi arvioidaan yleisesti 60-80 % sakkaroosin makeudesta ja siten sitä myydään vastaavasti halvemmallalla. Glukoosi on jo kauan pystytty isomeroimaan fruktoosiksi (joka on sakkaroosiakin makeampi) glukoosi-isomeraasiaktiivisuuden omaavan entsyymin avulla, joka mieluiten on immobilisoitu inertille kantajalle kuten dietyyliaminoetyyliselluloosalle, huokoiselle lasille tai kitiinille. Glukoosin entsyymaattista konversiota fruktoosiksi glukoosi-isomeraasin avulla on yksityiskohtaisesti kuvattu lähteissä Hamilton et al., "Glucose Isomerase: a Case Study of Enzyme-Catalyzed Process Technology", Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes, Olson et al., Plenum Press, New York, (1974), s. 94-106, 112, 115-137; Antrim et al., "Glucose Isomerase Production of High-Fructose Syrups", Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 2, Academic Press (1979); Chen et al., "Glucose Isomerase (a Review)" Process Biochem., (1980), s. 30-35; Chen et al., "Glucose Isomerase (a Review)", Process Biochem., (1980), s. 36-41; Nordahl et al., "Fructose Manufacture from Glucose by Immobilized Glucose Isomerase", Chem. Abstracts, Vol. 82, (1975), Abs. No. 110316h ja Takasaki, "Fructose Production Glucose Isomerase", Chem. Abstracts, Vol. 82, (1975), Abs. No. 110316h ja Takasaki, "Fructose Production by Glucose Isomerase", Chem. Abstracts, Vol. 81, (1974), Abs. No 76474a. Lisäksi lukuisat patentit käsittelevät glukoosin isomerointia ja edustavia ovat US-patentit n:ot 3 616 221; Re 28 885 (alkuaan

3 623 953; 3 694 314; 3 708 397; 3 715 276; 3 788 945;
3 826 714; 3 843 442; 3 909 354; 3 960 663; 4 144 127 ja
4 308 349.

Isomerointireaktion tasapaino rajoittaa fruktoosin
5 määrää, joka on saatavissa isomeroitaessa glukoosia glu-
koosi-isomeraasin avulla. Lämpötilassa 65°C reaktion tasa-
paino asettuu kohtaan, jossa on muodostunut n. 51 paino-%
fruktoosia lähtöaineena käytetystä puhtaasta dekstroosis-
ta. Käytettäessä substraattina puhdistettua glukoosiliuos-
10 ta (joka sisältää n. 6 paino-%:iin saakka ei-monosakkari-
deja) ja sallittaessa kohtuullinen viipymisaika entsyymi-
reaktorissa, mainittujen tekniikan tason menetelmillä voi-
daan saada fruktoosisiirappi, jonka suurin fruktoosipitoi-
suus kuivapainosta laskettuna on 48-52 %. Enemmän fruk-
15 toosia sisältävien siirappien saamiseksi on käytettävä
fraktiointisysteemejä, jotka lisäävät tuntuvasti loppu-
tuotteen kustannuksia. Korkeampi lähtötila siirtää kuiten-
kin tasapainon edullisemmaksi. Voitaisiin esim. käyttää
lämpötilassa n. 90-140°C toimivaa glukoosin entsyymaattista
20 isomerointiprosessia, jossa suoraan voitaisiin saada pal-
jon fruktoosia sisältäviä maissisiirappeja (high fructose
corn syrups, HFCS), jotka kuivapainosta laskettuna sisäl-
tävät 53-60 paino-% fruktoosia ja tämä eliminoisi frak-
tioinnin ja uudelleenkierrätyksen tarpeen. Tähän saakka
25 ovat tunnettuihin glukoosi-isomeraasisysteemeihin liittyvä
lämpödenaturoituminen ja tästä johtuva aktiivisuuden jyrk-
kä lasku olleet esteenä pyrkimyksille käyttää korkeampia
lämpötiloja isomerointitasapainon siirtämiseksi fruktoosin
suuntaan. Lisäksi glukoosi ja erityisesti fruktoosi ovat
30 herkästi reagoivia pelkistäviä sokereita, joilla on huo-
mattava pyrkimys muodostaa ei-toivottuja sivutuotteita
kuten psikoosia, värillisiä tuotteita, värien prekursorei-
ta, fruktoosidihydrateja, mannoosia, tagatoosia ja hap-
poja kuumennettaessa lämpötiloihin, jotka ovat välttämät-
35 tömiä tämän keksinnön mukaisessa isomeroinnissa.

Nyt on yllättäen havaittu, että suorittamalla glu-

koosin isomerointiprosessi ottaen huomioon alla kuvatulla tavalla pH:n ja entsyymireaktorissa viipymisajan määrätyt kriittiset rajoitukset voidaan tehokkaasti käyttää isomero-intilämpötilaa n. 101 - n. 113°C ja suoraan saada kor-
5 kealaatuisia HFCS-siirappeja (ts. sivutuotteiden muodostuminen pysyy hyväksyttävällä tasolla), jotka sisältävät vähintään 53 - n. 60 paino-% fruktoosia. Tällä tavoin voidaan eliminoida kalliiden ja käytöltään monimutkaisten fraktiointi- ja uudelleenkierrätysoperaatioiden tarve,
10 jotka operaatiot ovat tarpeen tunnetuissa glukoosin isomero-intiprosesseissa yllä mainitun fruktoosipitoisuusalueen saavuttamiseksi.

Käsiteltävänä olevan keksinnön mukaisesti glukoosi isomeroidaan fruktoosiksi menetelmän avulla, jolle on tun-
15 nusomaista, että glukoosipitoinen syöteliuos, joka sisältää n. 20 - n. 65 paino-% glukoosia, saatetaan kosketukseen kemiallisesti stabiloidun *Streptomyces rubigenosus*-lajista saadun glukoosi-isomeraasin kanssa lämpötilassa n. 101 - n. 113°C ja pH:ssa n. 6,5 - n. 6,75 10 s - 5 h
20 kosketusajaksi, jotta fruktoosin lopulliseksi pitoisuudeksi liuoksessa saadaan vähintään n. 53 - 60 paino-% hiilihydraattien kokonaismäärästä laskettuna ilman olennaista psikoosin ja/tai muiden ei-fruktoosi-, ei-glukoosisokerien muodostusta, jolloin kemiallinen stabilointi käsittää molekyylin sisäisten ristisidosten muodostamisen silloitus-
25 aineen avulla ja/tai sekapolymeroinnin polymeerimatriisiin.

Käsiteltävänä olevan keksinnön mukaisesti fruktoosiksi isomeroitava glukoosi voidaan saada mistä tahansa
30 tämän sokerin tunnetuista lähteistä. Taloudellisista syistä glukoosi saadaan tavallisesti hydrolysoimalla sellulosa tai tärkkelystä hapolla ja/tai entsyymillä, mieluiten jälkimmäisellä tavalla, tunnettujen menetelmien mukaan. Tällä tavoin saadut glukoosipitoiset liuokset sisältävät
35 tyypillisesti pieniä määriä polysakkarideja, sokerioligo-

meerejä jne. käytetystä hiilihydraattilähteestä ja hydro-
lyysimenetelmästä riippuen. Viljat kuten maissi, durra,
vehnä, ruis ja vastaavat sekä tärkkelyspitoiset juurikas-
vit ja mukulakasvit kuten peruna, jamssi, porkkana, kas-
sava (maniokki) ja vastaavat ovat erinomaisia tärkkelys-
lähteitä muutettaviksi tämän keksinnön glukoosilähtöainek-
seksi. Yhdysvalloissa maissitärkkelys on erityisen suosi-
teltava verrattain halvan hintansa ja helpostisaatavuuten-
sa vuoksi. Koska elintarvikelaatuksen glukoosin tuotanto
suosii tärkkelyksen entsyymattisia hydrolyysimenetelmiä,
tällaiset menetelmät ovat tässä suositeltavia. Entsyymat-
tisia hydrolyysimenetelmiä on kuvattu US-patenteissa
n:ot 4 017 363, 3 912 590, 3 922 196, 3 922 197-201 ja
4 284 722, jotka julkistukset on liitetty tähän viitteinä.

Tämän keksinnön menetelmässä *Streptomyces* sp. ATCC
2175 on erinomainen glukoosi-isomeraasilähde.

Koska mikro-organismit muodostavat glukoosi-isome-
raasia solunsisäisesti, glukoosi-isomeraasilähde saadaan
yksinkertaisesti ottamalla solut talteen ja erottamalla
entsyymi soluista tekniikan tason tuntemin menetelmin
esim. autolysoimalla solut tai hajottamalla ne äänen avul-
la. Entsyymiä voidaan käyttää tunnetussa, tavanomaista
rakennetta olevassa entsyymireaktorissa. Kemiallisesti
stabiloitu glukoosi-isomeraasi mieluiten immobilisoidaan
inertille kantajalle tunnettujen ja tavanomaisten menet-
telyjen avulla, mikäli se ei jo ole liukenemattomassa muo-
dossa kemiallisen stabiloinnin ansiosta. Entsyymien immo-
bilisoinnissa käytetyt ainekset ja menettelyt ovat tunnet-
tuja ja niitä on kuvattu useissa julkaisuissa, mm. Wang
et al., *Fermentation & Enzyme Technology*, John Wiley &
Sons, Inc., New York (1979), s. 318-338 ja Kirk-Othmer,
Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Ed., John Wiley
& Sons, Inc., New York (1980), Vol. 9 s. 148-172, jotka
esitetään tässä viitteinä. Pidetään myös suotavana, että
mukana on pienempiä määriä koboltti-, mangaani- ja magne-

siunkationeja ja/tai rikkihapokkeen vesiliuokoista suolaa kuten natriumsulfiittia, natriumbisulfiittia, magnesiumsulfiittia ja/tai magnesiumbisulfiittia kuten on esitetty US-patenttijulkaisussa Re 28 885 vähentämään tai estämään
5 glukoosi-isomeraasin denaturoituminen prosessin käytön aikana.

Haluttujen tulosten saavuttamiseksi on välttämätöntä, että glukoosipitoinen syöteliuoksen hiilihydraattipitoisuus on alueella n. 20 - n. 65, mieluiten n. 30 n. 50
10 paino-%.

Isomerointi suoritetaan pH-alueella n. 6,5 - n. 6,75. Jos isomerointi suoritetaan huomattavasti yllä mainitun pH-alueen ala- tai yläpuolella, syntyy suuria määriä ei-toivottuja sivutuotteita kuten psikoosia, orgaanisia
15 happoja, värillisiä tuotteita, värien prekursoreita, fruktoosidianhydridejä ja vastaavia.

On havaittu, että glukoosi-isomeraasin optimaaktiivisuuden edellyttämä pH on selvästi pienempi korkeissa lämpötiloissa. Niinpä esim. Streptomyces rubigenosuksesta
20 saadun glukoosi-isomeraasin aktiivisuus saavuttaa optimaarvon pH:ssa 8,9-9,2 25°C:ssa, pH:ssa 6,9-7,5 75°C:ssa ja pH:ssa 5,6-6,2 125°C:ssa. Niinpä kun isomerointilämpötilaa kohotetaan, on isomeroinnin pH-arvoa pienennettävä maksimaalisen entsyymiaktiivisuuden ylläpitämiseksi ja lisäksi
25 ei-toivottujen sivutuotteiden muodostumisen estämiseksi.

Käsiteltävänä olevaan keksintöön liittyy vielä vaatimus, joka koskee glukoosipitoisen syöteliuoksen ja kemiallisesti stabiloidun glukoosi-isomeraasin välisen kontaktin kestoa. Hyväksyttävänlaatuksen fruktoosisiirapin saamiseksi tämän kontaktiajan on oltava n. kymmenestä
30 sekunnista n. viiteen tuntiin, mieluummin n. 30 sekunnista n. yhteen tuntiin ja mieluiten n. kahdesta minuutista n. 30 minuuttiin.

Kemiallisesti stabiloidun glukoosi-isomeraasin ja
35 glukoosipitoisen liuoksen suositeltava kontaktiaika riip-

puu suureksi osaksi isomerointireaktion pH-arvosta. pH-alueen alapäässä voidaan sallia pidempiä aikoja ilman glukosin ja fruktoosin haitallista hajoamista psikoosiksi ja muiksi ei-toivotuiksi hajoamistuotteiksi. Alueen yläpäässä lyhyempi kontaktiaika on välttämätön psikoosin ja värin muodostumisen estämiseksi. Käytännössä kokonaisaika, jona glukosipitoinen siirappi on lopullisessa reaktiolämpötilassa tai lähellä sitä, voidaan pitää tehokkaana kontaktiaikana, koska tapahtuvat sokerin hajoamisreaktiot ovat ei-entsymaattisia ja reaktiot tapahtuvat riippumatta siitä, onko neste kosketuksessa glukosi-isomeraasin kanssa vaiko ei. Suoritettaessa isomerointeja lämpötilassa yli 90°C on siis tärkeää minimoida aika, joka tarvitaan glukosiliuoksen saattamiseksi haluttuun isomerointilämpötilaan (esim. sekoittamalla liuokseen höyryä juuri ennen kontaktia isomeraasin kanssa tai kontaktin aikana) ja, kun haluttu fruktoosipitoisuus on saavutettu, nopeasti tämän jälkeen erottaa liuos mahdollisesti jäljellä olevasta isomeraasista ja sitten mahdollisimman nopeasti jäähdyttää liuos alle 90°C ja mieluiten alle 70°C. Käytettäessä kemiallisesti stabiloidun glukosi-isomeraasin liukoista muotoa on välttämätöntä deaktivoida tämä (esim. alentamalla pH alueelle, jossa isomeraasi deaktivoituu) ennen jäähdytysvaihetta estämään korkea lämpötila isomerointivaiheessa muodostuneen fruktoosin muuttuminen takaisin glukosiksi, koska isomerointireaktio on tietenkin reversiibeli. Glukosin ja fruktoosin termodynaaminen tasapainomäärää glukosin saavutettavissa olevan maksimikonversioasteen fruktoosiksi ja tämä tasapaino puolestaan riippuu isomerointilämpötilasta. Glukosin ja fruktoosin tasapainoseosten erittäin huolellinen analyysi on osoittanut seuraavan riippuvuussuhteen:

$$F = 100 K / (K+1) \quad (1)$$

$$\ln K = - \frac{755}{T+273} + 2,3005 \quad (2)$$

jolloin F on fruktoosin prosentuaalinen osuus tasapainotilassa glukoosin ja fruktoosin kokonaispainosta, T on isomeroointilämpötila ($^{\circ}\text{C}$) ja K on glukoosin ja fruktoosin välinen tasapainovakio.

- 5 Glukoosipitoisen siirapin ja isomeraasin todellinen kontaktiaika reaktorissa voidaan yleisesti määrittää seuraavan kaavan avulla, kun käytetään immobilisoitua isomeraasimuotoa sisältävää reaktoria.

$$10 \quad t = \frac{CV \ln \left[\frac{F_e - F_o}{F_e - F} \right]}{kA} \quad (3)$$

jossa

- t = todellinen kontaktiaika
- 15 C = glukoosin ja fruktoosin konsentraatio
- V = liuoksen vapaa tilavuus pakatussa kerroksessa (kerroksen tilavuus miinus immobilisoitujen entsyymihiukkasten tilavuus)
- F_e = fruktoosin osuus glukoosi-fruktoosiseoksesta tasapainotilassa isomeroointilämpötilassa
- 20 F_o = fruktoosin osuus ($G+F$:stä laskettuna) pakattuun kerrokseen tulokohdassa
- F = fruktoosin osuus ($G+F$:stä laskettuna) pakatusta kerroksesta poistuvassa liuoksessa
- 25 k = isomeroinnin reaktionopeusvakio isomerointiolosuhteissa
- A = isomeraasin aktiivisuus pakatussa kerroksessa.

Alla esitettyjen esimerkkien mukaan valmistetun immobilisoidun isomeraasin k -arvot ovat n. 0,07 - n.

- 30 $5 \text{ g h}^{-1} \text{ IGIU}^{-1}$ lämpötilojen ollessa vastaavasti 90°C ja 140°C . Tämä riippuvuussuhde osoittaa, että käytettäessä pakattuja, suuren aktiivisuuden tilavuusyksikköä kohti omaavia kerroksia on kontaktiaika minimoitava korkeassa lämpötilassa. Seuraavien esimerkkien menetelmien mukaan
- 35 valmistetut pakatut kerrokset voivat sisältää jopa 2000 IGIU/ml, jolloin voidaan saavuttaa tasapainotilassa

99,5 %:n fruktoosipitoisuus vähemmässä kuin yhdessä minuutissa korkealämpötilareaktorissa, kun käytetään vaiheistettuja, eri lämpötiloissa toimivia reaktoreita ja syöte ensimmäiseen reaktoriin isomeroidaan matalassa lämpötilassa ennen isomerointia korkeassa lämpötilassa toisessa reaktorissa. Käytettäessä vaiheistettua reaktorisysteemiä on suositeltavaa käyttää menetelmää glukoosin muuttamiseksi entsyymaattisesti fruktoosiksi, tunnettu siitä, että saatetaan glukoosipitoinen syöteliuos, joka sisältää n. 20 - n. 65 paino-% glukoosia, kosketukseen glukoosi-isomeraasin kanssa lämpötilassa n. 20 - n. 80°C, pH:ssa n. 6,0 - n. 9,0 ja kontaktiaika n. 0,5 - n. 2 tuntia, jolloin mainitussa liuoksessa olevasta glukoosista 40 - n. 45 paino-% muuttuu fruktoosiksi, kohotetaan isomerointiväliaineen lämpötila n. 101-113°C:seen, säädetään isomerointiväliaineen pH tarpeen mukaan alueelle n. 6,5 - n. 6,75, saatetaan fruktoosipitoinen liuos kosketukseen glukoosi-isomeraasin kanssa vielä ajaksi n. kymmenestä sekunnista n. viiteen tuntiin konversioasteen nostamiseksi n. 53 - n. 60 paino-%:iin laskettuna glukoosipitoisessa syöteliuoksessa alkuaan olevasta glukoosista ilman psikoosin tai muiden ei-fruktoosi-, ei-glukoosisokereiden olennaista muodostumista. Näin ollen erittäin tehokkaiden pakattujen kerrosten käyttö voi johtaa hyvin lyhyihin tehollisiin kontaktiaikoihin, mikä puolestaan vähentää fruktoosin hajoamista, jota tapahtuu tämän keksinnön vaatimissa korkeissa lämpötiloissa.

Glukoosi-isomeraasin immobilisointitekniikoista suositeltavia ovat sellaiset, joissa muodostuu pieniä, olennaisesti kokoonpuristumattomia, huokoisia katalyyttihiukkasia, mikä minimoi diffuusiovaikutukset, jotka hidastavat isomerointinopeutta.

Vaihtoehtoisesti isomeraasi voidaan immobilisoida kalvossa oleviin huokosiin ja pakottaa glukoosiliuos virtaamaan kalvon läpi korkealämpötilaisomeroinnin aikana.

Tämä aikaansaa hyvän kosketuksen entsyymin ja substraatin välillä ja minimoi diffuusion aiheuttamia rajoituksia. Immobilisoinnissa käytetty kantaja on mieluiten täysin liukenematon ja inertti substraattiliuosten glukosifruktoosikomponenttien haitallisen kontaminoitumisen tai hajoamisen estämiseksi.

Mutta kaupallisessa käytössä fruktoosipitoisia siirappeja ei valmisteta puhtaasta glukosista. Sen sijaan käytetään glukosilähteenä tärkkelyshydrolysaatteja (jotka valmistetaan yllä mainittujen viitteiden mukaan), jotka poikkeuksetta sisältävät ei-glukoosi- ja ei-fruktoosisakkarideja (joita jatkossa kutsutaan polysakkarideiksi), jotka joutuvat tärkkelyksen epätäydellisestä hydrolyysistä ja glukosin reversiosta. Näiden osuus on tyypillisesti 3-8 % kokonaiskuivapainosta, kun sakkaridit saadaan tärkkelystä hydrolysoimalla. Niinpä on välttämätöntä isomeroointilämpötilaa määritettäessä ottaa huomioon glukosiliuoksessa mahdollisesti olevat polysakkaridit ja muutkin tekijät kuten saavutettava fruktoosipitoisuus kokonaiskuivapainosta laskettuna ja glukosiliuoksen ja isomeraasin tehollisena kontaktiaikana muodostuva psikoosi ja muut ei-glukoosi- ja ei-fruktoosituotteet. Seuraavassa on esitetty riippuvuussuhteet isomeroointilämpötilan laskemiseksi:

$$T = \frac{755}{2,3005 - \ln K} - 273 \quad (4)$$

$$K = \frac{F}{100 - F} \quad (5)$$

$$F = \frac{10\,000 (M + C)}{Q(100 - P)} \quad (6)$$

30 T = isomeroointilämpötila ($^{\circ}\text{C}$)

F = fruktoosipitoisuus tasapainotilassa (prosentteina glukosin ja fruktoosin kokonaismäärästä) lämpötilassa T

M = isomeroidussa tuotteessa haluttu fruktoosin prosenttipitoisuus kuivapainosta laskettuna

35 C = tehollisena isomeroointikontaktiaikana muodostuneen

psikoosin ja muiden hajoamistuotteiden prosenttiosuus

Q = isomeroitireaktiossa saavutettu tasapaino prosentteina

P = glukoosiliuoksen prosentuaalinen polyakkaridipitoisuus

- 5 Tyypillisesti muodostuu vähemmän kuin 1 % ja mui-
luiten vähemmän kuin 0,5 % psikoosia ja muita hajoamis-
tuotteita ja voidaan saavuttaa tasapaino 99,5 %. Niinpä
siirappien valmistamiseksi, jotka sisältävät 55,5 % fruk-
toosia (kuivapainosta), alla olevassa taulukossa mainitut
10 glukoosiliuosten polysakkaridipitoisuudet edellyttävät
seuraavia lämpötiloja:

	Polysakkarideja glukoosi- liuoksessa (% kuivapainosta)	Isomeroitilämpötila (°C)
15	0	95,7
	1	99,1
	2	104,3
	3	108,9
	4	113,8
20	6	124,3
	8	136,1

- Hyväksyttävä kauppatuote sisältää keskimäärin 55,5
% fruktoosia kuivapainosta. Tämä johtuu siitä, että tällä
25 fruktoosipitoisuudella paljon fruktoosia sisältävä mais-
sisiirappi (HFCS) on yhtä makeaa kuin sakkaroosi kuivapai-
nosta laskettuna. Lisäksi HFCS, joka sisältää 55,5 % fruk-
toosia, on vakiintunut kauppatuote, jota vaihtoehtoisesti
käytetään monissa elintarvikkeissa ja erityisesti hiiliha-
30 potetuissa virvoitusjuomissa korvaamaan sakkaroosi koko-
naan tai osittain. Tämän tyyppisen HFCS:n kulutuksen ole-
tetaan olevan Yhdysvalloissa 1,3 miljardia kiloa 1982 ja
kulutuksen kasvavan 1,8 miljardiin kiloon 1983. Koska
HFCS:n jakelu, varastointi, annostelu ja formulointi elin-
35 tarvikkeisiin on pakostakin monimutkaista, on yleisesti

olemassa tarve tasalaatuistaa eri valmistajien HFCS-tuotteet siten, että eri lähteistä saatavia tuotteita voitaisiin käyttää vaihtoehtoisesti ja samanaikaisesti. Niinpä HFCS:n valmistukseen liittyvässä tekniikassa fruktoosipitoisuudesta 55-56 % kuivapainosta on tullut merkitsevän tärkeä kohde, johon pyritään.

Käsiteltävänä olevassa menetelmässä saavutetaan fruktoosipitoisuus vähintään 53 %, mieluummin vähintään 54 % ja mieluiten vähintään 55 %.

Käytettäessä liuosta, joka käsiteltävänä olevan menetelmän substraattina sisältää pelkästään glukoosia, on haluttaessa myös mahdollista käyttää glukoosiliuosta, jossa osa glukoosista on jo isomeroitu fruktoosiksi. Esim. isomeroitun glukoosin liuosta, joka sisältää 50 %:iin saakka fruktoosia, voidaan käsitellä käsiteltävänä olevan menetelmän mukaisesti fruktoosikonsentraation lisäämiseksi halutumpaan pitoisuuteen yli 50 % ja suositeltavaan pitoisuuteen 55-56 % ja ylikin tämän.

Glukoosiliuokset, jotka sisältävät fruktoosia määränä alle 50 paino-% hiilihydraattia, voidaan valmistaa tekniikan tason tuntemin menetelmin.

Ottamalla huomioon yllä mainitut glukoosin konsentraatioon, pH-arvoon ja kontaktiaikaan liittyvät vaatimukset tunnetut glukoosin isomeroitintiprosessit voidaan sopivasti adaptoida toimimaan lämpötilassa n. 101 - n. 113°C ja muodostamaan tämän keksinnön runsaasti glukoosia ja fruktoosia sisältäviä siirappeja.

Glukoosi-isomeraasin lämpöstabiilisuutta voidaan merkittävästi parantaa yhdellä tai useammalla kemiallisella käsittelyllä samalla kun entsyymi alla kuvatulla tavalla säilyttää vielä huomattavan osan aktiivisuudestaan. Näin käsiteltyä entsyymiä kutsutaan tässä "kemiallisesti stabiloiduksi isomeraasiksi".

Isomeraasi stabiloidaan kemiallisesti useiden erilaisten menetelmien avulla, jotka voivat johtaa parantu-

neeseen lämpöstabilisuuteen. Pääperiaatteena on liittää rakenne-elementtejä entsyymimolekyyliin siten, että entsyymi ei purkaudu kuumennettaessa entsyymin normaalia lämpödenaturoitumispistettä pidemmälle. Suositeltava stabiloimismenetelmä on modifioida entsyymi substituoimalla siihen kemiallisesti sellaisia polymeroituvia vinyyliryhmiä sisältäviä rakenneosia, joiden vinyyliryhmät tarttuvat monesta kohdin lujasti kiinni entsyymimolekyylin pintaan. Sitten sekoitetaan modifioitua entsyymiä ja yhtä tai useampaa polymeroituvaa vinyylilyhdistettä vesiliuoksessa ja seos sekapolymeroidaan kemiallisesti stabiloiduksi entsyymiksi, joka monesta kohdin on lujasti sitoutunut kolmiulotteiseen polymeerimatriisiin, joka on muodostunut sellaiseksi, että se rakenteeltaan myötäilee entsyymin rakennetta.

Tämän tyyppisen stabiloinnin esimerkkejä ovat kuvanneet Martinek et al., Biochem. Biophys. Acta 485, 1-12 (1977) ja Kulys et al., Biokhimiya, 42, n:o 3, 453-459 (1978).

Yllä kuvattujen reaktioiden suorittamisessa on olennaista, että vältetään olosuhteita, jotka saattavat johtaa isomeraasin denaturoitumiseen ja siten aktiivisuuden hukkaan. Niinpä esim. on yllä kuvattujen reaktioiden kaikissa suoritusvaiheissa vältettävä pH:n ja lämpötilan ääriarvoja.

Esimerkkejä reagensseista, joilla isomeraasi voidaan modifioida substituoimalla siihen polymeroituvia vinyyliryhmiä, ovat akryloyylikloridi, metakryloyylikloridi, akroeiini, krotonaldehydi, maleiininhydridi, 3,4-epoksibuteeni, akryylihappo-2,3-epoksipropyyliesteri, akryylihappo-2,3-tioglysidyyliesteri, 1-allyylioksi-3-(N-etyleenimiini)-2-propanoli, akryylihappo-O-suksiiniamidiesteri, kloorimaleiinihappoanhydridi, maleiinihappoatsidi, 3-bromipropeeni ja allyyli-isotiosyanaatti. Tällaiset yhdisteet pystyvät reagoimaan isomeraasin vapaiden aminoryhmien, esim. lysiiniosien epsilonaminoryhmän kanssa.

Ammattimiehelle on selvää, että voidaan käyttää muitakin yhdisteitä, jotka pystyvät reagoimaan isomeraasin vapaiden karboksyylihapporyhmien kanssa ja siten substituomaan helposti polymeroituvia vinyyliryhmiä isomeraasiin.

Esimerkkejä vinyyliyhdisteistä, jotka voidaan sekapolymeroida modifioidun isomeraasin kanssa, ovat natriumakrylaatti, natriummetakrylaatti, akryyliamidi, hydroksietyyli-
10 metakrylaatti, akryloyylipiperidiini-4-spiro-2'-(1',3'-dioksakryylipentaani), 1-akryloyyli-4-piperidoni ja akryloyylimetoksiamiini. Yleisesti ottaen suositeltavia ovat vesiliukoiset monomeerit tai monomeeriseokset, joilla saadaan vesiliukoisia polymeerejä (mikäli polymerointi tapahtuu ilman silloitusaineita).

15 Monomeeriseokseen lisätään tyypillisesti difunktionaalisia vinyyliyhdisteitä (0,1-5 % monomeerin kokonaispainosta) muodostamaan silloituskohtia, jotka johtavat kolmiulotteiseen polymeeriverkkorakenteeseen. Sopivia yhdisteitä ovat N,N'-metyleenibisakryyliamidi ja
20 etyleeniglykolidimetakrylaatti. Käytettäessä näitä polymeroitu seos muodostaa liukenemattoman geelin ja tällä tavoin isomeraasi immobilisoituu.

Vinyylipolymeroinneissa tavallisesti käytetyt katalyyttisysteemit ovat sopivia, esim. ammoniumpersulfaatti plus natriumbisulfiitti, vetyperoksidi plus
25 ferrosulfaatti, kaliumsulfaatti plus N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini sekä riboflaviini (plus valo).

Vaihtoehtoisesti ei-kovalentti sitoutuminen kolmiulotteiseen polymeerimatriisiin saattaa riittää antamaan isomeraasimolekyylille halutun jäykkyyden ja siten merkittävästi parantamaan lämpöstabilisuutta. Näin voi
30 tapahtua, kun isomeraasi joutuu mekaanisesti sulkeuksiin silloitettuun polymeerigeeliin. Tällaisessa tapauksessa ei ole välttämätöntä modifioida isomeraasi liittämällä
35 siihen vinyyliyhdiste ennen polymerointivaihetta. Geelin

konsentraation on kuitenkin oltava suurempi kuin n.

30 paino-% ennen kuin tapahtuu merkitsevää stabiloitumista ja suositeltavia ovat geelit, joiden konsentraatio on n. 50 %. Tarvitaan monomeerejä, jotka pystyvät muodostamaan polymeerigeelejä, jotka muodostavat elektrostaattisia ja vetysidoksia isomeraasin kanssa ja esimerkkejä tällaisista monomeereistä ovat esim. natriumakrylaatti, natriummetakrylaatti, akryyliamidi ja hydroksietyyli-

10 Esimerkkejä stabiloinnista, joka aikaansaadaan geeleihin kiinteästi liittämisen avulla, ovat esittäneet Martinek et al., Biochem. Biophys. Acta 485, 13-28 (1977) ja Kulys et al., J. Solid Phase Biochem., 3, 95-105 (1978).

15 Kolmas menetelmä isomeraasin jäykistämiseksi on molekyylin sisäinen silloitus, joka pystyy parantamaan lämpöstabiilisuutta.

20 Esimerkkejä tällaisesta stabiloinnista ovat käsitelleet Torchilin et al., Biochem. Biophys. Acta 522, 277-283 (1978), Martinek et al., J. Solid Phase Biochem., 2, 343-385 (1977) ja Torchilin et al., Biochem. Biophys. Acta 568, 1-10 (1979).

25 Käsiteltävänä olevassa keksinnössä käyttökelpoisia silloitusaineita ovat difunktionaaliset yhdisteet, jotka pystyvät reagoimaan entsyymimolekyylin vastaavien funktionaalisten ryhmien kanssa. Tavallisimmin tällaiset funktionaaliset ryhmät ovat aminoryhmiä, yleensä primaarisia aminoryhmiä, jotka pystyvät reagoimaan mitä erilaisimpien funktionaalisten ryhmien kuten karboksyylihapon, sulfonyylihalogenidin, aldehydien, isosyanaattien, propiolaattien ja vastaavien kanssa.

30 Siten silloitusaineita ovat dikarboksyylihapoanhydridit kuten suksiinianhydridi ja adipiinihapoanhydridi, vastaavat dialdehydit kuten glyoksaali, 35 suksiinialdehydi ja glutaraldehydi, tyydyttymättömät

yhdisteet kuten akroleiini ja krotonaldehydi, dioli-
propiolaatit kuten etyleeniglykolibispropiolaatti,
propyleeniglykolibispropiolaatti ja heksametyleni-
glykolibispropiolaatti sekä disulfonyylihalogenidit
5 kuten bentseeni-1,3-disulfonyylikloridi, naftaleeni-
1,5-disulfonyylikloridi ja tolyyli-2,4-disulfonyyli-
kloridi.

Lisäksi, koska entsyymi sisältää amiinien kanssa
reaktiokykyisiä happoryhmiä tai voidaan saattaa sisäl-
10 tää tällaisia ryhmiä, myös difunktionaalisia amiineja
voidaan käsiteltävänä olevassa keksinnössä käyttää
silloitusaineina. Näihin kuuluvat esim. 12 saakka hiili-
atomeja sisältävät diamiinit, esim. fenyleenidiamiini,
butyleenidiamiini, heksyleenidiamiini, oktyleenidiamiini,
15 pentyleenidiamiini, etyleenidiamiini ja dodekyleenidi-
amiini.

Silloitusaineen määrä voi vaihdella suuresti ja
entsyymin ja silloitusaineen suhde voi vaihdella alueel-
la n. 0,1 - n. 0,0001. Menetelmä tarvittavan liittämisen
20 suorittamiseksi voidaan jossain määrin valita valitun
silloitusaineen ja entsyymin luonteen perusteella.
Yleensä reagenssit liuotetaan sopivaan inerttiin liuotin-
väliaineeseen ja reaktion annetaan tapahtua kohtalaisen
matalassa lämpötilassa, koska korkea lämpötila saattaa
25 vahingoittaa entsyymiä. Tavallisesti reaktio tapahtuu
suositeltavasti huoneenlämpötilassa tai lähellä sitä ja
reaktioväliaineena käytetään vettä tai vesipitoisia
liuottimia.

Sen lisäksi, että substituoidaan polymeroituvia
30 vinyyliryhmiä entsyymimolekyyliin ja sitten polymeroidaan
aikaisemmin kuvattujen menetelmien avulla, toisessa to-
teuttamismuodossa kondensoidaan esimuodostettu polymeeri
isomeraasilla molekyylin sisäisesti muodostuvien
kovalenttisisidosten avulla, jolloin muodostuu stabiloitu
35 molekyyli. Esim. polypeptidien kuten luonnossa esiintyvien

proteiinien ja niiden hydrolyysituotteiden voidaan antaa reagoida tunnetuin menetelmin peptidisidoksen muodostamiseksi glukoosi-isomeraasin kanssa, jolloin muodostuu stabiloitu entsyymi. Näin muodostuneet tuotteet voivat
5 olla vesiliukoisia, mutta ne voidaan tehdä veteen liukenemattomiksi silloitusaineilla kuten glutaraldehydillä ja tavallisesti muodostunut silloitettu entsyymisysteemi on jopa alkuperäistä stabiilimpi. Peptidin muodostusreaktiot suoritetaan tunnetuin menetelmin esim. käyttämällä
10 karbodi-imidejä.

Haluttaessa alkuperäisestä entsyymistä voidaan muodostaa johdannainen, jolloin se antaa molekyylille halutun funktionaalisuuden esimuodostetun molekyylin kanssa tapahtuvaa kondensaatiota varten. Niinpä karboksifunktionaalisuuden saavuttamiseksi voidaan antaa vapaan aminoryhmän omaavan entsyymin reagoida dikarboksyylihapon kanssa, jolloin saadaan karboksipitoinen entsyymi.

Yllä kuvatussa toteuttamismuodossa voidaan esimuodostettuna polymeerinä käyttää jokaista polymeeriä, joka sisältää tarvittavan tyyppisiä funktionaalisia ryhmiä tarvittavana määränä ko. reaktioita varten esimerkiksi amino ja karboksi. Suositeltavia ovat polypeptidit kuten luonnonproteiinit, esim. kitosaani, hiivaproteiini jne. ja niiden seokset sekä aminopitoiset polymeerit
20 kuten polyetyleenimiini. Suositeltava esimuodostettu polymeeri muodostaa tavallisesti vesiliukoisia tuotteita ja on suositeltavaa tehdä nämä tuotteet liukenemattomiksi antamalla reagoida silloitusaineiden kuten glutaraldehydin ja muiden aikaisemmin kuvattujen kanssa.

30 Kaikissa yllä kuvatuissa menetelmissä entsyymin modifioimiseksi on välttämätöntä varmistautua siitä, että kemiallinen funktionaalisuus, esim. amino- tai karboksiryhmien muodossa, on riittävä halutun tuloksen merkittävässä määrin saavuttamiseksi.

35 Kun esim. valitaan esimuodostettu polymeeri reagoimaan entsyymin kanssa, polymeeriin on sisällytettävä

ryhmiä, jotka pystyvät reagoimaan entsyymimolekyyllis-
sä tarjolla olevien ryhmien kanssa. Niinpä on valittava
karboksiryhmiä sisältävä proteiini reagoimaan karboksi-
ryhmiä sisältävän entsyymin kanssa. Lisäksi valituissa
5 reaktanteissa on oltava kohtuullinen määrä reaktiivisia
ryhmiä reaktanttien monipistekiinnittymisen varmistami-
seksi, jolloin stabiloitumista tapahtuu merkitsevässä
määrin. Tekniikan tasolla tunnetaan tietenkin tavat tällais-
ten reaktiivisten ryhmien luonteen ja määrän määrittä-
10 miseksi kullekin reagenssille.

Lisäksi on tarjolla menetelmä entsyymien lämpö-
stabiilisuuden parantamiseksi, jossa muutetaan pinnan
rakennetta kemiallisesti aiheuttamatta merkittävää aktii-
visuushukkaa. Niinpä pinnan aminoryhmät voidaan amidinoida
15 (Ludwig, M. L. ja Hunter, M. J., Meth. Enzymol. 11,
595-604 (1967)) tai guanidinoida (Kimmel, J. R., Meth.
Enzymol. 11, 584-589 (1967)) muodostamaan arginiinia
läheisesti muistuttavia substituentteja. On stabiloitu
maitohappodehydrogenaasia ja useita muita proteiineja
20 (ks. Tuengler, F. ja Pfleiderer, G., Biochem. Biophys.
Acta 284, 1-8 (1977); Minotani, N. et al., Biochem.
Biophys. Acta 581, 334-341 (1979) ja Cupo, P. et al.,
J. Biol. Chem., 255, 10828-10833 (1980)).

Liukoisen isomeraasivalmisteen aktiivisuus määri-
25 tettiin Lloyd et al., Cereal Chemistry, 49, n:o 5,
s. 544-553 (1972) kuvaamalla tavalla. Yksi ICIU on
isomeraasimäärä, joka muuttaa 1 mikromoolin glukoosia
fruktoosiksi minuutissa liuoksessa, jossa on 2 mol/l
glukoosia, 0,02 mol/l $MgSO_4$ ja 0,001 mol/l $CoCl_2$
30 pH:ssa 6,85 (0,2-m natriummaleaatti) lämpötilassa
60°C määritettynä yllä mainitun menetelmän avulla.

Seuraavat esimerkit luovat lisävalaistusta tämän
keksinnön menetelmään.

Esimerkki 1

Tässä esimerkissä demonstroidaan glukoosipitoisen, pääasiassa puhdistetusta maissitärkkelyshydrolysaatista muodostuvan liuoksen suoraa isomerointia seoksen saamiseksi, joka sisälsi 55,5 % fruktoosia kuivapainosta laskettuna käyttämällä kaksivaiheista isomerointimenetelmää. Ensin suoritettiin matalalämpötilaisomerointi 70°C:ssa ja sitten tästä reaktiosta saatu tuote käytettiin syöteenä toiseen reaktoriin, jossa suoritettiin korkealämpötilaisomerointi (105,2°C) ja joka sisälsi kemiallisesti stabiloitua isomeraasia. Kemiallisesti stabiloituna isomeraasina käytettiin isomeraasia, jossa entsyymi oli kovalenttisesti sidottu liukoiseen polymeeriin, joka tehtiin liukenemattomaksi ja saatiin immobilisoitu katalyytti.

Hydrolysaatti valmistettiin maissitärkkelyksestä US-patentissa 3 644 126 (liuotus) ja US-patentissa 3 280 006 (sokerointi) kuvattujen menetelmien mukaan. Sokeroitu liuos puhdistettiin US-patentin 3,834,940 mukaan ja saatiin tuote, joka sisälsi 95,3 % glukoosia kuivapainosta laskettuna. Lisättiin niin paljon kiteistä glukoosia, että kokonaisglukoosipitoisuudeksi tuli 97,6 % kuivapainosta laskettuna. Muodostuneen liuoksen koostumus oli:

	kokonaiskuiva-ainepitoisuus (%)	50,2
25	glukoosia (% kuivapainosta)	97,5
	fruktoosia (% kuivapainosta)	0,0
	polysakkarideja (% kuivapainosta)	2,4
	psikoosia (% kuivapainosta)	0,0
	NaHSO ₃ (millimoolia)	50,0
30	MgSO ₄ (millimoolia)	5,0
	CoCl ₂ (millimoolia)	0,1
	pH	6,8

Matalalämpötilaisomerointi suoritettiin 70°C:ssa pumpaamalla yllä kuvattua substraattiliuosta matalalämpötilareaktorin läpi virtausnopeudella 3,2 ml/min.

Matalassa lämpötilassa (70°C) toimiva isomeraasireaktori konstruointiin pakkaamalla isomeraasia, joka oli immobilisoitu DEAE-selluloosalle (valmistettu US-patentin 3,788,945 mukaan), halkaisijaltaan 2,54 cm (1")

5 olevaan lasikolonniin, joka oli varustettu syötöllä ja poistolla ja vaipalla veden kierrättämiseksi termostaattista. Pakkauksen päällä olevassa tilassa oli lämpömittari ja loput tästä tilasta oli täytetty lasihelmillä kuolluttilavuuden saamiseksi mahdollisimman pieneksi. Reaktori
10 sisälsi riittävästi immobilisoitua isomeraasia 20 000 IGIU:n saavuttamiseksi. Pakatun kerroksen pituus oli n. 15 cm. Reaktorista ensiksi poistunut 1000 ml hylättiin. Tämän jälkeinen poistovirtaus otettiin talteen käytettäväksi seuraavassa korkealämpötilaisomeroinnissa.

15 Korkealämpötilareaktorissa käytetty kemiallisesti stabiloitu katalyytti valmistettiin seuraavasti.

Streptomyces rubigenosus ATCC 21175:stä johdettua rubigenosus-lajia viljeltiin pinnanalaisena aerobisena fermentointina elatusalustalla, jonka koostumus oli:

20		<u>Paino-%</u>
	dekstroosia	9,0
	maissin liotusvettä (kiintoainesta)	1,6
	diammoniumfosfaattia	0,08
	mangaanisulfaattia	0,06
25	vaahdonestoainetta (Pluronic PL-61)	0,003

Elatusalusta steriloidtiin 121°C :ssa 45 minuuttia, jäähdytettiin ja pH säädettiin arvoon 6,8-7,0. Alusta siirrostettiin 14 tilavuus-%:sella siirroksella, joka oli siirrosfermenttorin sisältö, joka on tehty yllä mainitun
30 S. rubigenosus-variantin avulla. Fermentointi suoritettiin aseptisissä olosuhteissa 30°C :ssa n. 60 tuntia ilmastaen 0,65 vvm. Siirrostuksessa ja isomeraasin tuottamisessa voidaan myös käyttää S. rubigenosus ATCC 21175:tä, jolloin elatusalustan koostumus on seuraava:

	<u>Paino-%</u>
dekstroosia	0,24
maissin liotusvettä (kiintoainesta)	1,5
sorbitolia	1,6
5 koboltti(II)kloridia	0,02
diammoniumfosfaattia	0,56
ksyloosia	1,0

Glukoosi-isomeraasi uutettiin *S. rubigenosuksesta* lisäämällä 0,35 % Maquat MC 1412:ta (Mason Chemical Co.) ja 10 ppm kananmunalysotsyymiä ja ravistelemalla viisi tuntia 40°C:ssa pH:ssa 6,3-6,6. Sitten seos suodatettiin ja saatiin epäpuhtaan, puhdistamattoman glukoosi-isomeraasin liuos.

Epäpuhtas isomeraasi puhdistettiin adsorboimalla se 15 DEAE-selluloosaan (valmistettu US 3,823,133 mukaan), suodattamalla, pesemällä adsorboitunut tuote 0,1-m NaCl-liuoksella epäpuhtauksien poistamiseksi ja desorboimalla sitten isomeraasi saattamalla se kosketukseen 0,45-m NaCl-liuoksen kanssa. Puhdistusvaiheiden 20 aikana kaikkien liuosten pH pidettiin arvossa 7,5. Sekoitettiin näin saadun osittain puhdistetun isomeraasin liuosta ja 3 tilavuutta 95 %:ista etanolia 0°C:ssa isomeraasin saostamiseksi. Lisättiin Perlite-suodatusapuaainetta, kiintoaines poistettiin suodattamalla, kuivatettiin ilmassa ja saatiin liukoinen isomeraasipreparaatti, joka sisälsi 25 2500 IGIU/g.

Puhdistettu isomeraasi liuotettiin 1 mmol MnCl_2 -liuokseen ja saatiin liuos, joka sisälsi 10 mg/ml isomeraasia huoneenlämpötilassa, ja seos suodatettiin suodatus- 30 apuaineen poistamiseksi. Tämän preparaatin ominaisaktiivisuus oli 37,3 IGIU/mg proteiinia.

Saatiin liukoisen polyamiinipolymeerin liuos liuottamalla 39,0 g kitosania (Kytex, valmistaja Hercules Inc., Wilmington, Delaware 19899) 13 litraan 0,08-n HCl:ää. 35 Liukenemisen jälkeen kitosaaniliuos tehtiin 0,5 mooliseksi

NaCl:n suhteen lisäämällä 380 g NaCl:ää ja muodostuneen liuoksen pH säädettiin arvoon 6,15 8-n NaOH-liuoksella. Lopuksi kitosaaniliuos suodatettiin Whatman n:o 3 suodatinpaperin läpi liukenematta jääneen aineksen poistamiseksi. Tähän 13 litraan, jossa oli 0,3 % kitosaania 0,5 moolisena NaCl-liuoksensa pH:ssa 6,15, lisättiin seuraavat aineosat: 100 ml liukoista isomeraasia, jonka aktiivisuus oli 100 000 IGIU:ta, 197,6 g ksylitolia (Sigma Chemical Co.) ja 0,619 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:ta. Tätä liuosta sekoitettiin kaksi tuntia ja sitten lisättiin 6,24 g 1-etyyli-3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidiä (Sigma Chemical Co.) sitomaan kovalentisti monesta kohdasta isomeraasin karboksyyli-ryhmät kitosaanin amino-ryhmiin. Kahden tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa reaktioseokseen lisättiin 15,6 ml 50 paino-%:ista glutaraldehydiliuosta (Eastman Kodak), jonka pH oli säädetty arvoon 6,0 8-n NaOH-liuoksella, kovalentisti sitoutuneen isomeraasi-kitosaanikompleksin tekemiseksi liukenemattomaksi. Viidentoista minuutin kuluttua lisättiin 2 litraa 1-m fosfaattiliuosta pH:ssa 8,0 glutaraldehydin lisäämisen jälkeen muodostuneen geelin rikkomiseksi. Muodostunut liukenemattomaksi tehty isomeraasi-kitosaani pestiin deionisoidulla vedellä sen ollessa Büchnerimusuppilossa. Sitten tämän preparaatin annettiin kuivua ilmassa yli yön huoneenlämpötilassa, jauhettiin ja seulottiin 12-16 meshiin. Kuivan katalyytin aktiivisuudeksi on ilmoitettu 384 IGIU/g.

105,2°C:ssa toimiva reaktori preparoitiin seuraavasti. 13 g:n osa katalyytistä suspendoitiin substraattiin ja ilma poistettiin laboratoriovakuumissa huoneenlämpötilassa 60 minuuttia. Suspensiolla, josta ilma oli poistettu, preparoitiin kerros 1,5 x 20 cm vaipitetussa lasikolonissa. Pakattu kerros sisälsi 4992 IGIU:ta.

Ensimmäisessä vaiheessa eli 70°C:n isomeroinnissa valmistetun substraatin pH säädettiin arvoon 6,75 ja laimennettiin kuiva-ainepitoisuuteen 42,0 %. Sitten tämä

- substraatti pumpattiin korkealämpötilareaktorikolonnin läpi ylipaineessa $0,7 \text{ kg/cm}^2$ ja virtausnopeudella $1,96 \text{ ml/min}$ 60°C :ssa 30 minuuttia. Lämpötilaa kolonnissa tarkkailtiin välittömästi kerroksen yläpuolella olevalla
- 5 lämpömittarilla, jonka ympärillä oli $0,5 \text{ mm}$ lasihelmiä kuolluttilavuuden pitämiseksi mahdollisimman pienenä. Sitten kolonnin lämpötila nostettiin nopeasti kierrättämällä vaipan kautta öljyä termostaatista, jonka lämpötila oli 106°C .
- 10 Poistovirtausta kolonnista tarkkailtiin rekisteröivällä polarimetrillä, joka oli kalibroitu alueelle $50\text{--}58 \%$ fruktoosia. Kun kolonnin lämpötila oli saavuttanut $105,2^\circ\text{C}$ ja poistovirtauksen fruktoosipitoisuus oli saavuttanut halutun tason, poistovirtaus otettiin
- 15 talteen ja jäädytettiin välittömästi jäähauteessa. pH säädettiin arvoon $4,90$ lisäämällä 1-m sitruunahappoa. Poistovirtaus otettiin talteen, kunne polarimetrin osoittama fruktoosipitoisuus laski alle 55% .
- 20 70°C :ssa ja $105,2^\circ\text{C}$:ssa toimivista reaktoreista saaduista isomeroидуista liuoksista analysoitiin hiilihydraattikoostumus ja väri ja tuloksia verrattiin seuraavasta taulukosta ilmenevällä tavalla isomeroimattoman substraattiliuoksen vastaaviin analyysituloksiin.

Taulukko 1

70°C:ssa ja 105,2°C:ssa isomeroitujen substraattiliuosten koostumus

<u>Liuoksen käsittely</u>	<u>Hiilihydraattikoostumus</u> (paino-% tuhkatommasta kuiva-aineesta)			<u>Väri</u> (CIRF X 100)
	<u>Fruktoosi</u>	<u>Glukoosi</u>	<u>Psikoosi</u> <u>Polysakkar.</u>	
isomeroimaton	0	97,6	0	2,4
isomeroitu 70°C:ssa	51,3	46,4	0	2,3
isomeroitu 105,2°C:ssa	55,5	41,6	0,3	2,6
				14,1

Tulokset osoittavat, että saatiin 55,5 % fruktoosia kuivapainosta, psikoosipitoisuus jäi alle 0,4 % kuivapainosta ja väri oli alle 20 (CIRFx100).

Esimerkki 2

- 5 Tässä esimerkissä kuvataan glukoosipitoisen liuoksen (joka muodostui puhdistetusta maissitärkkelyshydrolysaatista plus kiteisestä glukoosista) suoraa isomerointia korkeassa lämpötilassa seoksen saamiseksi, joka sisälsi
- 10 55,2 % fruktoosia kuivapainosta laskettuna, jolloin käytettiin kaksivaiheisomerointia, jonka toisessa vaiheessa käytettiin kemiallisesti stabiloitua isomeraasia, jossa glukoosi-isomeraasi oli kompleksoitu polyetyleenimiinillä. Kompleksi oli tehty liukenemattomaksi käsittelemällä glutaraldehydillä.
- 15 Valmistettiin liukoinen glukoosi-isomeraasi esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Puhdistettu isomeraasi liuotettiin 1 mmol MnCl_2 -liuokseen ja saatiin liuos, jossa oli 9 mg/ml isomeraasia huoneenlämpötilassa. Seos suodatettiin suodatusapuaaineen poistamiseksi. 300 ml:aan
- 20 entsyymiliuosta lisättiin 60 ml 10 p/t-%:istä PEI-6:tta (polyetyleenimiini, mp. 600, pH 8) Dow Chemical Co.) ja 3 g ksylitolia ja muodostunutta liuosta sekoitettiin 15 minuuttia. Lisättiin 10 ml 2,5-m glutaraldehydiliuosta ja seosta sekoitettiin kaksi tuntia huoneenlämpötilassa.
- 25 Liukenemattomaksi tehty entsyymi otettiin talteen suodattamalla, pestiin vedellä ja kuivattiin yli yön konvektiolämpökaapissa 37°C :ssa. Kuivauksen jälkeen saatiin 12,8 g immobilisoitua isomeraasia, joka sisälsi n. 775 IGIU/g. Suspendoitiin 12 g immobilisoitua entsyymiä
- 30 substraattiin, ilma poistettiin vakuumissa 60 minuuttia huoneenlämpötilassa ja käytettiin halkaisijaltaan 1,5 cm olevan korkealämpötilareaktorin preparoimiseksi.

Substraatti valmistettiin kuten esimerkissä 1 kuvatun kaksivaiheisomeroinnin ensimmäisessä vaiheessa. Tämän substraatin koostumus oli:

	kokonaiskuiva-ainepitoisuus (%)	42,6
5	glukoosia (% kuivapainosta)	46,4
	fruktoosia (% kuivapainosta)	51,3
	polysakkarideja (% kuivapainosta)	2,3
	psikoosia (% kuivapainosta)	0,0
	NaHSO ₃ (millimoolia)	0
10	MgSO ₄ (millimoolia)	50
	CoCl ₂ (millimoolia)	0,1
	pH	6,75

Substraatti pumpattiin reaktorin läpi 45 minuuttia 60°C:ssa virtausnopeudella n. 5 ml/min. Sitten kolon-
 15 nin lämpötila nostettiin 101,6°C:seen ja virtausnopeus pienennettiin arvoon 2 ml/min. Kolonniin kohdistettiin vastapaine 0,84 kg/cm² substraatin kiehumisen estämiseksi. Poistoulosvirtausta tarkkailtiin rekisteröivällä polarimetrillä, joka oli kalibroitu alueelle 50-58 %
 20 fruktoosia. Poistovirtaus, jonka fruktoosipitoisuus ylitti 55 %, otettiin talteen jäähauteeseen ja pH säädettiin arvoon 4,0 1,0-m sitruunahapolla.

Korkealämpötilareaktorin poistovirtauksesta, ensimmäisen vaiheen reaktorin substraatista ja ensimmäisen vaiheen reaktorissa substraattina käytetystä alkuperäisestä glukoosipitoisesta liuoksesta analysoitiin
 25 hiilihydraattikoostumus ja väri. Seuraavassa taulukossa on yhteenveto tuloksista.

Taulukko 2

Ensimmäisen ja toisen vaiheen isomeroinneista saatujen liuosten koostumus

<u>Liuoksen käsittely</u>	Hiilihydraattikoostumus			Väri (CERF x 100)
	(paino-% Fruktoosi	tuhkattomasta Glukoosi	kuiva-aineesta) Psikoosi	
			<u>Polysakkar.</u>	
isomeroimaton	0	97,6	0	2,4
isomeroitu 70°C:ssa	51,3	46,4	0	2,3
isomeroitus 101,6 ^o :ssa	55,2	42,1	0	2,7
				0,5
				0,7
				51,7

Tulokset osoittavat, että saatiin 55,2 % fruktoosia kuivapainosta ja psikoosipitoisuus jäi alle 0,2 % kuivapainosta.

Esimerkki 3

5 Tässä esimerkissä demonstroidaan glukoosin suora isomerointi 57,2 %:iksi fruktoosia kaksivaiheisessa isomerointiprosessissa, jossa ensimmäinen reaktori toimi 70°C:ssa ja toinen (korkealämpötila) reaktori 10 110,4°C:ssa. Korkealämpötilareaktiossa käytettiin kemiallisesti stabiloitua isomeraasia, jossa entsyymi oli kovalenttisesti sidottu liukenevaan polymeeriin ja sitten tehty liukenemattomaksi immobilisoidun katalyytin muodostamiseksi.

15 Substraatti ja sen konversio ensimmäisen vaiheen reaktorissa 70°C:ssa on kuvattu esimerkissä 1.

Korkealämpötilareaktorissa 110,4°C:ssa käytetty immobilisoitu katalyytti on myös kuvattu esimerkissä 1.

20 110,4°C:ssa toimiva reaktori preparoitiin seuraavasti. 28,4 g:n osa katalyytistä suspendoitiin substraattiin ja ilma poistettiin laboratoriovakuumissa huoneenlämpötilassa 60 minuuttia. Suspensiolla, josta ilma oli poistettu, preparoitiin 2,5 x 12,4 cm vaipoitettussa lasikolonnissa. Pakattu kerros sisälsi 10 885 IGIU:ta.

25 Ensimmäisessä vaiheessa eli 70°C:n isomeroinnissa valmistetun substraatin pH säädettiin arvoon 6,47 ja laimennettiin kuiva-ainepitoisuuteen 42,0 %. Sitten tämä substraatti pumpattiin korkealämpötilareaktorikolonnin läpi paineessa 0,84 kg/cm² ja virtausnopeudella 3,38 ml/min. 30 60°C:ssa 30 minuuttia. Lämpötilaa kolonnissa tarkkailtiin välittömästi kerroksen yläpuolella olevalla lämpömittarilla, jonka ympärillä oli 0,3 mm lasihelmiä kuolluttilavuuden pitämiseksi mahdollisimman pienenä. Sitten kolonnin lämpötila nostettiin nopeasti kierrättämällä vaipan kautta öljyä termostaatista, jonka lämpötila oli 111°C.

Ulosvirtausta kolonnissa tarkkailtiin rekisteröivällä polarimetrillä, joka oli kalibroitu alueelle 50-58 % fruktoosia. Kun kolonnin lämpötila oli saavuttanut $110,4^{\circ}\text{C}$ ja poistovirtauksen fruktoosipitoisuus oli saavuttanut halutun tason, poistovirtaus otettiin talteen ja jäähdytettiin välittömästi jäähauteessa. pH säädettiin arvoon 4,0 lisäämällä 1-m sitruunahappoa.

70°C :ssa ja $110,4^{\circ}\text{C}$:ssa toimivista reaktoreista saaduista isomeroiduista liuoksista analysoitiin hiilihydraattikoostumus ja väri ja tuloksia verrattiin seuraavasta taulukosta ilmenevällä tavalla isomeroimattoman substraattiliuoksen vastaaviin analyysituloksiin.

Taulukko 3

70°C:ssa ja 110,4°C:ssa isomeroitujen substraattiliuosten koostumus

<u>Liuksen käsittely</u>	<u>Hiilihydraattikoostumus</u> (paino-% tuhkattomasta kuiva-aineesta)			<u>Väri</u> (CIRF x 100)
	<u>Fruktoosi</u>	<u>Glukoosi</u>	<u>Psikoosi</u> <u>Polysakkar.</u>	
isomeroimaton	0	99,2	0	0,8
isomeroitu 70°C:ssa	52,3	46,9	0	0,8
isomeroitu 110,4°C:ssa	57,2	41,5	0,3	1,0
				19,8

Tulokset osoittavat, että saatiin 57,2 % fruktoosia kuivapainosta, psikoosipitoisuus jäi alle 0,4 % kuivapainosta ja väri (CIRF x 100) oli alle 20.

Esimerkki 4

5 Tässä esimerkissä demonstroidaan glukoosipitoisen, pääasiassa puhdistetusta maissitärkkelyshydrolysaatista muodostavan liuoksen suoraa isomerointia seoksen saamiseksi, joka sisälsi 56,3 % fruktoosia kuivapainosta laskettuna käyttämällä kaksivaiheista isomerointimenetelmää. Ensin suoritettiin matalalämpötilaisomerointi 10 70°C:ssa ja sitten tästä reaktiosta saatu tuote käytettiin syötteenä toiseen reaktoriin, jossa suoritettiin korkealämpötilaisomerointi (103,3°C) ja joka sisälsi kemiallisesti stabiloitua isomeraasia. Kemiallisesti 15 stabiloituna isomeraasina käytettiin isomeraasia, jossa entsyymien on annettu koreagoida suojaproteiinin (esim. hiivasta saadun proteiinin) kanssa.

Matalalämpötilaisomerointivaihe ja substraatin ja koeolosuhteiden kuvaus ilmenevät esimerkissä 1.

20 Korkealämpötilareaktorissa käytetty kemiallisesti stabiloitu glukoosi-isomeraasi valmistettiin seuraavasti. Liukoinen glukoosi-isomeraasi kemiallista stabilointia varten valmistettiin ja puhdistettiin esimerkissä 1 kuvattun menetelmän avulla. Tämän preparaatin ominaisaktiivisuus oli n. 40 IGIU/mg proteiinia. Suojaproteiini saatiin 25 leipomohiivasta seuraavasti. Kostean leipomohiivamassaan, joka painoi 1229 g, lisättiin 1000 g vettä ja 500 g tolueenia. Seosta sekoitettiin yli yön huoneenlämpötilassa, kuumennettiin sitten 85°C:een ja pidettiin tässä 30 lämpötilassa n. 30 minuuttia. Seos suodatettiin Büchner-supilon läpi. Tolueeni jäi lähes kokonaan solujätteeseen ja vesisuodos sisälsi hiivauutteen. Vesisuodoksen tilavuus pienennettiin 276 g:ksi (kiertohaihdutin, 40°C) ja sitten lisättiin sekoittaen 41 g trikloorietikkahappoa. 35 Saostunut hiivaproteiini eristettiin ja liuotettiin uudelleen 0,1-m natriumfosfaattipuskuriin (pH 7,0). Kun oli selkeytetty suodattamalla, liuosta käsiteltiin 900 ml:lla

(n. 3 tilavuutta) asetonia. Sakka eristettiin, liuotettiin 0,01-m natriumfosfaattipuskuriin (pH 7,0) ja muodostunut liuos dialysoitiin 0,01-m natriumfosfaattipuskuria vastaan. Muodostunutta tuotetta (150 ml) kutsuttiin leipomohiivasta saaduksi suojaproteiiniksi. Valmistettiin 5 0,6 %:inen kitosaaniliuos liuottamalla 24 g kitosaania (Kytex, valmistaja Hercules Inc., Wilmington, Delaware) 4 litraan 08,08-n HCl:ää. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,2 8-n NaOH-liuoksella, suodatettiin Whatman n:o 3 10 suodatinpaperin läpi ja dialysoitiin sitten 16 litraa vastaan deionisoitua vettä. 400 ml dekanterilasiin lisättiin n. 100 000 IGIU:ta liukoista glukoosi-isomeraasientsyymiä (johon oli sekoitettu suodatusapuainetta), 1 g ksylitolia ja 100 ml (2/3) leipomohiivasta saatua 15 suojaproteiinia. Tähän seokseen lisättiin 2,4 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:ta ja 24 mikrolitraa 1-m kobolttikloridiliuosta. Seos suodatettiin suodatusapuaineen poistamiseksi ja sitten seos haihdutettiin lähes kuiviin (kiertohaihdutin, n. 40°C) 2 litran pyöreäpohjaisessa kolvissa. Sitten kolviin lisättiin 20 300 ml kitosaaniliuosta (pH 6,2). Sitten seos haihdutettiin lähes kuiviin (kiertohaihdutin, n. 40°C) ja lisättiin 640 mikrolitraa 50 %:ista glutaraldehydiliuosta (pH säädetty arvoon 6,5). Seosta pidettiin kylmähuoneessa yli yön. Sitten geeli poistettiin kolvista ja puristettiin 25 US n:o 30 meshin seulan läpi ja kuivattiin lämpökaapissa n. 37°C:ssa. Kuivattu entsyymipreparaatti seulottiin hienoaineksen poistamiseksi (US n:o 80 meshin seula) ja käytettiin sitten (8,9 g lopullisesta tuotteesta) korkealämpötilaisomeroinnissa.

30 103,3°C:ssa toimiva reaktori preparoitiin seuraavasti. Yllä saatu glukoosi-isomeraasipreparaatti (8,9 g) suspendoitiin substraattiin ja ilma poistettiin laboratoriovakuumissa huoneenlämpötilassa n. 30 minuuttia. Suspensiolla, josta ilma oli poistettu, preparoitiin 35 kerros 1,5 x 29 cm vaipoitettussa lasikolonniassa.

Ensimmäisessä vaiheessa eli 70°C:n isomeroinnissa valmistetun substraatin pH säädettiin arvoon 6,75 ja laimennettiin kuiva-ainepitoisuuteen 42,0 %. Sitten tämä substraatti pumpattiin korkealämpötilareaktorikolonniin läpi virtausnopeudella n. 1,5 ml/min lämpötilassa 60°C 30 minuuttia. Lämpötilaa kolonnissa tarkkailtiin välittömästi kerroksen yläpuolella olevalla lämpömittarilla, jonka ympärillä oli lasihelmiä (halkaisija 0,5 mm) kuolluttilavuuden pitämiseksi mahdollisimman pienenä. Sitten kolonnin lämpötila nostettiin nopeasti kierrättämällä vaipan kautta öljyä termostaatista, jonka lämpötila oli 104°C.

Poistovirtausta kolonnista tarkkailtiin rekisteröivällä polarimetrillä, joka oli kalibroitu alueelle 50-58 % fruktoosia. Kerättiin n. 5 ml:n fraktioita, kunnes muodostunut fruktoosipitoisuus oli 55 % tai suurempi, jolloin koe lopetettiin. Näytteiden talteenoton aikana poistovirtaus jäähdytettiin välittömästi jäähauteessa ja pH säädettiin arvoon n. 4,0 lisäämällä 0,1 ml 1-m sitruunahappoa ja sitten laimeaa HCl:ää.

70°C:ssa ja 103,3°C:ssa toimivista reaktoreista saaduista isomeroiduista liuoksista analysoitiin hiilihydraattikoostumus ja väri. Tuloksia verrattiin seuraavasta taulukosta ilmenevällä tavalla isomeroimattoman substraattiliuoksen vastaaviin analyysituloksiin.

Taulukko 4

70°C:ssa ja 103,3°C:ssa isomeroitujen substraattiliuosten koostumus

<u>Liuksen käsittely</u>	<u>Hiilihydraattikoostumus</u> (paino-% tuhkatommasta kuiva-aineesta)				<u>Väri</u> (CIFR x 100)
	<u>Fruktoosi</u>	<u>Glukoosi</u>	<u>Psikoosi</u>	<u>Polysakkar.</u>	
isomeroimaton	0	97,6	0	2,4	0,5
isomeroitu 70°C:ssa	51,3	46,4	0	2,3	0,7
isomeroitu 103,3°C:ssa	56,3	41,5	0,1	2,2	34,0

Tulokset osoittavat, että saatiin 56,3 % fruktoosia kuivapainosta ja psikoosipitoisuus jäi alle 0,2 % kuivapainosta.

Esimerkki 5

5 Tässä esimerkissä demonstroidaan glukoosipitoisen liuoksen, joka pääasiassa muodostui puhdistetusta, pienen suolakonsentraation omaavasta maissitärkkelyshydrolysaatista, suoraa isomerointia seoksen saamiseksi, joka sisälsi 55,4 % fruktoosia kuivapainosta laskettuna käyttämäl-

10 lä kaksivaiheista isomerointimenetelmää. Ensin suoritettiin matalalämpötilaisomerointi 70°C:ssa ja sitten tästä reaktiosta saatu tuote käytettiin syötteenä toiseen reaktoriin, jossa suoritettiin korkealämpötilaisomerointi (112,6°C) ja joka sisälsi kemiallisesti stabiloitua

15 isomeraasia. Kemiallisesti stabiloituna isomeraasina käytettiin isomeraasia, jossa entsyymi on kovalenttisesti sidottu monesta kohdin liukenevaan polymeeriin ja sitten tehty liukenemattomaksi immobilisoidun katalyytin muodostamiseksi.

20 Hydrolysaatti valmistettiin maissitärkkelyksestä US-patentissa 3 644 126 (liuotus) ja US-patentissa 3 280 006 (sokerointi) kuvattujen menetelmien mukaan. Sokeroitu liuos puhdistettiin US-patentin 3 834 940 mukaan ja saatiin tuote, joka sisälsi 93,8 % glukoosia

25 kuivapainosta laskettuna. Lisättiin niin paljon kiteistä glukoosia, että kokonaisglukoosipitoisuudeksi tuli 96,9 % kuivapainosta laskettuna. Muodostuneen liuoksen koostumus oli:

	kokonaiskuiva-ainepitoisuus (%)	50,3
	glukoosia (% kuivapainosta)	96,9
30	fruktoosia (% kuivapainosta)	0,1
	polysakkarideja (% kuivapainosta)	3,1
	psikoosia (% kuivapainosta)	0,0
	NaHSO ₃ (millimoolia)	2,5
	MgSO ₄ (millimoolia)	2,5
35	CoCl ₂ (millimoolia)	0,1
	pH	6,8

Matalalämpötilaisomerointi suoritettiin pumppaamalla yllä kuvattu substraattiliuos esimerkissä 1 kuvatun matalalämpötilareaktorin läpi virtausnopeudella 2,5 ml/min. Reaktorista ensin tulevat 1000 ml hylättiin. Tämän jälkeen poistovirtaus otettiin talteen käytettäväksi toisessa eli korkealämpötilaisomeroinnissa.

Korkealämpötilareaktorissa käytetty kemiallisesti stabiloitu katalyytti valmistettiin seuraavasti. Liukoinen glukoosi-isomeraasi valmistettiin ja puhdistettiin esimerkissä 1 kuvatun menetelmän avulla. Tämän preparaatin ominaisaktiivisuus oli n. 40 IGIU/ml proteiinia. Liukoisen polymeerin eli polyamiinin liuos saatiin liuottamalla 48,4 g kitosaania (Kytex, valmistaja Hercules Inc., Wilmington, Delaware 19899) 15 litraan 0,08-n HCl:ää.

Liukenemisen jälkeen kitosaaniliuos tehtiin 0,5 mooliseksi NaCl:n suhteen lisäämällä 438 g NaCl:ää ja muodostuneen liuoksen pH säädettiin arvoon 6,1 8-n NaOH-liuoksella. Sitten kitosaaniliuos suodatettiin Whatman n:o 3 suodatinpaperin läpi liukenematta jääneen aineksen poistamiseksi. Tähän 15 litraan, jossa oli 0,3 % kitosaania 0,5-m NaCl-liuoksena pH:ssa 6,1, lisättiin seuraavat aineosat: 510 ml liukoista isomeraasia, jonka aktiivisuus oli 602 000 IGIU:ta, 236 g ksylitolia (Sigma Chemical Co.) ja 3,07 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:ta. Tätä liuosta sekoitettiin kaksi tuntia ja sitten lisättiin 7,44 g 1-etyyli-3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidiä (Sigma Chemical Co.) sitomaan kovalentisti monesta kohdasta isomeraasin karboksyyli-ryhmät kitosaanin aminoryhmiin. Kahden tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa reaktioseokseen lisättiin 15,5 ml 50 paino-%:ista glutaraldehydiliuosta (Eastman Kodak Chem. Co.), jonka pH oli säädetty arvoon 6,0 8-n NaOH-liuoksella kovalentisti sitoutuneen isomeraasikitosaanikompleksin tekemiseksi liukenemattomaksi. Viidentoista minuutin kuluttua liukenemattomaan isomeraari-kitosaaniin sekoitettiin 4 litraa 1-m fosfaattiliuosta. Immobilisoitu isomeraasi-kitosaani pestiin deionisoidulla vedellä büchner-imusuppilossa, jossa oli Whatman n:o 3 suodatinpaperi.

Preparaatti kuivattiin ilmassa, jauhettiin ja seulottiin 12-60 meshiin. Kuivan katalyytin aktiivisuudeksi on ilmoitettu 803 IGIU/g.

5 112,6°C:ssa toimiva reaktori preparoitiin seuraavasti. 7,0 g:n osa katalyytistä suspendoitiin substraattiin ja ilma poistettiin laboratoriovakuumissa huoneenlämpötilassa 60 minuuttia. Suspensiolla, josta ilma oli poistettu, preparoitiin kerros 1,0 x 40 cm vaipoitettussa lasikolonniassa. Pakattu kerros sisälsi 5621 IGIU:ta.

10 Ensimmäisessä vaiheessa eli 70°C:n isomeroinnissa valmistetun substraatin pH säädettiin arvoon 6,55 ja laimennettiin deionisoidulla vedellä kuiva-ainepitoisuuteen 42,0 %, mikä myös alensi suolapitoisuutta siten, että NaHSO₃:n arvoksi tuli 2,1 millimoolia ja MgSO₄:n arvoksi 2,1 millimoolia. Sitten tämä substraatti pumpattiin korkealämpötilareaktorin läpi ylipaineessa 0,84 kg/cm² 10 minuuttia virtausnopeudella 8 ml/min lämpötilassa 60°C.

15 Lämpötilaa kolonnissa tarkkailtiin välittömästi kerroksen yläpuolella olevalla lämpömittarilla, jonka ympärillä oli hiekkaa lämpötila-asteikkoon saakka kuolluttilavuuden pitämiseksi mahdollisimman pienenä. Sitten kolonnin lämpötila nostettiin nopeasti kierrättämällä öljyä termostaatista, jonka lämpötila oli n. 114°C. Kolonnin lämpötila nostettiin 112,6°C:seen ja virtausnopeus pienennettiin arvoon

20 1,89 ml/min.

25 Poistovirtausta kolonnista tarkkailtiin rekisteröivällä polarimetrillä, joka oli kalibroitu alueelle 50-58 % fruktoosia. Kun kolonnin lämpötila oli saavuttanut 112,6°C ja poistovirtauksen fruktoosipitoisuus oli saavuttanut halutun tason, poistovirtaus otettiin talteen. pH säädettiin välittömästi arvoon 4,0 lisäämällä 1-m sitruunahappoa.

30 Poistovirtausta otettiin talteen, kunnes polarimetrin osoittama fruktoosipitoisuus laski alle 55 %.

35 70°C:ssa ja 112,6°C:ssa toimivista reaktoreista saaduista isomeroiduista liuoksista analysoitiin hiilihydraattikoostumus ja väri ja tuloksia verrattiin seuraavasta taulukosta ilmenevällä tavalla isomeroimattoma substraattiliuoksen vastaaviin analyysituloksiin.

Taulukko 5

70°C:ssa ja 112,6°C:ssa isomeroitujen substraattiliuosten koostumus

<u>Liuksen käsittely</u>	<u>Hiilihydraattikoostumus</u>				<u>Väri</u> (CIRF x 100)
	<u>Fruktoosi</u>	<u>Glukoosi</u>	<u>Psikoosi</u>	<u>Polysakkar.</u>	
isomeroimaton	0	96,9	0	3,1	0
isomeroitu 70°C:ssa	51,4	45,9	0	2,7	0
isomeroitu 112,6°C:ssa	55,4	42,0	0,1	2,5	8,5

Tulokset osoittavat, että saatiin 55,4 % fruktoosia kuivapainosta, psikoosipitoisuus jäi alle 0,2 % kuivapainosta ja väri oli alle 9 (CIFR x 100).

Esimerkki 6

5 Tässä esimerkissä demonstroidaan glukoosipitoisen liuoksen, joka pääasiassa muodostui puhdistetusta, pienen suolakonsentraation omaavasta maissitärkkelyshydrolysaatista, suoraa isomerointia seoksen saamiseksi, joka sisälsi 54,8 % fruktoosia kuivapainosta laskettuna ja äärimmäisen
10 vähän psikoosia (alle 0,1 %) ja väriä (alle 2 CIFR x 100), käyttämällä kaksivaiheista isomerointimenetelmää. Ensimmäinen (matalalämpötila) reaktori toimi 70°C:ssa ja toinen (korkealämpötila) 105,8°C:ssa. Korkealämpötilareaktorissa käytettiin kemiallisesti stabiloitua isomeraasia, jossa
15 entsyymi on kovalentisti monesta kohdin sidottu liukenemaan polymeeriin ja sitten tehty liukenemattomaksi immobilisoidun katalyytin saamiseksi. Substraatti ja sen konversio ensimmäisen vaiheen reaktorissa 70°C:ssa on kuvattu esimerkissä 5.

20 Korkealämpötilareaktorissa 105,8°C:ssa käytetty immobilisoitu katalyytti on kuvattu esimerkissä 5.

105,8°C:ssa toimiva reaktori preparoitiin seuraavasti, 5,63 g:n osa katalyytistä suspendoitiin substraattiin ja ilma poistettiin laboratoriovakuumissa huoneenlämpötilassa 60 minuuttia. Suspensiolla, josta ilma oli poistettu, preparoitiin kerros 1,0 x 32 cm vaipoitettussa lasikolonissa. Pakattu kerros sisälsi 4521 IGIU:ta.

30 Ensimmäisessä vaiheessa eli 70°C:n isomeroinnissa valmistetun substraatin pH säädettiin arvoon 6,5 ja laimennettiin deionisoidulla vedellä kuiva-ainepitoisuuteen 42,0 %, mikä myös alensi suolapitoisuutta siten, että MgSO₄:n arvoksi tuli 2,1 millimoolia ja NaHSO₃:n arvoksi 2,1 millimoolia. Sitten tämä substraatti pumpattiin korkealämpötilareaktorikolonin läpi ylipaineessa
35 0,7 kg/cm² ja virtausnopeudella 8 ml/min 10 minuuttia

lämpötilassa $60,0^{\circ}\text{C}$. Lämpötilaa kolonnissa tarkkailtiin välittömästi kerroksen yläpuolella olevalla lämpömittarilla, jonka ympärillä oli hiekkaa lämpötila-asteikkoon saakka kuolluttilavuuden pitämiseksi mahdollisimman

5 pienenä. Sitten kolonnin lämpötila nostettiin nopeasti kierrättämällä vaipan kautta öljyä termostaatista, jonka lämpötila oli n. 107°C .

Poistovirtausta kolonnista tarkkailtiin rekisteröivällä polarimetrillä, joka oli kalibroitu alueelle
10 50-58 % fruktoosia. Kun kolonnin lämpötila oli saavuttanut $105,8^{\circ}\text{C}$ ja poistovirtauksen fruktoosipitoisuus oli saavuttanut halutun tason, poistovirtaus otettiin talteen. pH säädettiin välittömästi arvoon 4,90 lisäämällä 1-m sitruunahappoa.

15 70°C :ssa ja $105,8^{\circ}\text{C}$:ssa toimivista reaktoreista saaduista isomeroiduista liuoksista analysoitiin hiilihydraattikoostumus ja väri ja tuloksia verrattiin seuraavassa taulukossa ilmenevällä tavalla isomeroimattoman substraattiliuoksen vastaaviin analyysituloksiin.

Taulukko 6

70°C:ssa ja 105,8°C:ssa isomeroitujen substraattiliuosten koostumus

<u>Liuoksen käsittely</u>	<u>Hiilihydraattikoostumus</u>			<u>Väri</u> (CIFR x 100)
	<u>(paino-% tuhkattonasta kuiva-aineesta)</u>			
	<u>Fruktoosi</u>	<u>Glukoosi</u>	<u>Psikoosi</u> <u>Polysakkar.</u>	
isomeroimaton	< 0,1	96,9	0	3,1
isomeroitu 70°C:ssa	51,4	45,9	0	2,7
isomeroitu 105,8°C:ssa	54,8	42,3	< 0,1	2,8
				1,8

Tulokset osoittavat, että saatiin 54,8 % fruktoosia kuivapainosta, psikoosipitoisuus oli alle 0,1 % kuivapainosta ja väri (CIRF x 100) oli alle 2.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä glukoosin isomeroimiseksi fruktoosiksi, t u n n e t t u siitä, että glukoosipitoinen syöte-
5 liuos, joka sisältää n. 20 - 65 paino-% glukoosia, saate-
taan kosketukseen kemiallisesti stabiloidun Streptomyces
robigenosus-lajista saadun glukoosi-isomeraasin kanssa
lämpötilassa n. 101 - 113°C ja pH:ssa n. 6,5 - 6,75
10 s - 5 h kosketusajaksi, jotta fruktoosin lopulliseksi
pitoisuudeksi liuoksessa saadaan vähintään n. 53 - 60 pai-
no-% hiilihydraattien kokonaismäärästä laskettuna ilman
olennaista psikoosin ja/tai muiden ei-fruktoosi-, ei-glu-
koosisokerien muodostusta, jolloin kemiallinen stabiloin-
ti käsittää molekyylin sisäisten ristosidosten muodostami-
15 sen silloitusaineen avulla ja/tai sekapolymeroinnin poly-
meerimatriisiin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että glukoosipitoinen liuos saadaan
maissitärkkelyksestä hydrolysoimalla.

20 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että glukoosipitoinen syöteliuos
saadaan isomeroimalla maissitärkkelyshydrolysaattia fruk-
toosipitoisuuteen n. 52 % saakka kokonaishiilihydraatti-
määrästä laskettuna.

25 4. Jonkun patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että glukoosi-isomeraasin
lähteenä on Streptomyces sp. ATCC 21175.

5. Jonkun patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että glukoosi-isomeraasi on
30 lämpöstabiili glukoosi-isomeraasi.

6. Jonkun patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että isomeroitavaliainees-
sa on entsyymien denaturoitumisen estävä määrä rikkihapok-
keen vesiliukoista suolaa.

35 7. Jonkun patenttivaatimuksen 1-6 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että glukoosipitoinen syö-

teliuos sisältää n. 30-50 paino-% hiilihydraatteja.

8. Jonkun patenttivaatimuksen 1-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glukoosipitoinen syöteliuos saatetaan kosketukseen kemiallisesti stabiloidun
5 glukoosi-isomeraasin kanssa kontaktiajan ollessa n. 2 - 30 minuuttia.

9. Jonkun patenttivaatimuksen 1- 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kemiallisesti stabiloitua glukoosi-isomeraasia käytetään immobiloidussa muodossa.
10

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kemiallisesti stabiloitu glukoosi-isomeraasi on immobilisoitu dietyyliaminoetyylisululoosalle.

11. Jonkun patenttivaatimuksen 1-10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ensimmäisessä vaiheessa saatetaan glukoosipitoinen syöteliuos kosketukseen glukoo-
15 si-isomeraasin kanssa lämpötilassa n. 20 - 80°C, pH:ssa n. 6 - 9 ja kontaktiaikana n. 0,5 - 2 tuntia, jotta mainitun liuoksen fruktoosipitoisuus kohoaisi n. 52 paino-%:iin
20 saakka hiilihydraattien kokonaismäärästä laskettuna, ja toisessa vaiheessa nostetaan isomeroointiväliaineen lämpötila n. 101 - 113°C:seen, pH säädetään tarpeen mukaan
25 alueelle n. 6,5 - 6,75 ja fruktoosipitoinen liuos saatetaan kosketukseen kemiallisesti stabiloidun glukoosi-isomeraasin kanssa vielä ajaksi, joka on riittävä fruktoosipitoisuuden nostamiseksi n. 53 - 60 paino-%:iin.

12. Jonkun patenttivaatimuksen 1-11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tuotteena saatu fruktoosi-glukooosisiirappi jäähdytetään lämpötilaan alle n.
30 80°C.

13. Jonkun patenttivaatimuksen 1-12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isomeroointiseos jäähdytetään lämpötilaan n. 20 - 80°C entsyymien isomeroointiseoksesta erottamisen jälkeen.
35

Patentkrav

1. Förfarande för isomerisering av glukos till fruktos, k ä n n e t e c k n a t därav, att man bringar
5 en glukoshaltig matarlösning, som innehåller ca 20 - 65 vikt-% glukos, kontakt med kemiskt stabiliserat glukosisomeras, som erhållits ur *Streptomyces robigenosus*-arten, vid en temperatur på ca 101 - 113°C och ett pH på ca 6,5 - 6,75 under en kontakttid på 10 s - 5 h för att uppnå en
10 slutkoncentration av fruktos i lösningen minst ca 53 - 60 vikt-%, beräknat på den totala kolhydrathalten, utan att de väsentligt bildas psikos och/eller andra icke-fruktos-, icke-glukos-socker, varvid den kemiska stabiliseringen omfattar intramolekylär tvärbindning med hjälp av ett
15 förnättningsmedel och/eller kopolymerisering i en polymermatris.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den glukoshaltiga lösningen erhålles genom hydrolys av majsstärkelse.

20 3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den glukoshaltiga matarlösningen erhålles genom isomerisering av ett majsstärkelsehydrolysat till en fruktoshalt på upp till ca 52 % beräknat på den totala kolhydrathalten.

25 4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att källan för glukosisomeraset är *Streptomyces* sp. ATCC 21175.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att glukosisomeraset
30 är ett termostabilt glukosisomeras.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att isomeriseringsmediet innehåller en enzym-denatureringsinhiberande mängd av ett vattenlösligt salt av svavelsyrlighet.

35 7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att den glukoshaltiga

matarlösningen innehåller ca 30 - 50 vikt-% kolhydrater.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att den glukoshaltiga matarlösningen bringas i kontakt med kemiskt stabiliserat glukosisomeras under en kontakttid på ca 2 - 30 minuter.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att det kemiskt stabiliserade glukosisomeraset användes i immobiliserad form.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att det kemiskt stabiliserade glukosisomeraset immobiliseras på dietylaminooetyl-cellulosa.

11. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att man som första steg bringar den glukoshaltiga matarlösningen i kontakt med glukosisomeras vid en temperatur på ca 20°C - 80°C, vid ett pH på ca 6 - 9 och en kontakttid på ca 0,5 - 2 timmar för att fruktoshalten i nämnda lösning skall stiga till 52 vikt-%, beräknat på den totala kolhydrathalten och som andra steg höjer isomeriseringsmediets temperatur till ca 101 - 113°C och justerar pH efter behov till intervallet ca 6,5 - 6,75 och bringar den fruktoshaltiga lösningen i kontakt med kemiskt stabiliserat glukosisomeras under en ytterligare tidsperiod, som är tillräcklig för att öka fruktoshalten till ca 53 - 60 vikt-%.

12. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att den som produkt erhållna fruktos-glukos-sirapen kyles till en temperatur under ca 80°C.

13. Förfarande enligt något av patentkraven 1 till 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att isomeriseringsblandningen kyles till en temperatur på ca 20 - 80°C efter att enzymet bringats ur kontakt med isomeriseringsblandningen.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-