



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320145

C 12 P 19/02, 41/00, C 12 N 9/90

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040149	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.07.15 PCT/DK02/00497
(22)	Inng.dag	2004.01.13	(85)	Videreføringsdag	2004.01.13
(24)	Løpedag	2002.07.15	(30)	Prioritet	2001.07.16, DK, 1114/01 2001.07.16, US, 305155 2001.07.16, US, 905108
(41)	Alm.tilgj	2004.01.13			
(45)	Meddelt	2005.10.31			
(73)	Innehaver	Arla Foods amba , Skanderborgsvej 277, 8260 VIBY J, DK Hans Berthelsen, Sønderupvej 26, DK-6920 Videbæk, DK Kristian Eriknauer, c/o Arla Foods amba, Skanderborgvej 227, DK-8260 Viby J, DK Karen Böttcher, Sønderupvej 26, DK-6920 Videbæk, DK Hans Jørgen Singel Christensen, Sønderupvej 26, DK-6920 Videbæk, DK Ole Cai Hansen, Sønderø Park 42, DK-3500 Værløse, DK Flemming Jørgensen, Mølleåparken 57, 2, DK-2800 Lyngby, DK Peter Stougaard, Gershøjvej 103, DK-4050 Skibby, DK			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av tagatose			
(56)	Anførte publikasjoner	US-6057135			
(57)	Sammendrag				

Tagatose fremstilles ved hydrolysering av laktose til galaktose og glukose og isomerisering av galaktose til tagatose og kromatografisk separering og resirkulering av hvilke som helst ikke-omdannede forbindelser. PÅ denne måten oppnår man høye utbytter av ren tagatose.

Foreliggende oppfinnelse angår enzymatisk fremstilling av tagatose, spesielt D-tagatose.

D-tagatose er et lavkalori bulksøtningsstoff med mange anvendelsesområder som har ikke-kariogene og prebiotiske egenskaper. D-tagatose kan anvendes i næringsmidler og funksjonelle næringsmidler så vel som i legemidler, jfr. US 4786722, US 5356879 og US 5447917.

Ifølge US 5002612 og US 5078796 har D-tagatose blitt fremstilt ved å hydrolysere lactose eller et lactose-inneholdende materiale til en blanding av galaktose og glykose ved anvendelse av en lactase, eventuelt ved å fjerne glykose fulgt av kjemisk isomerisering av galaktose til tagatose.

US 6057135 beskriver fremstilling av D-tagatose fra ostemyse eller melk, som hydrolyseres for å fremstille en blanding av galaktose og glukose. Glukose separeres fra galaktosen ved fermentering av glukose og utsettes for isomerisering ved anvendelse av L-arabinoseisomerase.

I et første aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av tagatose som innbefatter a) hydrolysering av laktose eller et laktoseinneholdende utgangsmateriale for å oppnå galaktose og glukose, b) isomerisering av den oppnådde galaktosen med en L-arabinoseisomerase, og c) kromatografisk separering av produkter og ikke-omdannede forbindelser og resirkulering av ikke-omdannede forbindelser til prosessen.

I et annet aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte hvori trinn a) og b) utføres i en reaktor.

I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av D-tagatose.

I enda et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte, hvori L-arabinose isomerasen som anvendes i trinn b) er termofil.

I enda et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte hvori laktasen som anvendes i trinn a) er termofil.

I enda et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte hvori temperaturen som anvendes i trinn(ene) a) og/eller b) er 40 - 90°C.

Ytterligere aspekter av oppfinnelsen vises i de etterfølgende krav.

5

Figur 1 viser fremgangsmåten i eksempel 1 skjematisk,
Figur 2 viser fremgangsmåten i eksempel 2 skjematisk, og
Figur 3 viser fremgangsmåten i eksempel 3 skjematisk.
Figur 4 viser resultatet av eksempel 4.

10

Det har overraskende blitt funnet at det er mulig å anvende kromatografisk separering og gjenvinning i en enzymatisk fremgangsmåte for fremstilling av tagatose. På denne måten oppnås høyere utbytter og en renere fremgangsmåte. Det totale utbyttet så vel som utbyttet for hver syklus, er høyere.

15

Ved anvendelsen av denne prosessen er det mulig å gjenvinne og anvende hvilken som helst ikke-omdannet laktose og galaktose. Det er også mulig å separere produktene, tagatose og hvilke som helst biprodukter, spesielt glukose fra galaktose og anvendelsen av glukose for andre formål.

20

Utgangsmaterialet kan være hvilken som helst laktose eller laktoseinnholdende materiale.

25

Laktose er et biprodukt fra ostefremstilling. Denne fremgangsmåten gir mulighet for å omdanne laktose, et produkt med lav verdi som er produsert i overflod, til et produkt med høy verdi med egenskaper som er nyttige for mennesker. Dette er en måte å anvende laktose. Man har lenge prøvd å finne muligheter for anvendelse av laktose.

30

Fremgangsmåten involverer enzymatisk hydrolyse av laktose, enzymatisk omdannelse av galaktose til tagatose og eventuelt kromatografisk separering med gjenvinning av ikke-omdannede produkter.

Konsumeringen av kjemikalier etc. er lav.

35

Produksjonen av biprodukter er lav. Kun ett biprodukt produseres, nemlig glukose som en glukosesirup/-pulver, som kan anvendes som næringsmiddel.

Det er mulig å utføre hele reaksjonen i en reaktor som inneholder enzymer for hydrolyse av laktose så vel som isomerisering av galaktose. På denne måten kombineres trinn a) og trinn b).

- 5 Ved å gjøre dette forbedres hele prosessen med hensyn til utbytte pr. enhetstime. Galaktose fjernes kontinuerlig fra reaktoren ved dens isomerisering til tagatose som på denne måten reduserer konsentrasjonen av galaktose som ellers ville redusere effekten av laktasen og resultere i en reduksjon av omdannelsen av laktose til galaktose og glukose. Det er mulig å utføre prosessen ved en høy konsentrasjon (Brix) på grunn av
- 10 den høye prosessstemperaturen. Evaporeringskapasiteten ville bli spart, noe som igjen vil resultere i forbedret økonomi med hensyn til investering og arbeid. Den økte sukkerkonsentrasjonen har dessuten den effekten at anvendelsen av konserveringsmidler kan reduseres. Også første kromatografiske separeringen vil bli overflødig, som igjen betyr forbedret økonomi med hensyn til investering og løpetid.

15

- Spesielt er en enzymatisk omdanning av laktose til glukose og galaktose med etterfølgende isomerisering av galaktosen til tagatose i samme enzymreaktor blitt vist. De innledende undersøkelser bekreftet at LacS laktase-enzym og L-arabinose isomerase fra *T. mathranii* kunne fungere under identiske metallion-, buffer- og temperatur-
- 20 betingelser. Prinsippet ble deretter undersøkt ved inkubering av en 800 mM laktoseoppløsning (28%) med immobilisert laktase og immobilisert isomerase. Prøver ble analysert med hensyn til deres innhold av laktose, glukose, galaktose og tagatose ved hjelp av HPLC. I løpet av 24 timers inkubering økte konsentrasjonen av glukose til ca. 800 mM hvilket indikerer at all laktose ble spaltet. Konsentrasjonene av galaktose
- 25 og tagatose økte begge lineært til ca. 300 mM. Følgelig var omdanningsgraden $(300/800) \times 100\% = 38\%$.

Ytterligere enzym kan overføres i den samme reaktoren, en såkalt kombireaktor.

- 30 Tagatosen er spesielt D-tagatose, og det er stor etterspørsel etter den i næringsmiddelindustrien.

Alle laktaser kan anvendes i trinn a). Eksempler er enzymer avledet fra gruppen som består av *Bacillus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus* og *Pyrococcus*.

35

Alle L-arabinoseisomeraser kan anvendes i trinn b). Eksempler er enzymer avledet fra gruppen som består av *Bacillus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter* og *Thermotoga*.

Enzymene kan anvendes i en hvilken som helst form. For eksempel er det mulig å anvende immobiliserte enzymer.

- 5 Biotechnologisk Institute, Danmark, kan levere anvendbare laktaser og L-arabinose-isomeraser.

Biotechnologisk Institute, Danmark har funnet og undersøkt et enzym avledet fra *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobacter mathranii* DSM 11426. De har
10 innlevert en US patentsøknad nr. 09/905,108 som dekker oppfinnelsen.

K_m verdier for *T. mathranii* enzym på D-galaktose er lavere enn verdier for enzymer fra vanlige organismer som produserer L-arabinose isomerase, slik som *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Arthrobacter sp* og *Lactobacillus pentosus*.
15 Derfor har *T. mathranii* en bedre affinitet.

Det sistnevnte enzymet er termofilt.

En ytterligere fordel ved å anvende termofile enzymer er muligheten av å anvende høy
20 prosess temperatur hvor oppløseligheten av laktose og glukose er høyere. Dette betyr at mer konsentrerte produkter kan anvendes for den enzymatiske prosessen av oppfinnelsen. Dette betyr igjen mindre vannforbruk og mindre vann for evaporering. Dette vil gi tekniske fordeler og mindre behov for vann og energi med hensyn til oppvarming og kjøling av prosessstrømmer.

25 Anvendelsen av termofile enzymer har ytterligere gjort det mulig å arbeide ved en høyere temperatur. Dette fører til en bedre hygiene på grunn av redusert risiko for kontaminering med skadelige mikroorganismer. Ytterligere oppnås en økt omdannelse av galaktose til tagatose med høyere temperaturer sammenlignet med omdannelsen av arabinose til ribulose. I tillegg kan det også være tekniske fordeler som lettere flyt og raskere filtrering.

Det er således foretrukket å anvende enzymer som har optimale utbytter ved høye temperaturer i trinnene a) og/eller i trinn b). Dette vil vanligvis gi en raskere reaksjon.
35 Videre er det mulig å rense systemet ved anvendelse av høye temperaturer, for eksempel pasteuriseringstemperaturer, som vanligvis anvendes i meieriindustrien eller temperaturer over 100°C, hvis enzymene er termofile eller til og med ekstremofile.

Hvis det ikke er noen eller kun liten temperaturforskjell mellom temperaturtrinn a) og b), reduseres energien for kjøling og oppvarming. Produksjonsprosessen kan således kjøres ved temperaturer over 60°C. Dette har brede implikasjoner for mikrobiologien og forbruket av damp og saltoppløsning for oppvarming og kjøling.

5

Temperaturen som anvendes i trinn(ene) a) og/eller b) er 40 - 90°C. Vanligvis er den 60 - 90°C. Fortrinnsvis er temperaturen 60 - 80°C, mer foretrukket 65 - 70°C, og mest foretrukket er temperaturen 65°C. Likevel vil temperaturen være avhengig av de valgte enzymer og den kan være forskjellig i trinn a) og b). Som nevnt over, oppnås noen
10 fordeler ved å anvende samme temperatur i begge trinn, hvilket inkluderer utforming av begge trinn simultant i en reaktor.

I motsetning til kjemisk omdannelse av galaktose til tagatose, kan prosessen kjøres ved en pH-verdi som er optimal for sukkere. Det reduserer produksjonen av
15 sukkernedbrytningsproduktet betydelig. Som et resultat forbedres gjenvinning og økonomien. En typisk pH-verdi er ca. 7,0. Anvendbare pH-verdier og andre reaksjonsparametere finnes for eksempel US 6057135. Yamanaka, K and Wood, W.A. (1966) *Methods in Enzymology* 9: 596-602, som har en liste med et antall melkesyrebakterier som danner et L-arabinose isomeraseenzym som er i stand til å
20 produsere ketoser fra blant annet D-galaktose.

Produktet av oppfinnelsen i form av sirup er så ren at det er mulig å anvende direkte tagatosesiruper. Hittil har det vært nødvendig å rense produktet, for eksempel ved krystallisering av den urene sirupen og oppløse eller solubilisere den igjen.

25

Som nevnt over, kan D-tagatose bli fremstilt fra en laktoseinneholdende kilde (for eksempel ostemyse, kaseinmyse eller melk). Laktose hydrolyseres til like mengder av galaktose og glukose ved hjelp av laktasen som kan være immobilisert laktase.

Galaktose separeres fortrinnsvis fra glukose ved kromatografi. Ikke-hydrolysert laktose kan separeres og gjenvinnes i enzymkolonnen. Galaktosen isomeriseres til tagatose ved hjelp av valgfritt L-arabinoseisomerase. Ikke-isomerisert galaktose kan separeres ved hjelp av kromatografi og gjenvinnes. Fraksjonen som inneholder D-tagatose krystalliseres. Krystallene separeres fra moderluten og tørkes. Moderluten som har en
30 stor andel av tagatose, kan gjenvinnes/gjenkrystalliseres. Det er også mulig å anvende tagatosen direkte som er fremstilt som sirup i næringsmiddelprodukter for mennesker eller andre formål.

Således har man funnet en effektiv enzymatisk prosedyre kombinert med kromatografi for fremstilling av tagatose i høye utbytter og i en meget ren form i en eller to reaktorer. Fremgangsmåten har spesielle fordeler hvis den utføres med termofile/ekstremofile enzymer.

Den nye fremgangsmåten for fremstilling av tagatose er meget effektiv og ren på grunn av en spesifikk enzymatisk omdanning kombinert med gjenvinning av ikke-omdannede produkter. Prosessen er ekstremt effektiv og miljøvennlig.

EKSEMPLER

Eksempel 1

Hydrolyse av laktose med resirkulering

Isomerisering av galaktose med resirkulering

1. Laktose fremstilles fra melke ved ultrafiltrering fulgt av krystallisering.
2. En oppløsning av laktose i vann (8-40% DS) hydrolyseres ved hjelp av immobilisert laktase ved høy eller lav temperatur (enten ved hjelp av et enzym fra *Aspergillus oryzae* eller en termofil organisme).
3. Glykose og galaktose separeres ved hjelp av kromatografi. Avhengig av konsentrasjonen av fôringsmengden kan det være nødvendig å kjøre et konsentreringstrinn for eksempel ved evaporering.
4. Laktose og mulige galaktooligosakkarider gjenvinnes i kolonnen som inneholder immobilisert enzym.
5. Hvis konsentrasjonen av oligosakkarider i gjenvinningsloopen er for høy (hydrolysen påvirkes på uønsket måte), spyles systemet.
6. Fraksjonen som inneholder glukose og galaktose isomeriseres ved hjelp av immobilisert galaktoseisomerase (fra en termofil organisme).
7. Blandingens konsentreres for eksempel ved hjelp av evaporering.
8. Tagatose separeres ved hjelp av kromatografi.
9. Tagatosefraksjon konsentreres og muligens krystalliseres.
10. Glukosefraksjonen kan konsentreres for salg som en sirup eller den kan ytterligere bearbeides.
11. Galaktosefraksjonen resirkuleres til isomerasekolonnen.

Eksempel 2**Hydrolyse av laktose uten resirkulering
med følgende isomerisering**

5

1. Laktose fremstilles fra myse ved ultrafiltrering fulgt av krystallisering.
2. En oppløsning av laktose i vann (8 – 40% DS) hydrolyseres ved hjelp av immobilisert laktase (enzymet stammer fra *Aspergillus oryzae*).
3. Blandingen som inneholder ca. 46% glukose, 46% galaktose føres gjennom
10 en kolonne som inneholder immobilisert galaktoseisomerase (fra en termofil organisme). Ca. 30% av galaktosen omdannes til tagatose.
4. Produktet separeres i 3 fraksjoner ved konsentrering og kromatografisk separering:
 - Fraksjon 1 inneholder hovedsakelig ikke-omdannet galaktose. Denne
15 fraksjonen resirkuleres i galaktoseisomerasekolonnen
 - Fraksjon 2 inneholder hovedsakelig tagatose. Denne fraksjonen konsentreres for krystallisering eller den selges som sirup.
 - Fraksjon 3 inneholder hovedsakelig glukose, men også
20 galaktooligosakkarider fremstilt av laktaseenzymet så vel som ikke-omdannet laktose. Denne fraksjonen konsentreres for salg som sirup eller for ytterligere prosessering, som krystallisering eller tørking.

Eksempel 3**Hydrolyse og isomerisering i en reaktor**

25

1. Laktose produseres fra myse ved ultrafiltrering fulgt av krystallisering.
2. En oppløsning av laktose i vann føres gjennom en kolonne som inneholder immobilisert laktase og L-arabinoseisomerase (begge enzymer stammer fra
30 termofile organismer).
3. Produktet separeres i 3 fraksjoner ved konsentrering og kromatografisk separering:
 - Fraksjon 1 inneholder hovedsakelig ikke-omdannet galaktose. Denne fraksjonen resirkuleres i kolonnen for enzymatisk omdanning.
 - 35 • Fraksjon 2 inneholder hovedsakelig tagatose. Denne fraksjonen konsentreres for krystallisering eller den selges som en sirup.

- Fraksjon 3 inneholder hovedsakelig glukose, men også galaktooligosakkarider fremstilt av laktaseenzymet så vel som ikke-omdannet laktose. Denne fraksjonen konsentreres for salg som en sirup eller for ytterligere prosessering som krystallisering eller tørking.

5

Eksempel 4

En-reaktoromdanning av laktose til tagatose med immobilisert laktase og immobilisert isomerase

10

β -glykosidasen som koder for genet fra *Sulfolobus solfataricus* (Moracci M, Ciaramella M, and Rossi M. [2001] Methods in Enzymology vol. 330, s. 201 – 15) ble klonet og uttrykt i *E. coli*. Genet ble isolert ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR) ved anvendelse av rensket kromosomalt DNA fra *Sulfolobus solfataricus* stamme P2.

15 Primere som inneholder ytterligere restriksjonssteder for *NdeI* og *BamHI* ble laget for å gi den hele kodesekvens på et fragment som i det følgende ble klonet i et standard, ekspresjonsplasmid pET3a (Novagen).

E. coli celler som uttrykker enzymet ble kultivert, høstet ved sentrifugering, lysert i en
20 French trykkcelle og kryssbundet med glutaraldehyd og polyetylenimin som beskrevet i US 5.354.105. Det immobiliserte enzymet ble gjenvunnet ved sentrifugering og lyofilisering av pellet. Aktiviteten til den immobiliserte laktasen var 1500 enheter/g tørrvekt. En enhet ble definert som mengden enzym som frigir ett mikromol glykose pr. min. ved 65°C, pH 7, i en 30% (vekt/volum) oppløsning av laktose.

25

L-arabinoseisomerasegenet fra *Thermoanaerobacter mathranii* ble klonet og uttrykt i *E. coli* som beskrevet i US patentsøknad nr. US 09/905.108 (Biotechnological Institute, Danmark).

30 *E. coli* celler som uttrykker enzymet ble kultivert, høstet ved hjelp av sentrifugering, lysert i en French trykkcelle og kryssbundet med glutaraldehyd og polyetylenimin som beskrevet i US 4.354.105. Det immobiliserte enzymet ble gjenvunnet ved hjelp av sentrifugering og lyofilisering av pelleten. Aktiviteten til den immobiliserte L-arabinoseisomerasen var 50 enheter/g tørrvekt. En enhet ble definert som mengden av
35 enzym som produserer en mikromol D-tagatose pr. min. ved 65°C, pH 7, i en 30% (w/v) oppløsning av D-galaktose.

- En-milliliter prøveblandinger som inneholder 20 mg immobilisert laktase, 80 mg immobilisert isomerase, 0,30 g laktose (30%, 875 mM), 25 mM K-maleatbuffer, pH 6,9 og 5 mM MnCl_2 ble inkubert ved 65°C. En kontrollprøve uten enzymer ble behandlet på samme måte. Periodisk ble prøver tatt og konsentrasjonene av glukose, galaktose og tagatose ble bestemt ved høyt trykk flytende kromatografi ved anvendelse av en Aminex HPX-87C kolonne (Bio-Rad) og en refraksjonsindeks detektor (Waters 410). Den mobile fasen var avionisert, avgasset vann, kolonnetemperaturen var 85°C, og strømningshastigheten var 0,6 ml/min..
- 10 Som vist i figur 4, økte konsentrasjonen av glukose til ca. 800 mM i løpet av 24 timer, som indikerer at nesten all laktose ble hydrolysert til galaktose og glukose. Konsentrasjonen av tagatose økte lineært til ca. 300 mM i løpet av 24 timer, som indikerer en bioomdannelse på $300 \text{ mM}/800 \text{ mM} = 38\%$.

15 **TABELL**

Omdannelse av laktose til tagatose med immobilisert lacS latase fra *S. solfataricus* og araA isomerase fra *T. mathranii*

Inkuberingstid (time)	Laktose (mM)	Glukose (mM)	Galaktose (mM)	Tagatose (mM)
0	816	0	0	0
2		176	57	30
4		281	87	48
6		366	116	72
8		430	139	98
24		811	316	295

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av tagatose, k a r a k t e r i s e r t
5 v e d at den innbefatter

- a) hydrolysering av laktose eller et laktoseinnholdende
utgangsmateriale for å oppnå galaktose og glukose
- 10 b) isomerisering av den oppnådde galaktosen med en L-
arabinoseisomerase, og
- c) kromatografisk separering av produkter og ikke-omdannede
forbindelser og resirkulering av ikke-omdannede forbindelser i
prosessen.

15 2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
ikke-omdannet laktose separeres ved hjelp av kromatografi og resirkuleres i trinn a) for
hydrolyse.

20 3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at ikke-omdannet galaktose separeres ved hjelp av kromatografi og
resirkuleres i trinn b) for isomerisering.

25 4.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at trinn a) og trinn b) utføres i en
reaktor.

30 5.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at galaktosen er et D-galaktose og
tagatosen er D-tagatose.

35

6.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at L-arabinoseisomerasen som
5 anvendes i trinn b) er termofil.

7.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at laktasen som anvendes i trinn a) er
10 termofil.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at L-arabinoseisomerasen som anvendes i trinn b) er avledet fra gruppen som
15 består av, men ikke er begrenset til *Bacillus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter* og
Thermotoga.

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at
20 L-arabinoseisomerasen er avledet fra *Thermoanaerobacter mathranii*.

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at
L-arabinoseisomerasen er avledet fra *Thermoanaerobacter mathranii* DSM 11426.
25

11.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at laktasen som anvendes i trinn a) er
avledet fra gruppen som består av, men er ikke begrenset til, *Bacillus*, *Sulfolobus*,
30 *Thermoanaerobacter*, *Thermus* og *Pyrococcus*.

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at ett
eller flere av de anvendte enzymer er immobilisert.
35

13.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den anvendte temperaturen i
5 trinn(ene) a) og/eller b) er 40 - 90°C.

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at
temperatures er 60 - 90°C.

10

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at
temperatures er 60 - 80°C.

15 16.

Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at
temperatures er 65 - 70°C.

17.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at
temperatures er 65°C.

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at
25 L-arabinoseisomerasen som anvendes er avledet fra Thermoanaerobacter mathranii og
laktasen som anvendes er avledet fra Sulfolobus solfataricus.

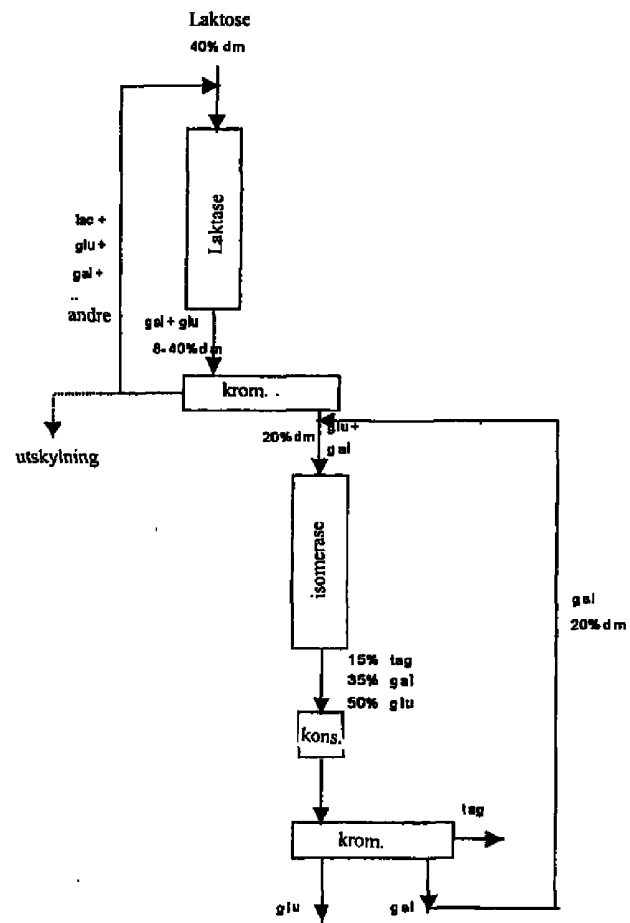
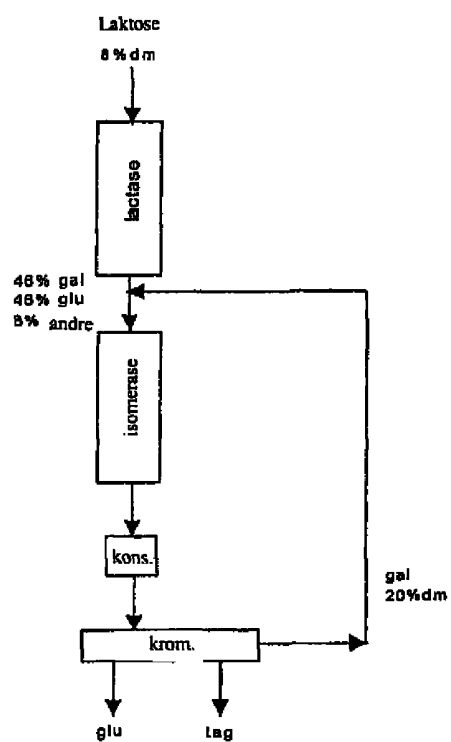


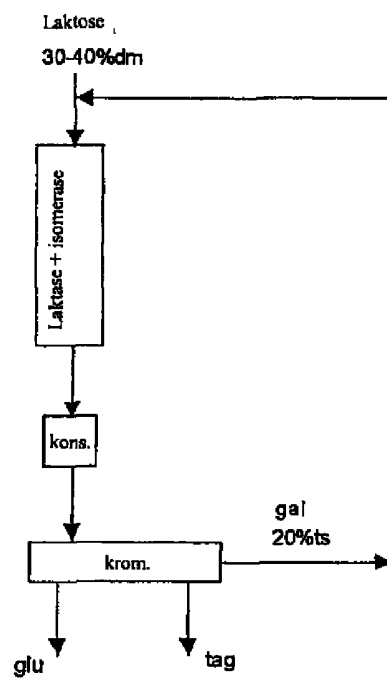
Fig. 1

**Fig. 2.**

Fraksjon 1: gal 20% dm

Fraksjon 2: tag

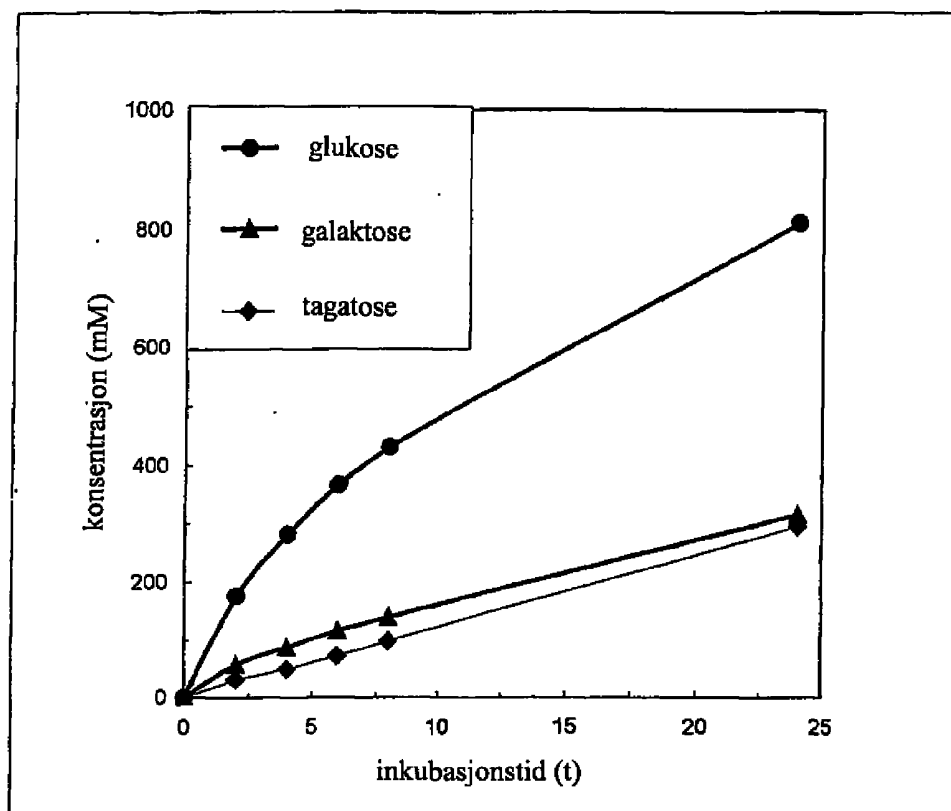
Fraksjon 3: glu

**Fig.3.**

Fraksjon 1: gal 20% dm

Fraksjon 2: tag

Fraksjon 3: glu

**Fig. 4**