



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// (C 12 N 9/42, C 12 R 1:66)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑯ Gesuchsnummer: 7455/82

⑬ Inhaber:
Novo Industri A/S, Bagsvaerd (DK)

⑭ Anmeldungsdatum: 21.12.1982

⑭ Erfinder:
Adler, Jens Lorenz (-Nissen), Gentofte (DK)
Jensen, Georg Wilhelm, Bagsvaerd (DK)
Riisgaard, Steen, Shibuya-ku/Tokyo (JP)
Gürtler, Henrik, Lyngby (DK)
Olsen, Hans Aage Sejr, Vanlose (DK)
Schülein, Martin, Kopenhagen (DK)

⑮ Patent erteilt: 30.10.1987

⑯ Vertreter:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑭ Enzym SPS-ase zum Abbau eines Soja-SPS genannten löslichen pflanzlichen Polysaccharids, Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung dieses Enzyms und Verwendung dieses Enzyms.

⑭ SPS-ase ist eine Carbohydrase, die Soja-SPS zu Produkten abbaut, welche sich an Proteine, insbesondere an pflanzliche Proteine, in einem wässrigen Medium weniger anlagern, als sich das Soja-SPS vor dem Abbau anlagern würde. In einem Medium mit einem pH-Wert von vorzugsweise 3 bis 6 kann die Anlagerung auf weniger als 20 % reduziert werden. Zur Herstellung der SPS-ase wird ein Mikroorganismus, vorzugsweise Aspergillus aculeatus CBS 101.43 oder Aspergillus japonicus IFO 4408, auf einem Medium gezüchtet, dessen Kohlenstoffquelle hauptsächlich SPS ist. Die Züchtung erfolgt vorzugsweise als Submerskultur im pH-Bereich von 3 bis 7, besser von 4 bis 6, und bei 20 bis 40 °C, besser bei 25 bis 35 °C, gegebenenfalls unter Zugabe von Pectin, in einem Nährmedium, das Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, insbesondere entfettetes Sojamehl, sowie anorganische Salze enthält. Das Sojamehl kann vorher mit einem vorzugsweise von Bacillus licheniformis gebildeten proteolytischen Enzym behandelt worden sein. Bei positivem Ergebnis der Analyse des Fermentationsmediums auf SPS-ase wird diese isoliert. Der Einsatz der SPS-ase zum Abbau von Polysacchariden erfolgt vorzugsweise in Kombination mit einer anschlies-

senden alkoholischen Fermentation eines als Abbauprodukt entstehenden Zuckers.

PATENTANSPRÜCHE

1. SPS-ase, eine Carbohydase, die fähig ist, ein Soja-SPS genanntes lösliches pflanzliches Polysaccharid zu Produkten abzubauen, die sich an Protein in einem wässrigen Medium in einem geringeren Ausmass anlagern, als sich das Soja-SPS vor dem Abbau an das gleiche Protein unter entsprechenden Bedingungen anlagern würde.

2. SPS-ase nach Anspruch 1, wobei die SPS-ase imstande ist, Soja-SPS in einem wässrigen Medium zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an pflanzliches Protein in dem wässrigen Medium in geringerem Masse anlagern als Soja-SPS, vor dem Abbau sich an das gleiche pflanzliche Protein in dem wässrigen Medium angelagert hätte.

3. SPS-ase nach Anspruch 1 oder 2, wobei die SPS-ase imstande ist, Soja-SPS in einem wässrigen Medium mit einem pH-Wert, der nicht mehr als 1,5 von 4,5 abweicht, zu Abbauprodukten abzubauen, die sich an Sojaprotein in dem wässrigen Medium in einem geringeren Ausmass anlagern als das Soja-SPS sich vor dem Abbau an das Sojaprotein in dem wässrigen Medium angelagert hätte.

4. SPS-ase nach Anspruch 1 bis 3, wobei die Abbauprodukte von Soja-SPS nach vollständigem Abbau sich an pflanzliches Protein in einem Ausmass von weniger als 50%, insbesondere weniger als 20%, anlagern, als das Soja-SPS sich vor dem Abbau an das pflanzliche Protein in dem wässrigen Medium angelagert hätte.

5. Verfahren zur Herstellung von SPS-ase gemäß Patentanspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass ein Stamm in einem Nährmedium gezüchtet wird, dessen Hauptkohlenstoffquelle SPS ist, das auf Basis von pflanzlichem Rohprotein als Ausgangsmaterial gebildet worden ist, woraufhin eine Probe des Fermentationsmediums auf SPS-ase untersucht wird und der fragile Mikroorganismus als SPS-ase-bildender Mikroorganismus angesehen wird, wenn die Analyse auf SPS-ase positiv ist, und dass nach erfolgter Züchtung und bei positivem Ergebnis der Analyse die SPS-ase isoliert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch, dass der Stamm Asp. aculeatus CBS 101.43 oder Asp. japonicus IFO 4408 in einem Nährmedium gezüchtet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, dass die Züchtung als Submerskultur bei einem pH-Wert im Bereich von 3 bis 7, vorzugsweise von 4 bis 6, bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 40 °C, vorzugsweise von 25 bis 35 °C, durchgeführt wird, und wobei das Nährmedium Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, gekennzeichnet dadurch, dass das Nährmedium Sojamehl enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, gekennzeichnet dadurch, dass das Rohprotein entfettetes Sojamehl ist.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Sojamehl vor der Verwendung als Bestandteil des Substrats mit einem proteolytischen Enzym behandelt worden ist, vorzugsweise dem proteolytischen Enzym, das mikrobiologisch gebildet worden ist mit Hilfe von *Bacillus licheniformis*.

11. Verfahren nach Anspruch 5 bis 9, wobei eine sterile Lösung von Pectin aseptisch zu der Fermentationsbrühe während der Züchtung zugesetzt wird.

12. Verfahren zum Abbau von Polysacchariden mit Hilfe einer Carbohydase unter Verwendung von SPS-ase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine SPS-ase-Zubereitung in einem wässrigen Medium mit einem Substrat für die SPS-ase-Zubereitung zusammengebracht wird.

13. Verfahren zum Abbau von Polysacchariden nach Anspruch 12, wobei der Abbau durchgeführt wird unter Isolierung oder Extraktion eines anderen biologischen Bestandteils als Sojaprotein und verwandten Pflanzenproteinen aus einem biologischen Rohmaterial, wobei die SPS-ase-Zuberei-

tung im wesentlichen frei ist von irgendeinem Enzym, das imstande ist, das biologische Material abzubauen.

14. Verfahren zum Abbau von Polysacchariden nach Anspruch 12 oder 13, wobei ein oder mehrere Reaktionsprodukte unabhängig davon, ob sie erwünschte Endprodukte oder Abfallprodukte sind, weiter gleichzeitig mit oder nach der Enzymbehandlung behandelt werden.

15. Verfahren zum Abbau von Polysacchariden nach Anspruch 14, wobei die weitere Behandlung eine alkoholische Fermentation ist, wenn eines der Reaktionsprodukte ein fermentierbarer Zucker ist.

16. Verfahren zum Abbau von Polysacchariden nach einem der Ansprüche 12 bis 15, angewandt auf Polysaccharide von Zellwänden von Pflanzen.

17. SPS genanntes lösliches pflanzliches Polysaccharid als Substrat der SPS-ase gemäß Anspruch 1.

20

Ein Verfahren zur Herstellung eines gereinigten pflanzlichen Proteinprodukts (pvp) durch enzymatische Entfernung des Rückstands, ohne das Protein zu lösen und wieder auszufällen, ist in der BE-PS 882 769 beschrieben. Die Reinheit des nach dem bekannten Verfahren erhältlichen pvp ist jedoch nicht zufriedenstellend und sollte daher verbessert werden. In den Beispielen ist eine Reinheit des pvp von ungefähr 85% angegeben. Selbst wenn es möglich ist, ein pvp mit einer Reinheit von ungefähr 90% nach dem bekannten Verfahren zu erhalten, ist dies nur möglich unter Verwendung bestimmter vorbehandelter Ausgangssubstanzen, z.B. von Sojaproteinkonzentrat. Es wäre günstig, wenn es möglich wäre, eine Reinheit des pvp von ungefähr oder über 90% mit einem wesentlich breiteren Spektrum an Ausgangsmaterialien zu erhalten, insbesondere aus entfettetem Sojamehl.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, dass ein bestimmter Teil des Rückstandzersetzungsproduktes, wie es während der oben angegebenen enzymatischen Behandlung auftritt, d.h. ein wasserlösliches hochmolekulares Kohlenhydrat sich teilweise an das pflanzliche Protein anlagert (bindet), wie später näher erläutert wird. Das führt natürlich zu einer geringeren Reinheit des Proteins. Es hat sich auch gezeigt, dass dieses hochmolekulare Kohlenhydrat die Fähigkeit besitzt, sich an Proteine tierischen Ursprungs anzulagern.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Enzym zum Abbau des oben erwähnten hochmolekularen Kohlenhydrats zur Verfügung zu stellen, das die Möglichkeit zur Herstellung eines pvp mit verbesserter Reinheit eröffnet, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Enzyms.

Das Prinzip der Erfindung kann folgendermassen beschrieben werden, wobei auf Fig. 1 Bezug genommen wird, in der nur Produkte, die als ungelöste Feststoffe vorliegen, angegeben sind, während alle überstehenden Flüssigkeiten (und darin gelösten Stoffen) weggelassen worden sind. Eine Menge Sojamehl wurde in zwei gleiche Teile aufgeteilt, Teil I und Teil II (Spalte a in Fig. 1). Teil I wurde proteolytisch bei einem pH-Wert von ungefähr 8 mit Hilfe von Alcalase (einem proteolytischen Enzym, das gebildet worden ist von *B. licheniformis* und von Novo Industri A/S auf den Markt gebracht worden ist) abgebaut und dann weiter bei ungefähr pH 8 gewaschen, um die Gesamtmenge an Protein zu entfernen, und der Rückstand wurde von der überstehenden Flüssigkeit abgetrennt und gewaschen (siehe Teil I, Spalten a und b der Fig. 1). Auf diese Weise wurde ein reiner Rückstand (als Rückstand I bezeichnet) isoliert (Spalte b in Fig. 1). Teil II

des Sojamehls wurde nicht behandelt. Der Rückstand in Teil II wird als Rückstand II bezeichnet (Spalte b in Fig. 1). Jetzt wurden sowohl Rückstand I als auch Teil II mit Hilfe einer handelsüblichen Pectinase z.B. Pectinex (ein proteolytisches Enzym der Schweizerische Ferment AG) abgebaut (siehe Spalten b und c in Fig. 1). Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass der ungelöste Teil des Rückstands I wesentlich geringer ist als der ungelöste Teil des Rückstands II auf der Basis der Stickstoff- und Trockensubstanz-Bilanz, siehe Fig. 1, wo die schraffierten Bereiche in Spalte c den unlöslichen nicht-Proteinsubstanzen in der oben angegebenen Stufe entsprechen. Wenn darüber hinaus die überstehende Flüssigkeit des mit Pectinase behandelten Rests I mit einer Soja-protein-Suspension bei pH 4,5 zusammengebracht wird, wird ein Polysaccharid in der überstehenden Flüssigkeit an das Soja-protein gebunden. Dieses Polysaccharid in dem Überstand von dem Rest I, das ein Teil des Rest-Abbauproduktes ist und das in Wasser in Abwesenheit von Soja protein klar löslich ist, aber beim oder ungefähr beim isoelektrischen Punkt des Soja-proteins, soweit ein solches vorhanden ist, an dieses gebunden wird, wird als SPS (Soluble Polysaccharide) bezeichnet (siehe Fig. 1). Das SPS besitzt eine Molekulargewichtsverteilung zwischen 5×10^6 und $4,9 \times 10^4$. Die Bildung von isoliertem SPS geht aus dem in Fig. 2 angegebenen Schema hervor, das auch einen Teil des in Fig. 1 angegebenen Verfahrens umfasst. So besteht das Problem darin, ein Enzym zu finden, das imstande ist, das SPS in einer solchen Weise abzubauen, dass die SPS-Abbauprodukte sich nicht an Soja protein anlagern bzw. in einem wesentlich geringeren Mass als SPS an Soja protein gebunden wird.

Obwohl in der Beschreibung speziell Soja protein erwähnt wird, ist die Erfindung nicht auf Soja protein beschränkt, sondern umfasst alle Arten von pflanzlichen Proteinen, siehe z.B. die in der BE-PS 882 769, Seite 1, angegebenen Proteine.

Es hat sich nun gezeigt, dass es durch Untersuchung ihrer Fähigkeit, Soja-SPS abzubauen, möglich ist, Mikroorganismen auszuwählen, die imstande sind, eine Verbindung zu bilden, die enzymatische Aktivität besitzt und imstande ist, Soja-SPS abzubauen und die im folgenden kurz als SPS-ase bezeichnet wird.

Die Erfindung betrifft daher in erster Linie eine SPS-ase, eine Carbohydrase (Glycosidase), die imstande ist, Soja-SPS zu Produkten abzubauen, die sich in wässrigem Medium in geringerer Masse an Protein anlagern als das Soja-SPS sich vor dem Abbau an das gleiche Protein angelagert hätte.

Es hat sich ferner gezeigt, dass diese SPS-ase, die fähig ist, Soja-SPS abzubauen, imstande ist, Polysaccharide, die SPS ähnlich sind und aus Pflanzen (Gemüsen und Früchten) stammen, vollständiger abzubauen als übliche Pectinasen und übliche Cellulasen.

Es ist zu verstehen, dass ein SPS-ase haltiges Mittel ausgeschlossen ist, das giftige Substanzen enthält oder dass eine so geringe SPS-ase Aktivität besitzt, dass mehr als 10% SPS-ase haltiges Mittel angewandt werden müssen, bezogen auf das Gewicht des SPS in dem Substrat bei einer Reaktion, die 24 h bei 50 °C beim pH-Optimum der betreffenden SPS-ase durchgeführt wird, um einen Abbau von SPS von praktischer Bedeutung zu erreichen.

Durch vollständige oder teilweise Abtrennung des SPS von dem erhaltenen pflanzlichen Protein wird die Reinheit des erhaltenen pflanzlichen Proteins verbessert im Vergleich mit der Reinheit von pflanzlichem Protein, das nach dem aus der BE-PS 882 769 bekannten Verfahren erhalten worden ist, da dieses pflanzliche Proteinprodukt mit SPS verunreinigt war.

Es ist zurzeit nicht bekannt, ob die im folgenden beschriebene spezielle SPS-ase ihre enzymatische Aktivität aus einem einzigen Enzym bezieht oder aus einem Enzymkomplex,

umfassend mindestens zwei Enzyme. Einige Untersuchungen scheinen darauf hinzu deuten, dass zumindest zwei Enzyme für die Abbauwirkung der SPS-ase verantwortlich sind, wobei eines dieser Enzyme nur einen geringen Abbau des SPS her-
vorruft kann, woraufhin ein oder mehrere Enzyme imstande sind, einen weitergehenden Abbau des SPS zu erreichen. Die Erfindung soll jedoch durch diese Hypothese nicht eingeschränkt werden.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise eine SPS-ase, die imstande ist, Soja-SPS in einem wässrigen Medium zu Produkten abzubauen, die sich in dem wässrigen Medium weniger stark an pflanzliches Protein anlagern als das Soja-SPS vor dem Abbau. Vorzugsweise ist die erfundungsgemäße SPS-ase imstande, Soja-SPS in einem wässrigen Medium mit

einem pH-Wert abzubauen, der nicht mehr als 1,5 von 4,5 abweicht. Die erfundungsgemäße SPS-ase führt zu Abbauprodukten, die sich nach beendetem Abbau vorzugsweise zu weniger als 50%, insbesondere weniger als 20%, bezogen auf das Soja-SPS vor dem Abbau an pflanzliches Protein in wäss-

rigem Medium anlagern. Die erfundungsgemäße SPS-ase führt zu einem positiven SPS-ase-Test, wenn sie nach dem später näher erläuterten Verfahren qualitativ und quantitativ bestimmt wird. Die SPS-ase wird gebildet mit Hilfe eines Mikroorganismus, der zur Gattung *Aspergillus*, vorzugsweise

zur Art *Aspergillus niger*, gehört. Günstigerweise ist die SPS-ase abgeleitet von Enzymen, die gebildet werden können mit Hilfe von *Asp. aculeatus* CBS 101.43. Die gleiche SPS-ase kann gebildet werden mit Hilfe von *Asp. japonicus* IFO 4408. Es hat sich gezeigt, dass *Asp. aculeatus* CBS 101.43 auch sehr

wirksame Remanasen, Cellulasen, Pectinasen und Hemicellulasen bildet. Ferner hat es sich gezeigt, dass nicht jeder zu der Art *Aspergillus aculeatus* oder *Aspergillus japonicus* gehörende Stamm eine SPS-ase bildet, die für die Erfindung brauchbar ist. So konnte, wie später in der Beschreibung

angegeben ist (Abschnitt 5), gezeigt werden, dass der Stamm *Asp. japonicus* ATCC 20 236 nicht solche Mengen an SPS-ase bildet, die mit Hilfe der enzymatischen Bestimmung von SPS-ase, wie sie später beschrieben wird, nachgewiesen werden können. Die erfundungsgemäße SPS-ase ist immunoelektronisch identisch mit der SPS-ase, die gebildet werden

kann von *Asp. aculeatus* CBS 101.43 und identifizierbar durch Immunoelektrophorese-Überlagerungsverfahren (siehe Abschnitte 6 und 7).

Wenn eine SPS-ase mikrobiologisch gebildet wird, wird sie gebildet im Gemisch mit verschiedenen begleitenden Substanzen, insbesondere anderen Enzymen. Wenn dies erwünscht ist, kann die betreffende SPS-ase gereinigt werden, z.B. durch chromatographische Trennungsverfahren, wie später näher erläutert ist (Abschnitt 8).

In Agr. Biol. Chem 40 (1), 87-92, 1976 ist beschrieben, dass ein Stamm von *Asp. japonicus*, ATCC 20236 einen Enzymkomplex bildet, der imstande ist, einen speziellen Abbau eines sauren Polysaccharids in Sojasosse, das als APS bezeichnet wird, hervorzurufen, von dem ein Teil als APS-I bezeichnet wird. Dieses saure Polysaccharid ist nicht identisch mit SPS, wie später in Abschnitt 3 näher erläutert wird. So sind die HPLC-Gelfiltrations-Chromatogramme von SPS und APS deutlich verschieden, und darüber hinaus sind die Gelfiltrations-Chromatogramme von APS, das mit Hilfe von

handelsüblicher Pectinase, Pectolyase, abgebaut worden ist und von SPS, das mit deren üblichen Pectinase, Pectolyase abgebaut worden ist und von SPS, das mit deren üblichen Pectinase, Pectolyase, behandelt worden ist, deutlich verschieden. Darüber hinaus geht aus dem Artikel nicht hervor, dass das saure Polysaccharid an das Soja protein gebunden ist und dass das abgebaut saure Polysaccharid nicht an das Soja protein oder zu einem wesentlich geringeren Grad an das Soja protein gebunden ist als das nicht abgebaut saure Poly-

saccharid. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm keine SPS-ase in solchen Mengen bildet, die mit Hilfe der enzymatischen Bestimmung von SPS-ase, wie sie später näher beschrieben ist, nachgewiesen werden können. Das führte zu einem Vorurteil gegen die Anwendung irgendeines Stammes von Asp. japonicus als SPS-ase-Bildner. Aber überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass einige Stämme von Asp. japonicus SPS-ase-Bildner sind. Die Erfindung betrifft auch das isolierte SPS, das auf der Basis von rohem pflanzlichem Protein als Ausgangsmaterial gebildet worden ist.

Bei einem bevorzugten isolierten SPS ist das pflanzliche rohe Protein entfettetes Sojamehl. Die Herstellung des isolierten SPS ist oben mit Bezug auf Fig. 2 beschrieben worden.

Die Erfindung beruht auf der Auswahl eines SPS-ase produzierenden Mikroorganismus zur Herstellung der erfundungsgemässen SPS-ase, wobei der zu untersuchende Mikroorganismus auf einem Wachstumsmedium gezüchtet wird, dessen hauptsächliche Kohlenstoffquelle SPS ist, woraufhin eine Probe des Fermentationsmediums auf SPS-ase analysiert wird und der fragliche Mikroorganismus als SPS-ase produzierender Mikroorganismus ausgewählt wird, wenn die Analyse auf SPS-ase positiv ist.

Beim erfundungsgemässen Verfahren zur Herstellung von SPS-ase wird nach dem oben angewandten Auswahlverfahren für einen SPS-ase bildenden Mikroorganismus ein auswählbarer Stamm in einem Nährmedium gezüchtet. Die Züchtung kann als Submerskultur oder als Oberflächenkultur durchgeführt werden. Anschliessend wird die SPS-ase isoliert.

Bei dem erfundungsgemässen Verfahren wird vorzugsweise der Stamm Asp. aculeatus CBS 101.43 oder Asp. japonicus IFO 4408 in einem Nährmedium gezüchtet. Es ist ferner bevorzugt, dass die Züchtung als Submerskultur bei einem pH-Wert im Bereich von 3 bis 7, vorzugsweise von 4 bis 6 bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 40, vorzugsweise von 25 bis 35 °C durchgeführt wird, wobei das Nährmedium Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie anorganische Salze enthält. Günstigerweise enthält das Nährmedium zusätzlich geröstetes Sojamehl. Das Sojamehl wird vorzugsweise vor der Verwendung als Komponente des Substrats mit einem proteolytischen Enzym behandelt, vorzugsweise einem solchen, das mikrobiologisch gebildet worden ist, mit Hilfe von Bacillus licheniformis. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass eine Lösung von Pectin aseptisch während der Züchtung zu der Fermentationsbrühe zugesetzt wird.

Es hat sich gezeigt, dass Asp. aculeatus CBS 101.43 auch sehr wirksame, den Rückstand löslich machende Enzyme, Cellulasen, Pectinasen und Hemicellulasen neben der SPS-ase bildet und dass der mit Hilfe von Asp. aculeatus CBS 101.43 gebildete Enzymkomplex ausserordentlich gut geeignet ist als Mittel zur Zellwandzerstörung von pflanzlichen Materialien. So kann der von Asp. aculeatus CBS 101.43 gebildete Komplex angewandt werden in der nahrungsmittelverarbeitenden Industrie zur Behandlung von Frucht- und Gemüsemische und zur Klärung und Viskositätsverringierung bei der Verarbeitung von Fruchtsaft und Wein mit ausgezeichneten Ergebnissen. Er kann ausserdem angewandt werden als Entwässerungsmittel (d.h. Mittel zum Abbau von Polysacchariden und damit zur Freisetzung des in der polymeren Struktur der Polysaccharide gebundenen Wassers bei der Verarbeitung von Gemüsen). Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer SPS-ase in einem Verfahren zum Abbau von Polysacchariden, vorzugsweise Pflanzen-Zellwand-Polysacchariden, mit Hilfe einer Carbohydrase, wobei ein SPS-ase-haltiges Mittel nach der Erfindung in einem wässrigen Medium mit einem Substrat für das SPS-ase-Zubereitung zusammengebracht wird.

So hat es sich gezeigt, dass SPS-ase-Zubereitungen wertvolle Enzymzubereitungen zur teilweisen oder vollständigen

Verflüssigung oder Abbau von verschiedenen Materialien, vorzugsweise pflanzlichen Materialien, z.B. Früchte- und Pflanzen-Abfälle, die Protein, Cellulose, Hemicellulose (z.B. Glucane, Xylan, Galactane und Araban), Gummen, Pectin, Lipide, Inulin, Polyphenole, Stärke und Alginate enthalten, sind und für damit verwandte Zwecke (siehe die später angegebene Tabelle). Als Beispiele für solche verwandte Zwecke können alle Zwecke erwähnt werden, bei denen heute kommerzielle Pectinasen und Cellulasen angewandt werden.

10 Einige Beispiele sind später angegeben.

Im Zusammenhang mit dem Extraktions-(Isolier-)Verfahren, das z.B. in Beispiel 2 beschrieben ist, wurde festgestellt, dass die SPS-ase-Zubereitung im wesentlichen proteinasefrei ist, auf Grund der Tatsache, dass das gewünschte Endprodukt, 15 d.h. das Protein, sonst abgebaut würde. Ähnlich sollte, wenn andere biologische Materialien als Protein aus einem biologischen Rohmaterial extrahiert (isoliert) werden, die angewandte SPS-ase-Zubereitung im wesentlichen frei sein von Enzymen, die diese anderen biologischen Materialien abbauen. Solche modifizierte SPS-ase-Zubereitungen können gebildet werden durch selektive Inaktivierung des unerwünschten Enzyms, durch Fraktionierung oder andere an sich bekannte Verfahren.

So ist eine bevorzugte Anwendung nach der Erfindung 25 gekennzeichnet durch die Tatsache, dass der Abbau erreicht wird durch Isolierung oder Extraktion eines anderen biologischen Materials als Sojaprotein und verwandte pflanzliche Proteine aus einem biologischen Rohmaterial, wobei die SPS-ase-Zubereitung im wesentlichen frei ist von Enzymen, die im 30 Stande sind, das biologische Material abzubauen.

So hat es sich gezeigt, dass die modifizierten SPS-ase-Zubereitungen (modifiziert in dem Sinne, dass sie im wesentlichen frei sind von Enzymen, die im Stande sind, das zu extrahierende oder zu isolierende biologische Material abzubauen), wertvolle Enzymzubereitungen darstellen zur Extraktion (Isolierung) von speziellen biologischen Materialien z.B. Stärke, Lipiden, Geschmacksstoffen, Farbstoffen und Säften aus biologischen Rohmaterialien. Verschiedene Beispiele hierfür sind später angegeben.

40 Erfindungsgemäss ist es bevorzugt, dass eines oder mehrere der Reaktionsprodukte (unbeachtlich, ob es erwünschte Endprodukte oder Nebenprodukte sind) gleichzeitig mit oder nach der Enzymbehandlung weiterbehandelt werden. Hierdurch wird eine flexiblere und besser anpassbare Arbeitsweise ermöglicht. Diese weitere Behandlung ist vorzugsweise eine alkoholische Fermentation, wenn eines der Reaktionsprodukte ein fermentierbares Zucker ist. Hierdurch erhält man ein billiges Verfahren zur Herstellung von Alkohol.

Um das Wesen der Erfindung näher zu erläutern, wird auf 50 die folgenden Abschnitte 1 bis 10 Bezug genommen, die jeweils Details im Zusammenhang mit der Erfindung beschreiben:

1. Herstellung von SPS.

2. Charakterisierung von SPS, insbesondere Molekulargewichtsverteilung.

3. Nachweis, dass SPS und APS unterschiedliche Verbindungen sind.

4. Auswahl von SPS-ase-bildenden Mikroorganismen.

5. Charakterisierung einiger SPS-ase-bildender Mikroorganismen.

6. Allgemeine Beschreibung der Überlagerungstechnik bei der Immunoelektrophorese.

7. Immunoelektrophoretische Charakterisierung von SPS-ase mit polyspezifischem Antikörper und Überlagerung.

65 8. Reinigung einer SPS-ase-Zubereitung.

9. Abhängigkeit der SPS-ase-Aktivität von pH-Wert und Temperatur sowie Stabilität der SPS-ase.

10. Enzymatische Aktivitätsbestimmungen.

Abschnitt 1

Herstellung von SPS

Wie oben erwähnt, kann das Ausgangsmaterial für die Herstellung von SPS Sojarückstand (Bestandteile ausser Protein) sein. Daher wird in erster Linie die Herstellung von Sojarückstand beschrieben.

Sojarückstand ist die proteinfreie Kohlenhydrat-Fraktion (die in der Praxis kleine Mengen an Lignin und Mineralien enthalten kann) in entfettetem und enthülltem Sojamehl. Diese Kohlenhydratfraktion ist unlöslich in einem wässrigen Medium bei pH 4,5 und kann auf folgende Weise hergestellt werden, wobei auf das Fliessschema 1 verwiesen wird.

Entfettetes Sojamehl (Sojamehl 13 der Aarhus Oliefabrik A/S) wird in entionisiertem Wasser von 50 °C in einem Gewichtsverhältnis Sojamehl zu Wasser = 1:5 in einem Tank mit einem pH-Stat unter Temperaturregelung suspendiert. Der pH-Wert wird mit 4n NaOH (I) auf 8,0 eingestellt. Jetzt wird mit Hilfe von Alkalase 0,6 L (einem proteolytischen Enzym auf der Basis von *B. licheniformis* mit einer Aktivität von 0,6 Anson-Einheiten/g, bestimmt nach dem Anson-Verfahren, beschrieben in Novo Enzyme Information IB Nr. 058 e-GB) eine Hydrolyse unter konstantem pH-Wert durchgeführt, wobei das Verhältnis Enzym:Substrat 4% der Menge an Protein in dem Sojamehl (II) beträgt. Nach einer Hydrolysezeit von 1 h wird die Aufschämmung abzentrifugiert (III) und gewaschen (IV), wobei diese Massnahmen zweimal wiederholt werden. (V, VI, VII). Die so erhaltene Aufschämmung wird ein weiteres Mal 1 h mit Alkalase 0,6 L hydrolysiert (VIII, IX), ähnlich wie oben angegeben. Dann wird die Aufschämmung abzentrifugiert (X) und zweimal gewaschen (XI, XII, XIII, XIV) und die nach der letzten Waschstufe erhaltene Aufschämmung (6) sprühgetrocknet (XV). Das so erhaltene sprühgetrocknete Pulver ist der Sojarückstand, der als Ausgangsmaterial zur Herstellung von SPS dient.

SPS ist die wasserlösliche Polysaccharid-Fraktion, die erhalten wird, durch übliche Behandlung des oben angegebenen Sojarückstands mit Pectinase. Das SPS wird auf folgende Weise mit Hilfe der im Folgenden angegebenen 14 Reaktionsstufen erhalten. Hierbei wird auf das Fliessschema 2 Bezug genommen.

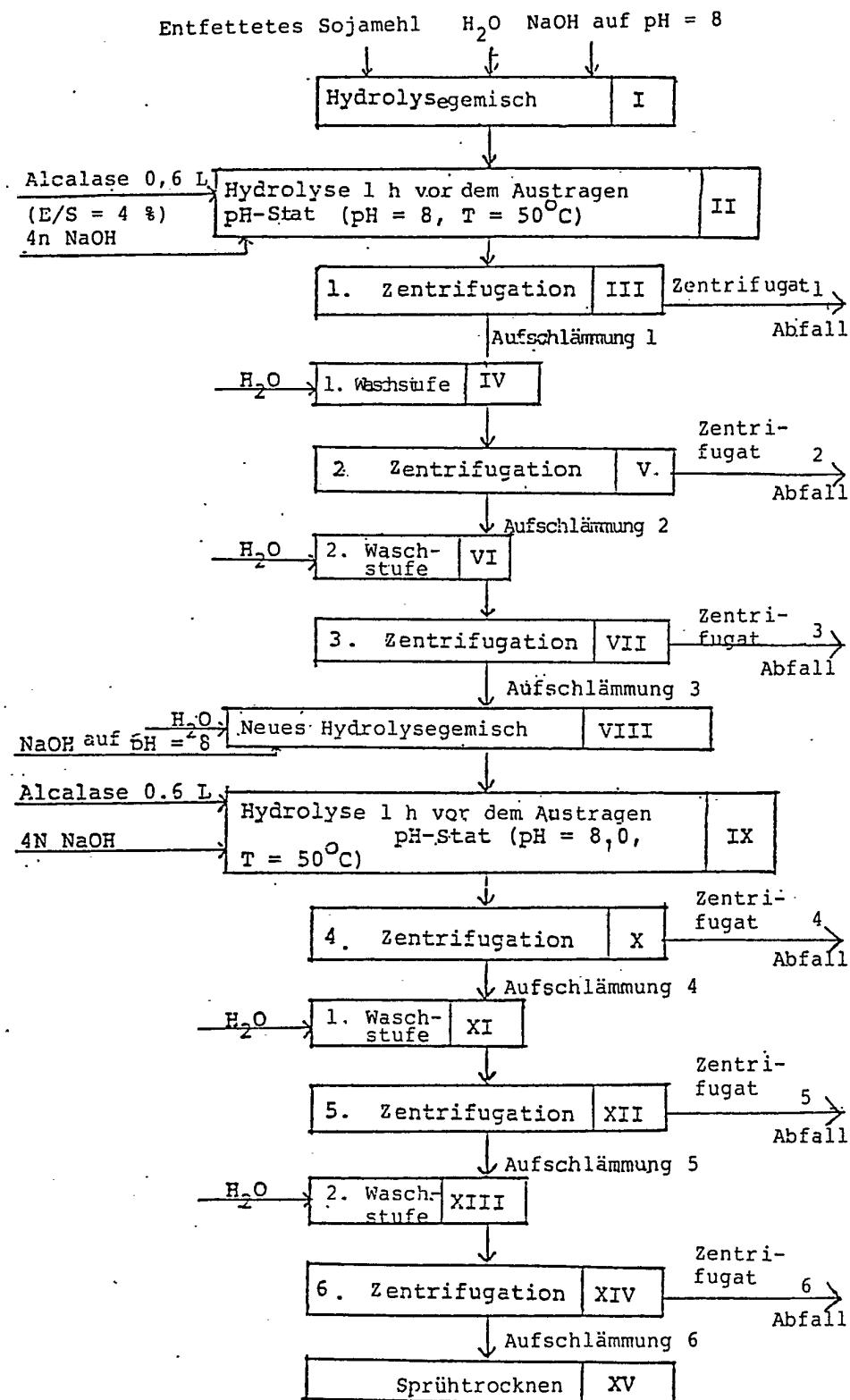
1. Der Gehalt an trockenen Bestandteilen in dem oben erwähnten Sojarückstand wird bestimmt, und der Sojarückstand mit Wasser auf einen Gehalt von 2% Feststoffe verdünnt und in einem Tank mit Temperaturregelung auf 50 °C gehalten.

2. Der pH-Wert wird mit 6n NaOH auf 4,50 eingestellt.
3. Pectinex Super conc. L wird in einer Menge von 200 g/kg Feststoffe zugegeben (eine handelsübliche Pectinase

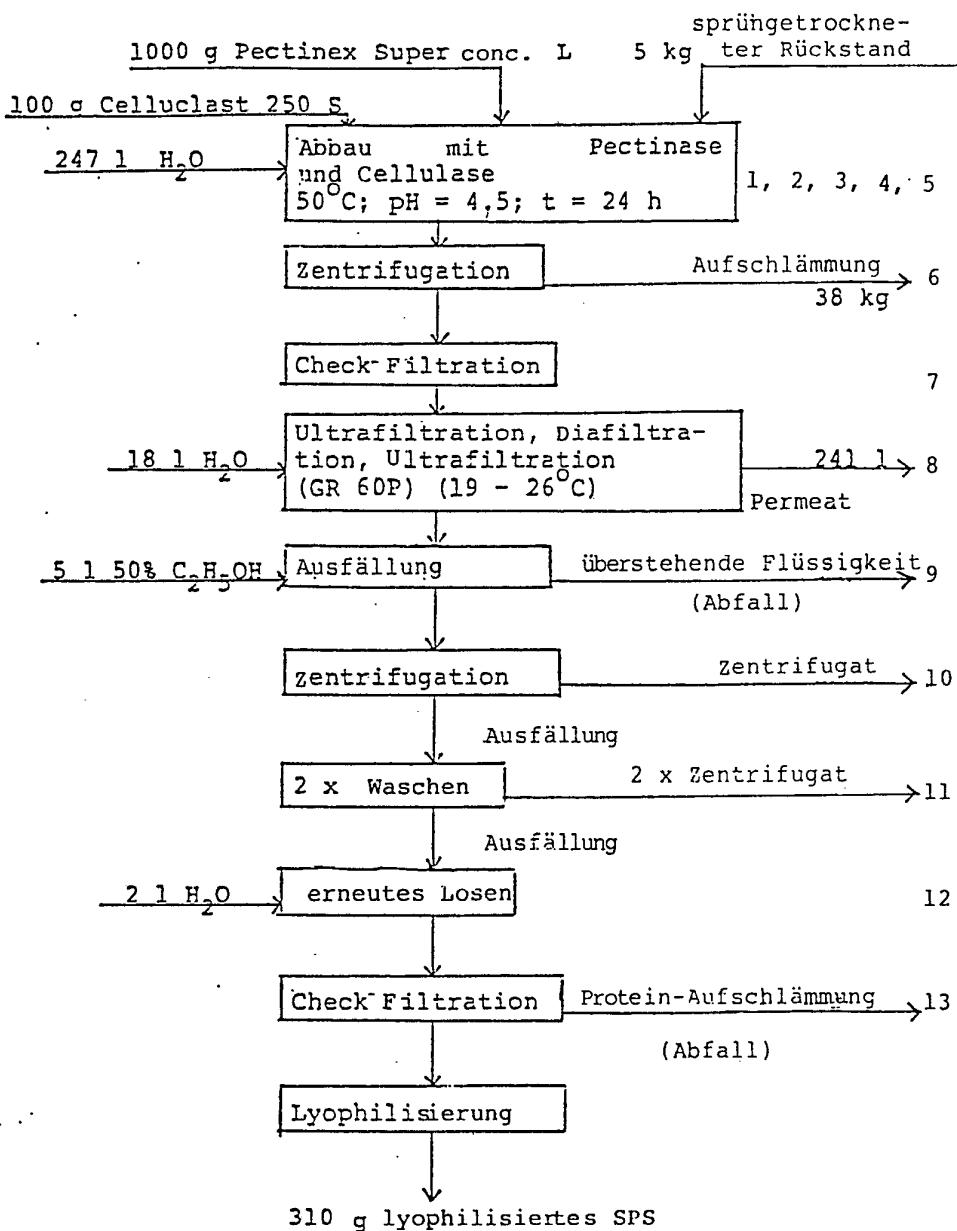
der Schweizerischen Ferment AG, Basel, mit einer Pectinase-Aktivität von 750 000 MOU, bestimmt nach dem Prospekt «Determination of the Pectinase units on Apple Juice (MOU)» vom 12.6.1981, erhältlich von Schweizerische Ferment AG, Basel). Es wird ferner Celluclast 200 L in einer Menge von 20 g/kg Trockensubstanz zugegeben (eine handelsübliche Cellulase, beschrieben in dem Prospekt NOVO Enzyme, Informationsblatt B 153 e-GB 1000, Juli 1981, erhältlich von Novo Industri A/S, Dänemark).

- 10 4. Der Tankinhalt wird 24 Stunden unter Röhren auf 50 °C gehalten.
- 5 5. Die Enzyme werden durch Erhöhung des pH-Werts auf 9,0 mit 4n NaOH inaktiviert. Das Reaktionsgemisch wird 30 min stehengelassen und der pH-Wert dann wieder mit 6n HCl auf 4,5 eingestellt.
6. Das Reaktionsgemisch wird zentrifugiert und sowohl das Zentrifugat (überstehende Flüssigkeit) als auch der Rückstand (Schlamm) gesammelt.
7. Das Zentrifugat aus Stufe 6 wird zur Untersuchung über eine Filterpresse filtriert (das Filter wurde vor der Filtration mit Wasser gewaschen).
8. Das Filtrat wird ultrafiltriert, diafiltriert und nochmals ultrafiltriert über eine Membran mit einem Trennwert von 30 000 (DDS GR 60-P der Danske Sukkerfabrikker), wobei die folgenden Parameter angewandt werden:
 1. Ultrafiltration auf eine Volumenkonzentration von 6.
 2. Diafiltration bis der Prozentsatz an Trockensubstanz in dem Permeat 0 beträgt (0° Brix).
 3. Ultrafiltration auf ungefähr 15% Feststoffgehalt in dem Konzentrat.
9. Die Temperatur beträgt 50 °C, der pH-Wert 4,5 und der mittlere Druck 3 bar.
10. Der Niederschlag wird mit Hilfe einer Zentrifuge gesammelt.
11. Der Niederschlag wird zweimal mit 50% (Vol/Vol) Ethanol in H₂O gewaschen, entsprechend dem Volumen des Zentrifugats aus Stufe 10, d.h. es werden zwei Zentrifugierstufen durchgeführt.
12. Der gewaschene Niederschlag wird erneut in Wasser gelöst, mit einem Volumen entsprechend dem Volumen des ultrafiltrierten Konzentrats der Stufe 9.
13. Die Flüssigkeit der Stufe 12 wird zur Untersuchung über ein Glasfilter filtriert.
14. Das klare Filter, enthaltend reines SPS, wird lyophilisiert.

F l i e ß s c h e m a I



F l i e ß s c h e m a II



Abschnitt 2
Charakterisierung von SPS und besonders Molekulargewichtsverteilung

Durch Gel-Chromatographie mit Hilfe einer HPLC Vorrichtung (Waters Pumpe Model 6000, Waters Daten Modul 730 und Waters Refraktometer R 401) wurde die Molekulargewichtsverteilung des SPS, dessen Herstellung wie in der Beschreibung angegeben, durchgeführt wurde, bestimmt (Fig. 4). Mit Hilfe der gleichen Methode wurde auch die Molekulargewichtsverteilung der mit Hilfe von SPS-ase erhaltenen Abbauprodukte von SPS bestimmt (Fig. 5). Außerdem wurde mit Hilfe der gleichen Methode der Anlagerungseffekt zwischen Sojaprotein und SPS (Fig. 6) und das Nichtvorhandensein des Anlagerungseffekts zwischen Sojaprotein und SPS, das mit Hilfe des erfundungsgemäßen Mittels abgebaut worden war, (Fig. 7) gezeigt.

Die Eich-Kurve (der Logarithmus des Molekulargewichts gegen R_f , wobei der R_f -Wert für Glucose willkürlich als 1 definiert ist und der R_f -Wert für ein spezielles Dextran als die Retentionszeit für dieses Dextran, dividiert durch die Reten-

tionszeit für Glucose definiert ist) wurde konstruiert mit Hilfe verschiedener Standard-Dextrane mit bekanntem Molekulargewicht (T 4, T 10, T 40, T 70, T 110, T 500) der Pharmacia Fine Chemicals Ab, Box 175, S-75104, Uppsala, Schweden. Der R_f -Wert für das Maximum jedes Dextran-Peaks wurde festgestellt und das entsprechende Molekulargewicht berechnet als $\sqrt{\bar{M}_w \cdot \bar{M}_n}$, wobei \bar{M}_w das Gewichtsmittel des Molekulargewichts und \bar{M}_n , das Zahlenmittel für das Molekulargewicht ist. Als Eluens für dieses Chromatographieverfahren wurde 0,1 m NaNO₃-Lösung angewandt. Die für die Chromatographie angewandten Säulen waren 60 cm PW 5000 und anschliessend 60 cm PW 3000 der Toyo Soda Manufacturing Co., Japan. Auf diese Weise wurde die Beziehung zwischen dem Molekulargewicht und dem R_f -Wert für die oben angegebenen Dextrane aufgestellt, siehe Fig. 3.

Auf der Basis der Fig. 4 kann berechnet werden, dass SPS eine Molekulargewichtsverteilung besitzt, die zu einem Wert von \bar{M}_w von ungefähr $5,4 \times 10^5$ und einem Wert für \bar{M}_n von ungefähr $4,2 \times 10^4$ führt. Aus dieser Figur geht auch hervor, dass das Chromatogramm zwei deutliche Peaks bei Reten-

tionszeiten von 34,5 min (6%), entsprechend einem Molekulargewicht von ungefähr 5×10^6 und eine Retentionszeit von 47,12 min (67%), entsprechend einem Molekulargewicht von rund $4,9 \times 10^4$ zeigt. Aus dieser Kurve geht hervor, dass zwischen diesen beiden Peaks eine Schulter existiert, bei einer Retentionszeit von 41,25 min (27%), entsprechend einem Molekulargewicht von $2,8 \times 10^5$.

Nach dem Abbau des SPS mit SPS-ase wurde das Hydrolysegemisch durch eine Membran filtriert und das Filtrat chromatographiert. Es zeigte sich, dass ungefähr 55% des SPS zu Mono-, Di- und Trisacchariden abgebaut waren, und dass die verbleibenden 45% zu einem Polymer abgebaut worden waren mit drei Peaks mit den folgenden Molekulargewichten: 5×10^4 , 10^4 und $4,4 \times 10^3$, siehe Fig. 5.

Um den Anlagerungs- bzw. Bindungseffekt zwischen Sojaprotein und SPS zu zeigen und die wesentliche Verringerung des Anlagerungseffekts zwischen Sojaprotein und SPS, das mit Hilfe einer SPS-ase abgebaut worden war, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

3% SPS in 0,10 m Acetatpuffer bei pH 4,5 wurden zu einer Aufschämmung von Sojaisolat (Purina E 500) gegeben, um eine Suspension mit einem Verhältnis Isolat zu SPS von 10:1 zu erhalten. Diese Suspension wurde 18 h auf einem Schüttelbad bei 50 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension zentrifugiert und die klare überstehende Flüssigkeit durch HPLC, wie oben beschrieben, analysiert. Aus einem Vergleich der Fig. 6 mit Fig. 4 geht hervor, dass das SPS vollständig an das Sojaisolat adsorbiert ist.

Das gleiche Verfahren, wie in dem vorhergehenden Absatz angegeben, wurde mit einer 3prozentigen SPS-Lösung durchgeführt, die mit einer SPS-ase hydrolysiert worden war, die gebildet worden war von CBS 101.43 (Fig. 7). Ein Vergleich zwischen Fig. 7 und Fig. 5 zeigt, dass keine Verbindung in dem hydrolysierten SPS mit einem Molekulargewicht unter etwa 10^4 an das Sojaisolat adsorbiert war. Die Hydrolyse verringert die quantitative Anlagerung auf etwa 10 bis 15%, bezogen auf die Anlagerung von SPS an Sojaprotein.

Die NMR-Analyse des SPS, dessen Herstellung wie in der Beschreibung angegeben, durchgeführt wurde, zeigt die folgende ungefähre Zusammensetzung des SPS.

1. α -Galacturonsäure in einer Menge von etwa 45%, wobei ungefähr 40% der Gesamtmenge der α -Galacturonsäure als Methylester vorliegen.

2. Rhamnopyranose in einer Menge von ungefähr 20%.

3. Galactopyranose in einer Menge von ungefähr 15% und

4. β -Xylopyranose in einer Menge von ungefähr 20%.

Die Bestandteile scheinen in einer Struktur vorzuliegen, umfassend eine Rhamnogalacturon-Hauptkette und Seitenketten aus Xylose und Galactose.

Eine vollständige saure Hydrolyse von SPS (8 h in 1 n H_2SO_4) und anschliessende Analyse durch Dünnschichtchromatographie (TLC) zeigte, dass auch kleinere Mengen der Monosaccharide Fucose und Arabinose in dem hydrolysierten SPS vorhanden waren.

Die HPLC-Analyse des SPS, das durch den SPS-ase-Enzymkomplex, der von CBS 101.43 gebildet war, abgebaut worden war, zeigte eine starke Reduktion des Molekulargewichts. In Übereinstimmung damit, zeigte das NMR-Spektrum des wie oben angegeben abgebauten SPS, dass der Hauptteil der Estergruppen verschwunden war, und dass auch der Gehalt an Xylose und Galactose in dem höhermolekularen Material abgenommen hatte. Das NMR-Spektrum des Teils des SPS-Abbauproduktes, der durch Zugabe von einem Volumen Ethanol zu einem Volumen SPS-Abbauprodukt ausfällt, ist ähnlich dem NMR-Spektrum des SPS mit den oben erwähnten Modifikationen bezüglich der Estergruppen und des Gehalts an Xylose und Galactose.

Abschnitt 3

Dokumentation der Tatsache, dass SPS und APS unterschiedliche Verbindungen sind.

APS wurde hergestellt wie in Agr. Biol. Chem., Bd. 36, 5 Nr. 4 S. 544–550 (1972).

Dieses Polysaccharid und SPS wurden jetzt mit unterschiedlichen Enzymen hydrolysiert, woraufhin das Abbaugemisch durch Gelchromatographie mit Hilfe einer HPLC-Ausrüstung untersucht wurde, wie in Abschnitt 2 «Charakterisierung von SPS, insbesondere Molekulargewichtsverteilung» angegeben.

Im einzelnen wurden die Hydrolysen durchgeführt durch Behandlung von 25 ml Lösung von entweder 2% APS oder 2% SPS in 0,1 m Acetatpuffer, pH 4,5 mit 10 mg KRF 68 oder 15 30 mg Pectolyase. KRF 68 ist eine SPS-ase-Zubereitung, deren Herstellung in Beispiel 1 beschrieben wird. Die Ergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

20	Polysaccharid	Enzym	HPLC Gel-Chromato- gramm	Polysaccharid abgebaut	nicht abgebaut
	APS	Pectolyase	Fig. 8	x	
25	APS	KRF 68	Fig. 9	x	
	SPS	Pectolyase	Fig. 10		x
	SPS	KRF 68	Fig. 5	x	

Abschnitt 4

30 Auswahl von SPS-ase bildenden Mikroorganismen

Der zu untersuchende Mikroorganismus wird auf einem Agar-Schräge-Substrat mit einem Mittel inkubiert, das das Wachstum des Mikroorganismus ermöglicht. Nach einem anfänglichen Wachstum auf dem Agar-Schrägen-Substrat, 35 wird der Mikroorganismus in ein flüssiges Hauptsubstrat überführt, in dem die Hauptkohlenstoffquelle SPS (hergestellt wie angegeben) ist, in dem die Stickstoffquelle NO_3^- , NH_4^+ , Harnstoff, freie Aminosäuren, Proteine oder andere stickstoffhaltige Verbindungen ist und das darüber hinaus ein

40 Gemisch von essentiellen Salzen und Vitaminen, vorzugsweise in Form von Hefeextrakt enthält. Die Zusammensetzung des Hauptsubstrats hängt ab von der Art des Mikroorganismus, wobei der wichtigste Faktor der ist, dass das Hauptsubstrat im Stande sein sollte, das Wachstum und den Metabolismus des Mikroorganismus zu unterstützen. Wenn das Wachstum eine entsprechende Zeitlang in der Größenordnung von 1 bis 7 Tagen stattgefunden hat, je nach der Wachstumsgeschwindigkeit des betreffenden Mikroorganismus,

45 wird eine Probe der Fermentationsbrühe auf SPS-ase nach 50 der enzymatischen SPS-ase-Bestimmung, wie sie in dieser Beschreibung angegeben ist, analysiert oder nach irgend einer anderen SPS-ase-Bestimmung, die «massgeschneidert» ist, für andere spezifische Verwendungen der SPS-ase als die Verwendung als Bestandteil eines Mittels zum Abbau von Soja- 55 rückstand.

Um ein empfindlicheres Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität zu erreichen, sollte die Temperatur auf 40 °C verringert und die Inkubationszeit auf 20 h erhöht werden während der Bestimmung der SPS-ase-Aktivität, 60 wobei Antibiotika zu dem Substrat zugesetzt werden sollten, um eine Infektion zu vermeiden.

Bei Befolgung dieses Testverfahrens können andere SPS-ase-bildende Mikroorganismen gefunden werden, die sowohl zu der Art Aspergillus als auch zu anderen Arten gehören.

65

Abschnitt 5

Charakterisierung einiger SPS-ase bildender Mikroorganismen

Nach der hier angegebenen Suchmethode nach SPS-ase bildenden Mikroorganismen hat es sich gezeigt, dass die im oberen Teil der folgenden Tabelle angegebenen Mikroorga-

nismen SPS-ase-Bildner sind. Die Tabelle enthält auch einen Stamm, der zur Art *Asp. japonicus* gehört, jedoch kein SPS-ase-Bildner ist.

SPS-ase-Bildner ja	Art Asp. japonicus	Identifizierungs- Nummer A 805	Hinterlegungs- Nummer CBS 101.43; DSM 2344	Hinterlegungs- Jahr 1943
x	x	A 1443	IFO 4408; DSM 2346	1950
x	x	A 1384	ATCC 20236; DSM 2345	1969

15

Eine Kurz-Identifizierung der oben angegebenen Stämme findet sich in den folgenden Katalogen:

List of Cultures 1978 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande

Institute für Fermentation Osaka, List of Cultures, 1972, 5. Auflage, 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

The American Type Culture Collection Catalogue of Strains I, 14. Auflage 1980, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852.

Alle oben angegebenen Stämme entsprechen gut der taxonomischen Beschreibung der Arten *Asp. japonicus* und *Asp. aculeatus*, wie sie angegeben sind in The genus *Aspergillus* of Raper and Fennell, 1965 (siehe besonders S. 327-330).

Abschnitt 6

Allgemeine Beschreibung des Überlagerungsverfahrens bei der Immunoelektrophorese

Es wurde ein als Agar-Überlagerungs-Technik (top agar overlay technique) bezeichnetes Verfahren zur Identifizierung von einzelnen Bestandteilen eines Enzymkomplexes durch Kreuz-Immunoelektrophorese mit einem poly-spezifischen Antikörper gegen alle Enzymkomponenten in dem Enzymkomplex entwickelt. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass Enzyme nach der spezifischen Enzym-Antikörper-Bindung noch aktiv sind oder anders gesagt, dass die aktiven Enzymstellen nicht identisch sind mit den Stellen der Enzym-Antikörper-Bindung. Die Enzym-Antikörper-Komplexe werden als deutliche Bögen während der Elektrophorese in dem Gel präzipitiert. Die Gelplatte wird mit löslichem SPS in Agar bedeckt. Nach 20 h langem Erwärmen auf 45 °C in einer Atmosphäre mit einer relativen Feuchtigkeit von 100% erscheint der Bogen mit SPS-ase-Aktivität als klare Zone in der SPS-Deckschicht nach Ausfällung mit einem Gemisch aus gleichen Volumina Ethanol und Aceton bei Betrachtung gegen einen schwarzen Hintergrund. Bögen, die keine SPS-ase-Aktivität besitzen, bleiben unsichtbar.

Abschnitt 7

Immunoelektrophoretische Charakterisierung von SPS-ase mit polypsifischen Antikörpern und Überlagerung

Kaninchen wurden mit dem SPS-ase haltigen Enzymkomplex immunisiert, der erhalten worden war durch Fermentation von *Aspergillus aculeatus* CBS 101.43 wie in Beispiel 1 angegeben (KRF 68) und der polypsifische Antikörper wurde in an sich bekannter Weise gewonnen. Mit Hilfe dieses polypsifischen Antikörpers wurde eine Kreuz-Immunoelektrophorese des Enzymkomplexes, der durch Fermentation von *Asp. aculeatus* CBS 101.43, wie in Beispiel 1 angegeben (KRF 68) erhalten worden war, durchgeführt, wie von N.H. Axelsen et al., in «A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis», 6. Auflage 1977 beschrieben. Es wird auf Fig. 11 verwiesen, die die den unterschiedlichen von dem Mikroorga-

nismus gebildeten Proteinen entsprechenden Bögen zeigt. Mit Hilfe des oben beschriebenen Agar-Überlagerungs- bzw. Überschichtungsverfahrens hat es sich gezeigt, dass die schraffierten Bereiche der SPS-ase entsprechen.

20 Wenn die oben angegebene Hypothese, dass die SPS-ase aus zumindest zwei Enzymen besteht, richtig ist, ist der schraffierte Bereich der Bereich, in dem alle Enzyme, die für die SPS-ase-Aktivität verantwortlich sind, vorliegen. Wenn diese Enzyme bei anderen Arbeitsweisen nach der Erfahrung

25 durch Immunoelektrophorese auf solche Weise getrennt werden sollen, dass sie keinen gemeinsamen Bereich bedecken, kann ein Teil der SPS-ase-Aktivität noch identifiziert werden durch Immunoelektrophorese mit einer Überschichtung sowohl mit SPS als auch einer kommerziellen Pectinase.

30

Abschnitt 8

Reinigung einer SPS-ase-Zubereitung

Die Reinigung der SPS-ase-Zubereitung KRF 92 (siehe Beispiel 1) wurde durch Ionenaustausch durchgeführt. Der Puffer war 50 mM Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan), der mit HCl auf pH 7,0 eingestellt war. Die Säule war eine K 5/30 Säule von Pharmacia, Schweden. Das Ionenaustauschermaterial war DEAE-Trisacryl der LKB, Bromma, Schweden (300 ml). Die Durchflussgeschwindigkeit betrug

40 100 ml/h.

15 g der SPS-ase-Zubereitung KRF 92 wurden in 450 ml H₂O bei 6 °C gelöst und alle weiteren angegebenen Verfahrensstufen zwischen 6 und 10 °C durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit 1 M Tris auf 7,0 eingestellt. Die Säule wurde mit dem Puffer äquilibriert und dann die SPS-ase-Probe auf die Säule aufgegeben. Die optische Dichte (OD₂₈₀) und die Leitfähigkeit wurden an dem Eluat gemessen (siehe Fig. 12). Die Fraktion 1 war das Eluat, das nicht an das Ionenaustauschermaterial gebunden war. Dann wurde die Säule mit 2000 ml

50 Puffer gewaschen, wobei man die Fraktion 2 erhielt. Dann wurde ein 0-500 mM NaCl Gradient gebildet, wobei die Fraktionen 3 bis 9 erhalten wurden. Alle 9 Fraktionen wurden auf 200 ml eingeengt und gegen Wasser bis zu einer Leitfähigkeit von 2 mSi dialysiert (Hollow Fiber DP 2 von Amicon, Massachusetts, USA). Dann wurden die 9 Fraktionen gefriergetrocknet. Nur die Fraktionen 1 und 2 zeigten SPS-ase-Aktivität.

Die Fraktion 1 wurde weiter durch Gelfiltration gereinigt. 1,5 g der Fraktion 1 wurden in 10 ml 50 mM Natriumacetat,

60 pH 4,5 (500 mM KCl) gelöst. Die Säule war eine 2,5 × 100 cm Säule von LKB. Das Füllmaterial für die Gelfiltration war Sephadryl S-200 der Pharmacia, Schweden. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 30 ml/h. Die Fraktionen, die Substanzen mit Molekulargewichten zwischen 70000 und 100 000 enthielten, geeicht mit Globular Proteinen, enthielten einen Enzymkomplex, der als Faktor G bezeichnet wird und der bei Untersuchung nach dem qualitativen Agar-Test SPS nicht abbauen kann. SPS wird jedoch nach dem qualitativen Agar-

65

Test abgebaut, wenn der Faktor G mit einer Pectinase vermischt wird. Es hat sich gezeigt, dass der Faktor G im Stande ist, Galactose, Fucose und einen Teil der Galacturonsäure von SPS abzuspalten, aber das Hauptabbauprodukt ist entsprechend der HPLC-Analyse noch ein hochmolekulares Produkt, das SPS sehr ähnlich ist.

Abschnitt 9

Abhängigkeit der Aktivität von pH-Wert und Temperatur sowie Stabilität einer SPS-ase

Fig. 13 zeigt die pH-Wert-Abhängigkeit der Aktivität der SPS-ase-Zubereitung KRF 68. Von pH 2,7 bis pH 3,5 wurde ein Ameisensäure-Puffer angewandt und von pH 3,7 bis 5,5 ein Acetat-Puffer.

Fig. 14 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur der SPS-ase-Zubereitung KRF 68.

Fig. 15 zeigt die Temperatur-Stabilität der SPS-ase-Zubereitung KRF 68.

Abschnitt 10

Bestimmung der Enzym-Aktivität

Die unten angegebene Tabelle ist eine Zusammenfassung der verschiedenen Enzym-Aktivitäts-Bestimmungen mit Bezug auf die Erfindung.

Enzym	Kurzbeschreibung der Aktivität	Definition der Aktivitäteinheit und Beschreibung der Bestimmung der Enzym-Aktivität			Literatur Nr.
		Allgemein zugänglich	In der später beschriebung erläutert		
SPS-ase	SPS-ase	x			
Rückstand-lösend	SRU SRUM-120	x x			1
Protease	HUT		x		
Cellulase	C _x	x		2	
Pectinase	PU	x		3	
	PGE	x		4	
	UPTE	x		5	
Hemicel-lulase	PEE VHCU	x x		6 7	

Die in obiger Tabelle angegebene Literatur wird in der folgenden Tabelle näher erläutert.

Litera-Identifizierung der tur	Literaturstelle	erhältlich von
Nr.		Novo Industri A/S, Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Denmark

1 Analyseforskrift AF 154/4 of 1981-12-01 x

2 Analytical Biochemistry 84, 522-532 (1978) x
Analytical method AF 149/6-GB of 1981-05-25 x

3 Determination of Pectinase Activity with Citrus Pectin (PU) of 23.3.1976 x

Litera-Identifizierung der tur	Literaturstelle	erhältlich von
Nr.		Novo Industri A/S, Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Denmark
4	Viskosimetrische Polygalacturonase-Bestimmung (PGE) of 10.11.77	x
10	Bestimmung der Pectintranseliminase (UPTE/g) of 24. Sept. 1975	x
15	Determination of the Pectinesterase activity (undated) with initials WJA/GW	x
20	Analytical method AF 156/1-GB	x

Besonders in bezug auf die Bestimmung der Cellulose-25 Aktivität ist zu bemerken, dass die Analyse durchgeführt wurde, wie in AF 149/6-GB angegeben, und dass das Prinzip der Bestimmung erläutert ist in Analytical Biochemistry.

Abschnitt 10a

Bestimmung der Enzymaktivität von SPS-ase

Die Bestimmung der Enzymaktivität von SPS-ase wurde in zwei Stufen durchgeführt, d.h. einem qualitativen Agarplatten-Test und einer quantitativen Bestimmung der SPS-ase-Aktivität, die auf der Messung der Gesamtmenge an freigesetzten Zuckern beruht. Wenn der qualitative Agarplatten-35 Test negativ ist, ist die SPS-ase-Aktivität Null, ungeachtet des Werts, der bei der quantitativen Bestimmung der SPS-ase-Aktivität erhalten wird. Wenn der qualitative Agarplatten-Test positiv ist, ist die SPS-ase-Aktivität gleich dem Wert, der 40 bei der quantitativen Bestimmung der SPS-ase-Aktivität erhalten wird.

I. Qualitativer Agarplatten-Test

Eine SPS-Agarplatte wurde folgendermassen hergestellt:
45 Es wurde ein Puffer B hergestellt durch Einstellen von 0,3 m Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,5 mit Hilfe von 1 n NaOH. 1 g SPS wird in 20 ml B gelöst. 1 g Agarose (HSB Litex) wird mit 80 ml B vermischt und unter Rühren zum Siedepunkt erhitzt. Wenn sich die Agarose gelöst hat, wird die 50 SPS-Lösung langsam zugegeben. Die erhaltene 1%ige SPS-Agarose-Lösung wird in ein Wasserbad von 60 °C gestellt. Die Platten werden jetzt durch Ausgiessen von 15 ml der 1%igen SPS-Agarose-Lösung auf eine waagrecht liegende Glasplatte von 10 × 10 cm hergestellt. Dann werden neun 55 Löcher im Abstand von 2,5 cm in die verfestigte Schicht der SPS-Agarose gestanzt. In jede Vertiefung werden 10 µl einer 1%igen Lösung des auf die SPS-ase-Aktivität zu untersuchenden Enzymproteins gegeben. Die Platte wird 18 h bei 50 °C und einer relativen Feuchtigkeit von 100% inkubiert. Jetzt 60 wird noch nicht abgebautes SPS mit Hilfe einer Lösung von gleichen Volumina Ethanol und Aceton ausgefällt. Der SPS-ase-Agarplatten-Test ist positiv für eine Probe in einer bestimmten Vertiefung, wenn eine klare ringförmige Zone um diese Vertiefung entsteht.

65 II. Test zur quantitativen Bestimmung der SPS-ase-Aktivität
Der Zweck dieses Versuches liegt in der Bestimmung der Enzymaktivität, die imstande ist, SPS in einem solchen Mass

abzubauen, dass die Abbauprodukte eine stark verringerte oder keine Adsorption oder Bindungsaaffinität an Sojaprotein zeigen. Versuche haben gezeigt, dass der Teil der SPS-Abbauprodukte, der durch ein Gemisch gleicher Volumina Wasser und Ethanol nicht ausgefällt wird, keine Adsorptions- oder Bindungsaaffinität gegenüber Sojaprotein besitzt.

Die SPS-ase-Bestimmung beruht auf der Hydrolyse von SPS unter Standardbedingungen und anschliessende Ausfällung des Teils des SPS, der nicht hydrolysiert worden ist, mit Ethanol. Nach der Ausfällung wird der Gehalt an nicht ausgefällten Kohlenhydraten bestimmt durch quantitative Analyse auf den Gesamtzuckergehalt (nach AF 169/1, der Novo Industri A/S, 2800 Bagsvaerd).

Die Standardbedingungen sind:

Temperatur: 50 °C

pH: 4,5

Reaktionszeit: Vergleich 210 min nur mit Substrat, anschliessend 2 min mit zugesetztem Enzym, Hauptwert 212 min.

Die Vorrichtung umfasst:

Thermostatisch geregeltes Rüttel-Wasserbad von 50 °C

Magnetrührer

Zentrifuge

Eis-Wasser-Bad

Die Reagenzien umfassen:

Puffer: 0,6 m Essigsäure in entmineralisiertem Wasser (a), 1,0 m NaOH (b)

Substrat: Der pH-Wert von 50 ml a wird mit b auf 4,5 eingestellt, dann werden 4,0 g SPS zugegeben und nach Lösung des SPS wird der pH-Wert wieder auf 4,5 eingestellt und das Volumen mit entionisiertem Wasser auf 100 ml gebracht.

Abbruch-Reagenz: Absolutes Ethanol.

Eine SPS-ase-Einheit (SAE oder SPSU) ist definiert als die SPS-ase-Aktivität, die unter den oben angegebenen Standardbedingungen eine Menge an in 50%igem Ethanol löslichen Kohlenhydrat, entsprechen 1 µMol Galactose pro Minute freigesetzt.

Selbst wenn der Anfangsteil der Enzym-Standardkurve gerade ist, ist festzustellen, dass er den (0,0) Punkt nicht schneidet.

Abschnitt 10 b

Enzymatische Bestimmung der den Rückstand lösenden Aktivität ausgedrückt als SRUM 120.

Prinzip: Bei dem Verfahren zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität wird der unlösliche Anteil an entfettetem deproteinisiertem und enthülltem Sojamehl unter Standardbedingungen hydrolysiert. Die Enzymreaktion wird mit dem Abbruchreagenz abgebrochen und der unlösliche Anteil abfiltriert. Die Menge an gelösten Polysacchariden wird spektrophotometrisch bestimmt nach Säure-Hydrolyse entsprechend AF 169/1, der Novo Industri A/S, 2880 Bagsvaerd.

Entsprechend dem Verfahren werden Carbohydrasen mit Endo- sowie Exoaktivität bestimmt.

Das Substrat für diese Enzymbestimmung ist identisch mit dem für das SRU-Verfahren beschriebenen Rückstandssubstrat. Das Substrat wird als 3%ige Lösung in dem unten erwähnten Citratpuffer gelöst:

0,1 n Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,5

5,24 Citronensäure 1-hydrat (Merck Art 244)

8,12 g Dinatriumhydrogenphosphat 2-Hydrat (Merck Art 6580)

ad 11 entmineralisiertes Wasser

pH 4,5 ± 0,05

14 Tage stabil.

Das Abbruchreagenz besitzt die folgende Zusammensetzung:

100 ml 0,5 n NaOH

200 ml 96% Ethanol

Bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahren.

5 Standardbedingungen

Temperatur: 50 °C

pH: 4,5

Reaktionszeit:

Probe 120 min, Blindprobe 5 min

10 Definition der Einheit

Eine Sojarückstand-lösende-Einheit (SRUM) 120 (M für manuell) ist die Menge Enzym, die unter den angegebenen Reaktionsbedingungen pro Minute gelöste (solubilisierte) Polysaccharide entsprechend 1 µMol Galactose freisetzt.

15 Abschnitt 10c

Enzymatische Bestimmung der proteolytischen Aktivität.

HUT-Messung

20 Verfahren zur Bestimmung von Proteinase in saurem Medium

Das Verfahren beruht auf dem Abbau (Digestion) von denaturiertem Hämoglobin durch das Enzym bei 40 °C, pH 3,2 innerhalb von 30 min. Das nicht abgebaut Hämoglobin wird mit 14%iger Trichloressigsäure (Gew./Vol.) ausgefällt.

25 Alle Enzymproben werden hergestellt durch Lösen in 0,1 m Acetat-Puffer, pH 3,2.

Das Hämoglobinsubstrat wird hergestellt unter Verwendung von 5,0 g lyophilisiertem Rinder-Hämoglobin-Pulver konserviert mit 1% Thiomersalat und 100 ml entmineralisiertem Wasser und 10 min gerührt, wobei der pH-Wert anschliessend mit 0,33 n HCl auf 1,7 eingestellt wird.

Nach weiterem 10 min langem Rühren wird der pH-Wert mit 1 n NaOH auf 3,2 eingestellt. Das Volumen dieser Lösung wird mit 0,2 m Acetatpuffer auf 200 ml erhöht. Dieses Hämoglobin-Substrat muss im Kühlschrank aufbewahrt werden, wo es sich 5 Tage hält.

Das Hämoglobin-Substrat wird auf Raumtemperatur gebracht. Zum Zeitpunkt Null werden 5 ml Substrat in ein Reagenzröhrlchen gegeben, das 1 ml Enzym enthält. Nach 1 s langem Schütteln wird das Röhrchen 30 min in ein Wasserbad von 40 °C gegeben. Nach genau 30 min werden 5 ml 14%ige Trichloressigsäure in das Reaktionsröhrlchen gegeben, das dann geschüttelt und 40 min auf Raumtemperatur gebracht wird.

45 Für die Blindprobe wird das Hämoglobin-Substrat auf Raumtemperatur gebracht. Zum Zeitpunkt Null werden 5 ml des Substrats in ein Reagenzröhrlchen, enthaltend 1 ml Enzym, gegeben. Nach 1 s langem Schütteln wird das Röhrchen 5 min in ein Wasserbad von 40 °C gestellt. Nach genau 5 min werden 5 ml 14% Trichloressigsäure in das Reagenzglas gegeben, das dann geschüttelt und 40 min auf Raumtemperatur gebracht wird.

Nach 40 min werden die Blindproben und die Proben geschüttelt, ein- oder zweimal durch Berzelius-Filter Nr. 0 filtert und in ein Spektrophotometer gegeben. Die Probe wird gegenüber der Blindprobe bei 275 nm abgelesen, während das Spektrophotometer gegen Wasser eingestellt ist.

60 Da die Absorption von Tyrosin bei 275 nm ein bekannter Faktor ist, ist es nicht notwendig, eine Tyrosin-Standardkurve zu bilden, soweit es nicht erforderlich ist, das Beckman-Spektrophotometer zu überprüfen.

Berechnungen

1 HUT ist die Enzymmenge, die in 1 min ein Hydrolysat bildet, das in der Absorption bei 275 nm einer Lösung von 1,10 µg/ml Tyrosin in 0,006 n HCl entspricht. Dieser Absorptionswert beträgt 0,0084. Die Reaktion sollte bei 40 °C und pH 3,2 30 min lang ablaufen.

$$\text{HUT} = \frac{\text{Probe-Blindprobe} \times \text{Vol. in ml}}{0,0084 \text{ Reaktionszeit in min}}$$

$$\text{HUT} = \frac{\text{Probe-Blindprobe} \times \frac{11}{30}}{0,0084} = (\text{P-B}) \times 43,65$$

$$\text{HUT/g Enzym} = \frac{(\text{P-B}) \times 43,65}{\text{g Enzym in 1 ml}}$$

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Proteasestabilität in KRF 68 vom pH-Wert durch die HUT-Analyse mit pH-Werten von 2,0 bis 8,0 zeigte, dass die Stabilität der Protease oberhalb pH 8,0 sehr gering war, siehe Fig. 16.

Zur näheren Erläuterung der Erfindung wird auf die folgenden Beispiele 1 bis 8 verwiesen, wobei Beispiel 1 die Herstellung von SPS-ase erläutert und die Beispiele 2 bis 8 die Anwendung der SPS-ase auf ein Soja-Ausgangsmaterial erläutern, um ein gereinigtes pflanzliches Protein zu erhalten. Andere Anwendungen der SPS-ase sind in dem Abschnitt zwischen Beispiel 8 und der Zusammenfassung der Figuren angegeben.

Es wurden einige Fermentationen mit den hier angegebenen Stämmen von Asp. aculeatus und Asp. japonicus im Labormassstab durchgeführt. Hierbei erhielt man Mittel, enthaltend SPS-ase, entsprechend dem hier angegebenen SPS-ase-Test. Da jedoch verhältnismässig grosse Mengen an SPS-ase erforderlich sind, um Anwendungsversuche durchzuführen, wurden ähnliche Versuche im Pilotmassstab durchgeführt, siehe das folgende Beispiel 1.

Beispiel 1

Herstellung von SPS-ase in einer Pilotanlage.

Eine SPS-ase wurde durch Submers-Fermentation von Aspergillus aculeatus CBS 101.43 hergestellt.

In einem Fernbach-Kolben wurde ein Agar-Substrat der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

Pepton Difco	6 g
Aminolin Ortana	4 g
Glucose	1 g
Hefeextrakt Difco	3 g
Fleischextrakt Difco	1,5 g
KH ₂ PO ₄ Merck	20 g
Malzextrakt Evers	20 g
entmineralisiertes H ₂ O ad	1000 ml

Der pH-Wert wurde zwischen 5,3 und 5,35 eingestellt. Dann wurden 40 g Agar (Difco) zugegeben und das Gemisch 20 min im Autoklaven bei 120 °C behandelt. Das Substrat wird als E-Agar bezeichnet.

Der Stamm CBS 101.43 wurde auf einer E-Agar-Schräge (37 °C) gezüchtet. Die Sporen von der Schrägen wurden in sterilisierter Magermilch suspendiert und die Suspension in Gläsern lyophilisiert. Der Inhalt einer Ampulle mit lyophilisiertem Inhalt wurde in den Fernbach-Kolben gegeben. Der Kolben wurde dann 13 Tage bei 30 °C inkubiert.

Es wurde ein Substrat mit der folgenden Zusammensetzung in einem 500-l-Impf-Fermenter hergestellt.

CaCO ₃	1,2 kg
Glucose	7,2 kg
Rofec (Maiswasser-Feststoffe)	3,6 kg
Sojabohnenöl	1,2 kg

Leitungswasser wurde bis zu einem Gesamtvolumen von ungefähr 240 l zugegeben. Der pH-Wert wurde vor der Zugabe von CaCO₃ auf ungefähr 5,5 eingestellt. Das Substrat wurde in dem Impf-Fermenter 1 h bei 121 °C sterilisiert. Das Endvolumen vor der Beimpfung betrug ungefähr 300 l.

Die Sporensuspension aus dem Fernbach-Kolben wurde in den Impf-Fermenter überführt. Die Bedingungen der Impf-Fermentation waren:

5 Fermentortyp:	Üblicher belüfteter und gerührter Fermenter mit einem Verhältnis Höhe:Durchmesser von ungefähr 2,3.
Rühren:	300 UpM (zwei Turbinen-Propellerrührer)
Belüftung:	300 Normal-Liter Luft pro Minute
10 Temperatur:	30 bis 31 °C
Druck:	1,5 bar (0,5 ato)
Zeit:	etwa 28 h

Ungefähr 28 h nach der Beimpfung wurden 150 l aus dem 15 Impf-Fermenter in den Hauptfermenter überführt.

In einem 2500-l-Hauptfermentor wurde ein Substrat der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

Geröstetes Sojamehl	90 kg
20 KHzPO ₄	20 kg
Pluronic	150 ml

Leitungswasser wurde bis zu einem Gesamtvolumen von etwa 900 l zugegeben. Das geröstete Sojamehl wurde in Wasser suspendiert. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt und die Temperatur auf 50 °C erhöht. Daraufhin wurden etwa 925 Anson-Einheiten Alkalase 0,6 L zu der Suspension gegeben. Das Gemisch wurde 4 h bei 50 °C und pH 8,0 (Na₂CO₃ Zugabe) ohne Belüftung unter Normaldruck (null 30 ato) und Rühren mit 100 UpM gehalten. Anschliessend wurden die restlichen Bestandteile des Substrats zugegeben und der pH-Wert mit Phosphorsäure auf ungefähr 6,0 eingestellt. Das Substrat wurde in dem Hauptfermenter 1,5 h bei 123 °C sterilisiert. Das Endvolumen vor der Beimpfung betrug ungefähr 1080 l.

Dann wurden 150 l Impfkultur zugesetzt.

Die Fermentationsbedingungen waren:

40 Fermentortyp:	Üblicher belüfteter und gerührter Fermenter mit einem Verhältnis Höhe:Durchmesser von ungefähr 2,7.
Rühren:	250 UpM (zwei Turbinen-Propellerrührer)
Belüftung:	1200 Normal-Liter Luft pro Minute
Temperatur:	30 °C
45 Druck:	1,5 bar (0,5 ato)
Zeit:	etwa 151 h

Zwischen ungefähr 24 und ungefähr 116 h der Fermentation wurde eine Pectinlösung aseptisch zu dem Hauptfermenter mit konstanter Geschwindigkeit von ungefähr 8 l/h zugeführt. Die Pectinlösung der folgenden Zusammensetzung wurde in einem 500-l-Dosierungstank hergestellt:

Pectin genu*	22 kg
55 Phosphorsäure, konz.	6 kg
Pluronic	50 ml

* Genu pectin (Citrus-Typ NF von The Copenhagen pectin factory Ltd.).

60 Leitungswasser wurde auf ein Gesamtvolumen von etwa 325 l zugegeben. Das Substrat wurde in dem Dosierungstank 1 h bei 121 °C sterilisiert. Das Endvolumen vor dem Beginn der Dosierung bzw. Zugabe betrug ungefähr 360 l. Nach Auseinanderlauf dieser Menge wurde ein zweiter ähnlicher Ansatz hergestellt. Das Gesamtvolumen an Pectinlösung für eine Fermentation betrug ungefähr 725 l.

Nach ungefähr 151 h langer Fermentation wurde die Fermentation abgebrochen. Die ungefähr 1850 l Kulturbrühe wurden auf ungefähr 5 °C gekühlt und die Enzyme nach dem folgenden Verfahren gewonnen.

Die Kulturbrühe wurde mit Hilfe eines Vakuum-Trommelfilters (Dorr Oliver), das mit Filterhilfe (Hy-flo-super-cel Diatomeenerde) beschichtet war, filtriert. Das Filtrat wurde durch Eindampfen auf ungefähr 15% des Volumens der Kulturbrühe eingeengt. Das Konzentrat wurde über eine Seitz-Filterfolie (Type supra 100) mit 0,25% Hy-flo-super-cel als Filterhilfe filtriert (in der folgenden Tabelle als Filtration I bezeichnet). Das Filtrat wurde mit 561 g (NH₄)₂SO₄/l bei pH 5,5 ausgefällt und 4% Hy-flo-super-cel Diatomeenerde als Filterhilfe zugegeben. Der Niederschlag und die Filterhilfe wurden durch Filtration über ein Rahmenfilter getrennt. Der Filterkuchen wurde in Wasser gelöst und unlösliche Bestandteile über ein Rahmenfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde (check) filtriert, über eine Seitz-Filterfolie (type supra 100) mit 0,25% Hy-flo-super-cel als Filterhilfe (in der folgenden Tabelle als

Filtration II bezeichnet). Das Filtrat wurde über eine Ultrafiltrationsvorrichtung diafiltriert. Nach der Diafiltration wurde die Flüssigkeit auf einen Feststoffgehalt von 12,7% eingeengt (in der folgenden Tabelle als Feststoffgehalt im Konzentrat 5 bezeichnet).

Eine fakultative Basenbehandlung zur teilweisen Entfernung der Proteaseaktivität kann zu diesem Zeitpunkt durchgeführt werden. Im Fall, dass die Basenbehandlung angewandt wird, wird sie 1 h bei einem pH-Wert von 9,2 durchgeführt, woraufhin der pH-Wert auf 5,0 eingestellt wird.

Jetzt wird die Flüssigkeit (check) filtriert und zum Zwecke der Keimverminderung filtriert und das Filtrat über eine Gefriertrockenvorrichtung von Stokes gefriergetrocknet.

Es wurden vier Fermentationsansätze in der unten angegebene Weise durchgeführt, wobei der für die Fermentation angewandte Stamm, die Durchführung der fakultativen Basenbehandlung und andere Parameter verändert wurden, wie in der folgenden Tabelle angegeben.

Mikroorganismus	Basenbehandlung ja nein	Code Nr.	Konzentration (%) der Filterhilfe bei Filtration I		Feststoffgehalt im Konzentrat	Anmerkungen
			Ausfällung	Filtration II		
CBS 101.43	x	KRF 68	0,5	5	0,2	28
ATCC 20236	x	KRF 74	2,0	4	0,4	7,5
IFO 4408	x	KRF 83	1,0	5	0,25	12,4
CBS 101.43	x	KRF 92	0,25	4	0,25	12,7

* Nach der Filtration zur Keimverringerung wird das Konzentrat im Verhältnis 1:2,3 eingeengt. Ein kleinerer Teil des eingeengten Filtrats wurde sprühgetrocknet und der verbleibende Rest wurde gefriergetrocknet.

Um die Proteaseaktivität weiter zu verringern, wurden einige der oben angegebenen Zubereitungen wie unten angegeben behandelt, wobei nur eine der drei Alternativen A, B und C durchgeführt wurde.

A. 100 g SPS-ase-Zubereitung werden in 1 l entionisiertem Wasser unter Röhren bei 10 °C ± 2 °C gelöst. Der pH-Wert wird mit 4 n NaOH auf 9,1 eingestellt. Diese Basenbehandlung wird 1 h lang durchgeführt. Der pH-Wert wird dann mit Eisessig auf 4,5 eingestellt und das Gemisch gegen eiskaltes entionisiertes Wasser bis zu einer Leitfähigkeit von 3 mSi dialysiert. Dann wird (das Produkt) gefroren und lyophilisiert.

B. 500 g SPS-ase-Zubereitung werden in 4 l entionisiertem Wasser unter Röhren bei 10 °C ± 2 °C gelöst. Der pH-Wert wird mit 4 n NaOH auf 9,1 eingestellt. Diese Basenbehandlung wird 1 h lang durchgeführt. Der pH-Wert wird mit Eisessig auf 5,0 eingestellt. Das erhaltene Material wird lyophilisiert.

C. 50 g SPS-ase-Zubereitung werden in 400 ml entionisiertem Wasser unter Röhren bei 10 °C ± 2 °C gelöst. Der pH-

35 Wert wird mit 4 n NaOH auf 9,1 eingestellt. Diese Basenbehandlung wird 1 h lang durchgeführt. Dann wird der pH-Wert mit Eisessig auf 5,7 verringert. Das erhaltene Material wird lyophilisiert.

40 Als Ausgangssubstanz für die Basen-Behandlung angewandte SPS-ase-Zubereitung	Basenbehandlung			Code-Nr.
	A	B	C	
KRF 68	x			KRF 68 BII
KRF 68		x		KRF 68 BIII
KRF 92			x	KRF 92 BI

50 Die oben angegebenen Zubereitungen werden in der folgenden Tabelle durch ihre Enzymaktivitäten nach der Erfindung charakterisiert.

Enzymaktivität je g	KRF 68	KRF 68 BII	KRF 68 BIII	KRF 74	KRF 83	KRF 92	KRF 92 BI
SAE Platten-Test Quantitativer Test	+	+	+	-	+	+	+
SRU	350	301	349	0	168	476	430
SRUM ₁₂₀	737	507	481	142	683	626	757
HUT pH 3,2	2125	1560	1720	578	753	1640	1030
C _x	67000	105	339	1630	12800	5960	397
PU	8000	8044	9396	1320	8040	5700	3092
PGE	10300000	9000000	8800000	840000	7500000	8400000	7600000
UPTE	119400	72000	77700	4100	64600	60000	68800
PEE	78100	83700	76900	15130	327000	44000	62400
VHCU	840	910	770	370	690	1000	790
	1600000	1100000	1000000	656000	2200000	1100000	742000

Beispiel 2 (Anwendungs-Beispiel)

Dieses Beispiel beschreibt die Bildung eines p.v.p. aus einem enthüllten und entfetteten Sojamehl «Sojamel 13» (im Handel erhältlich von Aarhus Oliefabrik A/S). Der Feststoffgehalt dieses Mehls betrug 94,0% und der Gehalt an $(N \times 6,25)$ auf Feststoffbasis betrug 58,7%. Das Sojamehl wurde mit der SPS-ase-Zubereitung KRF 68 BII (Beispiel 1) auf die folgende Weise behandelt:

85,2 g des Sojamehls wurden in 664,8 g Wasser suspendiert und unter Rühren bei 50 °C gehalten und der pH-Wert mit Hilfe von 7,5 ml 6 n HCl auf 4,5 eingestellt. 50 g einer Lösung, enthaltend 4,00 g der erwähnten SPS-ase-Zubereitung wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch dann 240 min bei 50 °C gerührt. Das Gemisch wurde dann in einer

Laborzentrifuge (Beckman Model J-6B) 15 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde gewogen und nach Kjeldahl auf N sowie auf den Feststoffgehalt untersucht. Die feste Phase wurde dann mit einem Volumen Wasser entsprechend der bei der ersten Zentrifugation erhaltenen Menge an überstehender Flüssigkeit gewaschen. Diese Operation wurde zweimal durchgeführt. Die feste Phase wurde dann gefriergetrocknet, gewogen und nach Kjeldahl auf N sowie auf den Feststoffgehalt untersucht in Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, 8000 Aarhus C, Dänemark. Dieses Labor ist vom Staat autorisiert, Futtermittel und Molkeprodukte zu analysieren. Die bei dem Versuch erhaltenen Ergebnisse gehen aus Tabelle 2.1 hervor:

Tabelle 2.1 Ergebnisse

Komponente	Menge g	$N \times 6,25$ (%)	Feststoffe (%)	Ausbeute an Protein (%)	Ausbeute an Feststoffen (%)
Sojamehl	85,2	55,2	94,0	100%	100%
SPS-ase-Zubereitung	4,00	75,6	—	6,4%	—
1. Zentriguat	666	1,50	5,04	21,2%	42,0%
p.v.p.	44,5	87,5	95,7	82,7%	53,2%

So erhielt man ein p.v.p. mit einer Proteinreinheit, d.h. $N \times 6,25$, bezogen auf die Feststoffe, von 91,4% und mit einer Gesamtausbeute an Protein von 83%.

Beispiel 3 (Anwendungsbeispiel)

Dieses Beispiel wurde durchgeführt, um die Proteinausbeuten, die Nährstoffqualität und einige funktionelle Eigenschaften von Sojaproteinprodukten zu vergleichen, die nach den folgenden drei Verfahren hergestellt worden waren.

A. Übliche isoelektrische Ausfällung zur Herstellung von Sojaprotein-Isolat.

B. Übliches isoelektrisches Waschverfahren zur Herstellung von Sojaprotein-Konzentrat.

C. Isoelektrisches Waschverfahren nach der Erfindung, umfassend ein den Rückstand lösendes Enzym zur Bildung von p.v.p.

Um einen wirklichen Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens (C) mit den üblichen Verfahren für Sojaprotein (A und B) zu erhalten, wurde das gleiche Ausgangsmaterial in allen drei Fällen angewandt. Die Versuche wurden auch so durchgeführt, dass entsprechende Temperaturen und Behandlungszeiten in allen drei Fällen angewandt wurden. Lediglich die pH-Werte waren unterschiedlich aufgrund der fundamentalen Unterschiede zwischen den drei Versuchen.

A. Übliche isoelektrische Ausfällung zur Herstellung von Sojaprotein-Isolat

425,8 g Sojamehl (Sojamel 13, hergestellt von Aarhus Oliefabrik A/S) wurden in 3574,2 g Leitungswasser bei 50 °C extrahiert. Der pH-Wert wurde mit 20,1 g 4 n NaOH auf 8,0 eingestellt. Nach 1ständigem Röhren wurde die Aufschlammung bei $3000 \times g$ 15 min unter Verwendung von 4 l-l-B-

chern in einer Laborzentrifuge (Beckman Model J-6B) zentri-
fugiert. Das Zentrifugat I und der Niederschlag I wurden
gewogen. Der Niederschlag I wurde wieder mit Wasser auf
ein Gesamtgewicht von 4000 g extrahiert. Die Temperatur
wurde auf 50 °C gehalten, der pH-Wert mit 4 n NaOH auf 8
eingestellt und die Aufschlammung 1 h gerührt. Das Gemisch
wurde zentrifugiert und das Zentrifugat II und der Nieder-
schlag II wie oben gewogen. Von den Zentrifugaten I und II
und dem Niederschlag II wurden Proben entnommen nach
Kjeldahl und auf den Feststoffgehalt untersucht. Anschlies-
send wurden die Zentrifugate I und II vermischt und auf
50 °C gehalten. Das Protein wurde dann isoelektrisch bei pH
4,5 mit Hilfe von 45 g 6 n HCl ausgefällt. Nach 1ständigem
Röhren bei 50 °C wurde das Protein durch 15 min langes
Zentrifugieren bei $3000 \times g$ gewonnen. Das Zentrifugat III
wurde gewogen und nach Kjeldahl auf N sowie auf den Fest-
stoffgehalt analysiert. Die feste Phase III wurde gewogen und
mit Wasser in einer Menge entsprechend dem Gewicht des
Zentrifugats I gewaschen. Der Waschvorgang wurde durchge-
führt durch 1ständiges Röhren bei 50 °C. Das gewaschene
Protein wurde durch 15 min langes Zentrifugieren bei
3000 × g gewonnen. Das Zentrifugat IV und die feste Phase
IV wurden gewogen. Das Zentrifugat IV wurde nach Kjeldahl
auf N sowie auf den Feststoffgehalt analysiert. Die feste
Phase wurde in 1550 g Wasser von 50 °C suspendiert und der
pH-Wert mit 17 g 4 n NaOH auf 6,5 eingestellt. Das Gemisch
wurde 1 h gerührt und der pH-Wert, soweit erforderlich, wieder
auf 6,5 eingestellt. Schliesslich wurde das Produkt gefrier-
getrocknet, gewogen und nach Kjeldahl auf N sowie auf den
Feststoffgehalt analysiert. Die Berechnungen der Mengenbilanz
sind in Tabelle 3.1 angegeben.

Tabelle 3.1

Berechnung der Mengenbilanz bei der üblichen isoelektrischen Ausfällung zur Herstellung von Sojaprotein-Isolat

Operationen und Fraktionen	Menge der Fraktion g	Protein % (N × 6,25)	Feststoffe (%)	Ausbeute an Protein (%)	Ausbeute an Feststoffen (%)
Extraktion: Sojamehl	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Wasser	3574,2	0	0	0	0
4 n NaOH	20,1	0	16,0	0	0,8
1. Zentrifugation: Σ	4020,1	5,9	10,0	100,9	100,4
Zentrifugat I	3141,0	4,4	6,9	58,8	54,1
Niederschlag I	805,0	—	—	—	—
Re-Extraktion:					
Niederschlag I	805,0	—	—	—	—
Wasser	3195,0	0	0	0	0
2. Zentrifugation:					
Zentrifugat II	3104,0	0,5	0,9	6,6	7,0
Niederschlag II	820,0	9,1	17,2	31,7	35,2
Vermischen und Ansäuern					
Zentrifugate I + II	6245,0	—	—	—	—
6 n HCl	45,0	0	21,3	0	2,4
3. Zentrifugation: Σ	6290,0				
Zentrifugat III	5650,0	0,3	1,9	7,2	26,8
Niederschlag III	308,0	—	—	—	—
Waschen					
Niederschlag III	308,0	—	—	—	—
Wasser	3141,0	0	0	0	0
4. Zentrifugation: Σ	3449,0				
Zentrifugat IV	3113,0	0,04	0,15	0,5	1,2
Niederschlag IV	291,0	—	—	—	—
Neutralisation:					
Niederschlag IV	291,0	—	—	—	—
Wasser	1550,0	0	0	0	0
4 n NaOH	17,0	0	16,0	0	0,7
Trocknen: Pulver	128,0	93,8	96,3	51,1	30,8

40

B. Isoelektrisches Waschverfahren zur Herstellung von Sojaprotein-Konzentrat

425,6 g Sojamehl (Sojamel 13, hergestellt von Aarhus Oliefabrik A/S) wurden in 3574 g Wasser von 50 °C gewaschen. Der pH-Wert wurde mit 44,8 g 6 n HCl auf 4,5 eingestellt. Das Waschen wurde 4 h unter Rühren durchgeführt. Die Aufschämmung wurde dann 15 min in einer Laborzentrifuge (Beckman Model J-6B) bei 3000 × g zentrifugiert, wobei 4 1-l-Becher verwendet wurden. Das Zentrifugat I wurde gewogen und nach Kjeldahl auf N sowie auf den Feststoffgehalt analysiert. Die feste Phase I wurde gewogen und erneut mit Wasser bis zu einem Gesamtgewicht von 4000 g gewa-

schen. Der pH-Wert wurde wieder mit 1,7 g 6 n HCl auf 4,5 eingestellt und die Aufschämmung 30 min bei 50 °C gerührt. Die Masse wurde zentrifugiert und das Zentrifugat II und die Feststoffe II wie oben gewogen. Die feste Phase II wurde 45 erneut in 1575 g H₂O bei 50 °C suspendiert und der pH-Wert mit 34,5 g 4 n NaOH auf 6,5 eingestellt. Das Gemisch wurde 1 h bei 50 °C gerührt und der pH-Wert, soweit notwendig, wieder auf 6,5 eingestellt. Schliesslich wurde das Proteinprodukt gefriergetrocknet, gewogen und nach Kjeldahl auf N 50 sowie auf den Feststoffgehalt analysiert. Die Mengenbilanz ist in Tabelle 3.2 angegeben.

Tabelle 3.2
Berechnung der Mengenbilanz beim isoelektrischen Waschen zur Herstellung von Sojaprotein-Konzentrat

Operationen und Fraktionen	Menge der Fraktion g	Protein % (N × 6,25)	Feststoffe (%)	Ausbeute an Protein (%)	Ausbeute an Feststoffen (%)
Waschen					
Sojamehl	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Wasser	3574,0	0	0	0	0
6 n HCl	44,8	0	21,3	0	2,4
1. Zentrifugation: Σ	4044,6	—	—	—	—
Zentrifugat I	3150,0	0,6	3,2	8,0	25,2
Feststoffe I	846,0	—	—	—	—
erneutes Waschen					
Feststoffe I	846,0	—	—	—	—
Waschen	3154,0	0	0	0	0
6 n HCl	1,7	0	21,3	0	0,1
2. Zentrifugation: Σ	4001,7	—	—	—	—
Zentrifugat II	3130,0	0,1	0,4	1,3	3,2
Feststoffe II	863,0	—	—	—	—
Neutralisation:					
Feststoffe II	863,0	—	—	—	—
Wasser	1575,0	0	0	0	0
4 n NaOH	34,5	0	16,0	0	1,4
Trocknen: Pulver	281,0	72,5	98,4	86,7	69,1

C. Isoelektrisches Waschverfahren unter Verwendung eines den Rückstand lösenden Enzyms zur Bildung von p.v.p.

425,8 g Sojamehl (Sojamel 13, hergestellt von Aarhus Oliefabrik A/S) wurden in 3524,2 g Wasser bei 50 °C gewaschen. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 43,7 g 6 n HCl auf 4,5 eingestellt. 24 g der SPS-ase-Zubereitung KRF 68 BIII (Beispiel 1) wurden in 26 g Wasser gelöst und zu dem Wasch-

gemisch zugegeben. Der Waschvorgang wurde dann 4 h unter 30 Röhren durchgeführt. Anschliessend wurde die Reinigung, wie bei B beschrieben, durchgeführt, wobei die Mengen an 6 n HCl, 4 n NaOH und Wasser zum erneuten Suspendieren die einzigen Parameter mit abweichenden (unterschiedlichen) Werten sind. Die Mengenbilanz ist in Tabelle 3.3 angegeben.

35

Tabelle 3.3
Berechnung der Mengenbilanz bei dem isoelektrischen Waschen einschliesslich des den Rückstand lösenden Enzyms zur Herstellung von p.v.p.

Operationen und Fraktionen	Menge der Fraktion g	Protein % (N × 6,25)	Feststoffe (%)	Ausbeute an Protein (%)	Ausbeute an Feststoffen (%)
Waschen:					
Sojamehl	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Wasser	3540,2	0	0	0	0
6 n HCl	43,7	0	21,3	0	2,3
SPS-ase: KRF 68 BIII	24,0	75,3	96,0	7,7	5,8
1. Zentrifugation: Σ	4043,7	—	—	—	—
Zentrifugat I	3420,0	1,7	5,2	24,7	44,4
Feststoffe I	620,0	—	—	—	—
Erneutes Waschen					
Feststoffe I	620,0	—	—	—	—
Wasser	3380,0	0	0	0	0
6 n HCl	1,3	0	21,3	0	0,1
2. Zentrifugation: Σ	4001,3	—	—	—	—
Zentrifugat II	3400,0	0,2	0,6	2,9	5,1
Feststoffe II	577,0	—	—	—	—
Neutralisation:					
Feststoffe II	577,0	—	—	—	—
Wasser	1700,0	0	0	0	0
4 n NaOH	25,3	0	16,0	0	1,0
Trocknen: Pulver	211,0	87,3 ¹	96,7 ¹	78,2	51,1
		86,9 ²	97,0 ²		

¹ Analyse des Bioteknisk Institut, Holbergsvej 10, DK-6000 Kolding, Denmark.

² Analyse des Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000. Aarhus C. Denmark.

Nährstoffeigenschaften

Die Aminosäurezusammensetzungen der drei Proteinprodukte wurden bestimmt, siehe Tabelle 3.4. Der Gesamtgehalt an essentiellen Aminosäuren, die chemische Bewertung und der Index der essentiellen Aminosäuren (EAAI) wurde berechnet nach dem FAO-Bezugsmuster von 1957.

Der Gehalt an Trypsininhibitor der drei Produkte wurde bestimmt mit Hilfe des in A.O.C.S. Tentative Method Ba 12-75 (A.O.C.S. ist eine Abkürzung für American Oil Chemists' Society) beschriebenen Verfahrens. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 angegeben, die auch die Ausbeuten und das Verhältnis Protein zu Feststoffen der drei Produkte zeigt.

Tabelle 3.4
Zusammensetzung der Aminosäure und Nährbewertung der drei Protein-Produkte A, B und C

Aminosäure	A. Sojaprotein-Isolat g/16 g N	aas ¹	B. Sojaprotein-Isolat g/16 g N	aas ¹	C. Sojaprotein-Isolat (p.v.p.) g/16 g N	aas ¹
Nicht-essentiell						
Aspartinsäure	12,4	-	11,3	-	11,9	-
Serin	4,62	-	4,69	-	4,81	-
Glutaminsäure	21,3	-	18,2	-	17,7	-
Prolin	6,07	-	5,19	-	4,76	-
Glycin	4,13	-	4,26	-	4,33	-
Alanin	3,54	-	4,27	-	4,55	-
Histidin	2,83	-	2,78	-	2,50	-
Arginin	8,09	-	7,57	-	7,04	-
Essentiell						
Isoleucin	4,87	> 100	4,97	> 100	5,19	> 100
Leucin	7,80	> 100	7,98	> 100	8,09	> 100
Lysin	6,24	> 100	6,09	> 100	5,57	> 100
Phenylalanin	5,47	> 100	5,35	> 100	5,17	> 100
Tyrosin	3,38	> 100 > 100	3,88	> 100 > 100	4,44	> 100 > 100
Cystin	1,29	64,5	1,32	66,0	1,44	72,0
Methionin	1,08	49,1 56,4	1,21	55,0 60,2	1,31	59,5 65,5
Threonin	3,10	> 100	3,60	> 100	3,97	> 100
Tryptophan	1,06	75,7	1,37	97,9	1,32	94,3
Valin	4,90	> 100	5,23	> 100	5,57	> 100
% Gesamt-Gehalt der essentiellen Aminosäure	38,36		41,31		42,21	
Chemische Bewertung	56,4%		60,2%		65,5%	
EAAI	86,7%		90,2%		91,3%	

¹ aas = Bewertung der Aminosäure, bezogen auf das FAO-Bezugsmuster (1957)

Tabelle 3.5
Verfahrens-Charakteristika und Trypsin-Inhibitor-Gehalt der
drei Protein-Produkte A, B und C

	A. Sojaprotein-Iso- lat	B. Sojaprotein- Konzentrat	C. Sojaprotein-Iso- lat (p.v.p.)
Verfahrens-Charakteristika:			
Protein in den Feststoffen	97,4%	73,7%	90,0%
Proteinaus- beute	51,1%	86,7%	78,2%
Trypsin-Inhibi- tor			
TUI/g Produkt	34 000	21 000	19 000
TUI/g Protein	36 250	28 970	21 810

Funktionelle Eigenschaften

Der Index der Stickstofflöslichkeit (NSI) wurde in einer 1%igen Proteindispersion bei pH 7,0 in 0,2 m NaCl-Lösung bzw. in destilliertem Wasser bestimmt. Nach 45 min langem Rühren mit einem Magnetrührer wurde die Suspension 30 min mit 4000 × g zentrifugiert und die überstehende Lösung auf Stickstoff untersucht. Die Stickstofflöslichkeit wurde berechnet als (lösliches N%/Gesamt N%). Die Ergebnisse dieser Berechnung für die drei Produkte sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Die Emulgierfähigkeit wurde dreimal an jedem Produkt durch eine leicht modifizierte Swift-Titration bestimmt. 4,0 g (N × 6,25) des Produktes wurden in 250 ml 0,5 m NaCl mit einem Sorval-Omnimixer bei niedriger Geschwindigkeit vermischt. 50 ml der Suspension wurden in ein Mischglas gegeben und 50 ml Sojabohnenöl zugesetzt. Anschliessend wurde das gesamte Gemisch gewogen. Das Öl-Wasser-Gemisch wurde dann mit 10 000 UpM homogenisiert, wobei das Glas in einem Eisbad stand. Eine zusätzliche Menge Sojabohnenöl wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,3 ml/s zugegeben, bis die Emulsion zusammenfiel. Die Gesamtmenge an Öl, die vor dem «Endpunkt» zugesetzt wurde, wurde durch Wiegen festgestellt.

Die Emulgierfähigkeit wurde berechnet als ml Öl pro 55 Gramm Protein (N × 6,25). Die Dichte des Öls wurde mit 0,9 g/ml angenommen.

Die Mittelwerte der Bestimmungen der Emulgierfähigkeit der drei Produkte sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Die Aufschlagbarkeit wurde in einer 3%igen Proteinlösung bei pH 6,5 bestimmt. 250 ml der wässrigen Dispersion der Proteinproben wurden mit Geschwindigkeit III 4 min in einem Hobart-Mischer (Modell N-50), der mit einem Drahtquirl versehen war, aufgeschlagen. Die Aufschlagbarkeit bzw. 65 Ausdehnung beim Aufschlagen wurde berechnet nach der Formel

$$\text{Ausdehnung beim Aufschlagen} = V-250/250 \times 100\%,$$

in der V das Endvolumen des aufgeschlagenen Produktes in ml bedeutet.

V wurde gemessen durch erneutes Füllen des Mischerglases mit Wasser. Es wurden Doppelversuche für jede der drei Proben durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Die Schaumstabilität wurde als Verhältnis zwischen der Menge Schaum, die nach 3minütigem Ablaufen verblieb, und der ursprünglichen Schaummenge bestimmt. 1 g des nach dem oben angegebenen Verfahren geschäumten bzw. aufgeschlagenen Produktes wurde in einen Kunststoffzylinder (Durchmesser 7 cm, Höhe 9 cm) mit einem Drahtnetz mit einer Maschenweite von 1 × 1 mm gegeben. Der Zylinder wurde auf einen Trichter auf einem Glaszyliner gegeben und das Gewicht (B) der abgelaufenen Flüssigkeit in dem Glaszyliner bestimmt. Die Schaumstabilität FS ist definiert durch die Gleichung

$$FS = \frac{A-B}{A} \times 100\%.$$

Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Die Gelfestigkeit ist in dieser Beschreibung definiert als die Brookfield-Viskosität, gemessen mit Hilfe von T-Spindeln in einem Brookfield Heliopath-Ständer. Die Gele wurden hergestellt durch Wärmebehandlung von 12%igen Proteinsuspensionen in 0,5 m NaCl. Die Wärmebehandlung wurde in geschlossenen Dosen mit einem Durchmesser von 7,3 cm und einer Höhe von 5 cm, die in ein Wasserbad gestellt wurden, das auf 80 und 100 °C gehalten wurde, jeweils innerhalb von 30 min durchgeführt. Die Dosen wurden gekühlt und bevor sie geöffnet und (der Inhalt) gemessen wurde, thermostatisch auf 20 °C eingestellt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Tabelle 3.6
Funktionelle Eigenschaften der drei Protein-Produkte

Funktion	A. Sojaprotein- Isolat	B. Sojaprotein- Konzentrat	C. Sojaprotein- Isolat (p.v.p.)
% NSI in 0,2 m NaCl	39,5	20,3	25,6
% NSI in Wasser	53,9	25,1	28,6
Emulgier-Fähigkeit: ml Öl/g (N × 6,25)	218	182	354
Aufschlagbarkeit (%)	120	120	340
Schaumstabilität (%)	50	50	20
Gel-Festigkeit (dPa.s) 80 °C (0,5 m NaCl)	$1,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$3,3 \times 10^2$
100 °C (0,5 m NaCl)	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$

Beispiel 4 (Anwendungsbeispiel)

Ein p.v.p. wurde hergestellt nach dem in Beispiel 3c beschriebenen Verfahren mit der Ausnahme, dass die Cellulase-Aktivität teilweise von Trichoderma reseei stammt. Die im Handel erhältliche Cellulasezubereitung Celluclast, hergestellt von Novo Industri A/S, wurde mit einer Base bei niedriger Temperatur auf die folgende Weise behandelt. Der pH-Wert einer 10%igen Celluclast-Lösung in Wasser wurde mit NaOH auf 9,2 eingestellt und die so erhaltene Lösung auf 5 °C gekühlt. Nach 1 h bei diesem pH-Wert und dieser Temperatur wurde der pH erneut mit 20%iger Essigsäure auf 4,7 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 5 °C gehalten und dann steril filtriert. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet. 4 g des gefriergetrockneten Produktes zusammen mit der SPS-ase-Zubereitung KRF 68 B III (Beispiel 1) zugegeben. Die beiden Enzyme wurden in 172 g Wasser vor der Zugabe zu dem Wasch-Gemisch gelöst. Die Bestimmung der Mengenbilanz ist in Tabelle 4.1 angegeben.

Tabelle 4.1
Berechnung der Mengenbilanz beim isoelektrischen Waschen einschl. der SPS-ase-Zubereitung und Celluclast® zur Herstellung von p.v.p.

Operationen und Fraktionen	Menge der Fraktion g	Protein (%) (N × 6,25)	Feststoffe (%)	Ausbeute an Protein (%)	Ausbeute an Feststoffen (%)
Waschen					
Sojamehl	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Wasser	3546,2	0	0	0	0
6 n HCl	43,1	0	21,3	0	2,3
SPS-ase: KRF-68-B-III	24,0	75,3	96	7,7	5,8
Celluclast	4,0	43,6	96	0,7	1,0
Zentrifugat Σ	4043,1	—	—	—	—
Zentrifugat I	3382,0	1,9	5,5	27,3	46,5
Feststoffe I	661,0	—	—	—	—
Erneutes Waschen:					
Feststoffe I	661,0	—	—	—	—
Wasser	3339,0	0	0	0	0
6 n HCl	0	0	0	0	0
2. Zentrifugation: Σ	4000,0	—	—	—	—
Zentrifugat II	3414,0	0,2	0,7	2,9	6,0
Feststoffe II	582,0	—	—	—	—
Neutralisation:					
Feststoffe II	582,0	—	—	—	—
Wasser	1691,0	0	0	0	0
4 n NaOH	25,3	0	16,0	0	1,0
Trocknen:					
Pulver	206,0	88,8	98,9	77,8	50,9

Der Versuch zeigt, dass diese spezielle SPS-ase-Zubereitung schon eine wirksam Cellulase enthält, da der Zusatz von Celluclast das Verhältnis Protein:Feststoffen nicht beeinflusst. Andere SPS-ase-Zubereitungen können jedoch weniger Cellulase enthalten, z.B. KRF 92, siehe die Tabelle unmittelbar vor Beispiel 2.

Beispiel 5 (Anwendungsbeispiel)

Ein p.v.p. wurde nach dem in Beispiel 30 beschriebenen Verfahren hergestellt mit der Ausnahme, dass alle Mengen um den Faktor 5 kleiner waren und dass das Reaktionsgemisch vor dem Zentrifugieren auf ungefähr 5 °C gekühlt wurde. Auf der Grundlage der Analyseergebnisse im Zusammenhang mit den Zentrifugaten wurde eine theoretische Ausbeute an Protein erhalten, wie aus Tabelle 5.1 hervorgeht.

Tabelle 5.1
Bei der Herstellung von p.v.p. erhaltene theoretische Protein-Ausbeute

Faktionen	Menge Protein g	Ausbeute (%)	Beispiel 3 C an Protein (%)	Proteinstein (%)
	(N × 6,25)		(N × 6,25)	(N × 6,25)
Sojamehl	85,2	55,2	100	55,2
SPS-ase-KRF-68-B-III	4,8	75,3	7,7	75,3
1. Zentrifugat	639	0,99	13,5	1,7
2. Zentrifugat	595	0,13	1,6	0,2
p.v.p.	-	87,2 ^a	92,6 ^b	87,1
				80,1 ^b

^a Durchschnitt von 87,5 (Biotechnik Institut) und 86,9 (Qvist's Laboratorium); entsprechend Feststoffen von 97,6 und 98,0%.

^b Berechnet als Gesamtmenge von Protein – Proteinverlust in den Zentrifugaten.

Beispiel 6 (Anwendungsbeispiel)

Nachweis der Proteinbindung von SPS

40 g (N × 6,25) aus einem im Handel erhältlichen Sojaprotein-Isolat (Purina 500 E der Ralston Purina) wurden in 680 g Wasser gelöst. Das Gemisch wurde im Wasserbad auf 50 °C erwärmt und der pH-Wert mit 6 n HCl auf 4,5 eingestellt. 90 g dieses Gemisches wurden in 5 × 250 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben und 10 g wässrige Lösungen, enthaltend 0, 0,2, 0,4, 0,8 bzw. 1,6 g des wie vorher in der Beschreibung angegeben hergestellten SPS wurden zugegeben. Die Kolben wurden dann 240 min mit einem Magnetrührer im Wasserbad bei 50 °C gerüttelt.

Anschließend wurden die Aufschlammungen mit 3000 × g 15 min zentrifugiert und die Zentrifugate I nach Kjeldahl auf N sowie auf Feststoffe analysiert. Die festen Phasen wurden in Wasser von Raumtemperatur gewaschen und dann neu zentrifugiert. Dieses Verfahren wurde wiederholt. Dann wurden die Feststoffe in 50 ml Wasser dispergiert und der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von 6 n NaOH auf 6,50 eingestellt. Die neutralisierten Produkte wurden gefriergetrocknet und nach Kjeldahl auf N sowie auf den Feststoffgehalt analysiert. Bezogen auf die in Tabelle 6.1 angegebene Analyse wurden das gewonnene Protein und der Prozentsatz an SPS, der an das Protein gebunden war, mit Hilfe der in Zusammenhang mit Tabelle 6.2 angegebenen Formeln berechnet.

Dieses Beispiel zeigt, dass das SPS fest an das Protein gebunden ist, so dass das Verhältnis Protein:Feststoffen mit zunehmendem Gehalt an SPS abnimmt. Ein SPS-Gehalt, entsprechend ungefähr 0,4 g in 10 g Wasser, zugegeben zu 5 g

Protein-Isolat, ist das in dem Sojamehl vorhandene Verhältnis Protein:SPS.

Die prozentuale Bindung von SPS ist ein berechneter Wert. Die prozentuale Bindung von SPS nimmt aufgrund der Sättigung des Proteins in Beziehung auf SPS bei geringen Verhältnissen Protein:SPS ab.

Tabelle 6.1
Messungen nach Beispiel 6

10	Verhältnis Protein/SPS	Zentrifugate I		trockener Niederschlag		
		% N	% DM	% N	% DM	% N × 6,25 / DM
15	∞	0,068	0,62	13,2	82,5	93,1 88,6
	25	0,045	0,49	13,4	83,8	97,3 86,1
	12,5	0,038	0,45	13,0	81,3	97,9 83,0
	6,25	0,031	0,45	12,6	78,8	98,1 80,3
	3,125	0,026	0,61	11,8	73,8	97,9 75,3

Tabelle 6.2
Protein-Gewinnung und prozentuale Bindung von SPS

25	Verhältnis Protein/SPS	% Protein-Gewinnung ¹	% Bindung von SPS ²
∞		91,5	0
25		94,4	77
12,5		95,3	90
30	6,25	96,1	70
	3,125	96,8	60

1) % Protein-Rückgewinnung =

$$35 \quad \left[1 - \frac{NC_1 \times 6.25}{5} \right] \times 100,$$

wobei NC 1 = % N in Zentrifugat I ist.

2) % Bindung von SPS =

$$\begin{aligned} & \left[\frac{5 \times (\% \text{ Protein-Rückgewinnung})}{(\% P/H)} \right. \\ & \quad \left. - \frac{5 \times (\% \text{ Protein-Rückgewinnung})}{(\% P/H) \infty} \right] \end{aligned}$$

50 x 100,

$$[5 / \text{Menge an SPS}]$$

55 (% P/H) Verhältnis Protein/Feststoff im trockenen Niederschlag und (% P/H)∞ gilt für den Niederschlag ohne Zusatz von SPS.

60 Beispiel 7 (Anwendungsbeispiel)

Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung eines p.v.p. unter Verwendung der SPS-ase-Zubereitung KRF 92 BI in einer Menge von 5%, bezogen auf die Feststoffe. Die Art der Herstellung entsprach genau derjenigen von Beispiel 3c mit der Ausnahme, dass alle Mengen um den Faktor 5 verringert wurden. Das p.v.p. wurde, wie in Beispiel 2 beschrieben, analysiert. Die bei diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse gehen aus Tabelle 7.1 hervor.

Tabelle 7.1
In Beispiel 7 erhaltene Ergebnisse:

Bestandteile	Menge (g)	(N × 6,25) (%)	Feststoffe (%)	Ausbeute an Protein (%)	Ausbeute an Feststoffen (%)
Sojamehl	85,2	55,2	94,0	100	100
Enzym-Zubereitung	4,0	71,2	—	6,1	—
1. Zentrifugat	632	1,88	5,44	25,3	43,0
2. Zentrifugat	673	0,30	0,80	4,3	6,7
p.v.p.	39,8	85,6 ^a	98,1 ^a	71,9	48,8
		84,4 ^b	98,1 ^b		

^a Analyse des Biotechnik Institut, Holbergsvej 10, DK-6000 Kolding

^b Analyse des Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000 Aarhus C

Beispiel 8 (Anwendungsbeispiel)

Dieses Beispiel zeigt die Wirkung einer Vorbehandlung von Sojamehl durch Dampfstrahlbehandlung vor der Herstellung von p.v.p.

Vorbehandlung

Eine Aufschämmung von Sojamehl in Wasser, bestehend aus 10 kg Sojamehl (Sojamel 13, hergestellt von Aarhus Oliefabrik A/S) auf 100 kg wurde durch eine Dampfdüse (Typ Hydroheater B-300) gepumpt und mit Dampf von 8 bar in einer solchen Menge und mit einer solchen Strömungsgeschwindigkeit vermischt, dass eine Endtemperatur von 150 °C 25 s in einem rohrförmigen Druckreaktor aufrechterhalten werden konnte. Anschliessend wurde der Druck in einer Entspannungskammer (ein Zyklon) aufgehoben und von hier wurde die Aufschämmung durch einen Plattenwärmieraustauscher geleitet und auf ungefähr 50 °C gekühlt. Die abgekühlte Aufschämmung konnte direkt zur Herstellung von p.v.p. nach der Erfindung verwendet werden, aber in diesem Falle wurde die Aufschämmung mit einer Eintrittstemperatur von 200 °C und einer Austrittstemperatur von 90 °C sprühgetrocknet. Es zeigte sich, dass das vorbehandelte Produkt einen Feststoffgehalt von 96,5% und einen Proteingehalt von 56,9% (N × 6,25) besass.

Herstellung von p.v.p.

Die Herstellung wurde auf die folgende Weise durchgeführt:

70 g Feststoffe des mit Dampf behandelten und getrockneten Sojamehls wurden in 560 g Wasser suspendiert und bei 50 °C gerührt und der pH-Wert mit Hilfe von 6,5 ml 6 n HCl auf 4,50 eingestellt. 6 × 90 g dieser Suspension wurden in 6 250-ml-Erlenmeyer-Kolben gegeben und auf einem Wasserbad von 50 °C mit Hilfe von Magnetrührern gerührt. Zu jedem Kolben wurden 10 g einer Lösung, enthaltend 0,0025, 0,050, 0,10, 0,20 bzw. 0,40 g SPS-ase-Zubereitung KRF 68 BIII, gegeben. Die Reaktionsgemische wurden dann 240 min bei 50 °C gerührt. Dann wurde das Gemisch 15 min bei 3000 × g zentrifugiert.

Die überstehende Flüssigkeit wurde dann nach Kjeldahl auf N analysiert und die feste Phase mit gleichen Volumina Wasser gewaschen und zentrifugiert. Dieses Verfahren wurde zweimal durchgeführt. Die feste Phase wurde dann gefriergetrocknet und nach Kjeldahl auf N sowie auf den Feststoffgehalt analysiert.

Ein ähnlicher Versuch wurde mit einem nicht behandelten Sojamehl (Sojamel 13 der Aarhus Oliefabrik A/S) als Aus-

gangsmaterial durchgeführt. In diesem Fall waren die Verhältnisse Enzym:Substrat 0, 1, 2, 3, 4 bzw. 8%.

Bezogen auf den Proteingehalt der überstehenden Flüssigkeiten kann der Prozentgehalt an gewonnenem Protein berechnet werden. Die Ausbeute an Protein beruht auf der Annahme, dass das Enzymprodukt nach der Reaktion 100% gelöst ist. Die folgende Tabelle zeigt die bei beiden Versuchen erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 8.1
Verhältnis Proteinausbeute und Protein der Feststoffe des aus dampfbehandeltem oder rohem Sojamehl hergestellten p.v.p.

E/S %	Dampfbehandeltes Sojamehl		nicht behandeltes Sojamehl	
	Protein Feststoffe %	Protein der Feststoffe %	Protein Feststoffe %	Protein der Feststoffe %
0	92,9	76,5	90,7	73,9
0,25	90,1	86,6	—	—
0,50	89,3	88,7	—	—
1,0	88,1	89,7	87,1	86,2
2,0	86,6	91,7	85,7	88,1
3,0	—	—	84,3	89,5
4,0	84,7	92,2	82,6	90,9
8,0	—	—	76,2	91,1

Im Zusammenhang mit entweder den Extraktions-(Isolierungs-)Verfahren für andere Materialien als Proteine oder mit den Verflüssigungsverfahren und damit verwandten Verfahren wird auf das allgemeine Verfahrensschema für die Anwendung, wie in dem Fliessschema 3 angegeben, verwiesen.

Das Substrat kann ein oder mehrere Kohlenhydrate in einem Ausgangsmaterial sein, oder es kann das gesamte Ausgangsmaterial sein.

Dieses Substrat kann einer chemischen oder physikalischen Vorbehandlung, wie später beispielhaft erläutert, z.B. einer Säure- oder Alkalibehandlung, Einweichen, Benetzen und/oder Kochen mit oder ohne Dampf unterworfen werden sein.

Das Ausgangsmaterial kann eingeweicht (mazeriert), gehackt, nass gemahlen und/oder homogenisiert sein (alle diese Behandlungen werden in Fliessschema 3 als Homogenisierung bezeichnet), wobei Wasser und andere Additive während dieser Stufe zugesetzt oder nicht zugesetzt werden können. Die Homogenisierung kann mit unterschiedlicher Wirkung durchgeführt werden, z.B. bei unterschiedlichen Drücken, die nur ein Bruchteil des für den speziellen Homogenisator angegebenen Maximal-Druckes ausmachen. Unterschiedliche Zusätze bzw. Additive können vor oder während der Homogenisierung zugegeben werden, wie in dem Fliessschema 3 durch b₁, b₂ ... b_n angegeben.

Das Reaktionsverfahren einschliesslich der SPS-ase-Herstellung wird unter speziellen Bedingungen, z.B. von Temperatur, Druck, Zeit, pH und Enzymmenge durchgeführt. Auch sind Empfehlungen bezüglich des angewandten Reaktors (z.B. für ansatzweises Arbeiten oder Kolbenströmungsreaktoren) und das Rühren, soweit erforderlich, angegeben. Eine Reihe von Additiven kann für unterschiedliche Ausgangsmaterialien angegeben werden wie durch c₁, c₂ ... c_n in Fliessschema 3 angegeben.

Auch die Trennverfahren können mit unterschiedlichen Wirkungen durchgeführt werden. Bei vielen Verfahren wird die Abtrennung weggelassen oder erleichtert, z.B. wenn das Ausgangsmaterial vollständig flüssig (verflüssigt) ist. Unterschiedliche Trennvorrichtungen können angewandt werden (z.B. Zentrifugen, Filter, Ultrafiltrationsvorrichtungen,

Hydrozykone, Eindicker, Siebe oder einfache Dekantiervorrichtungen).

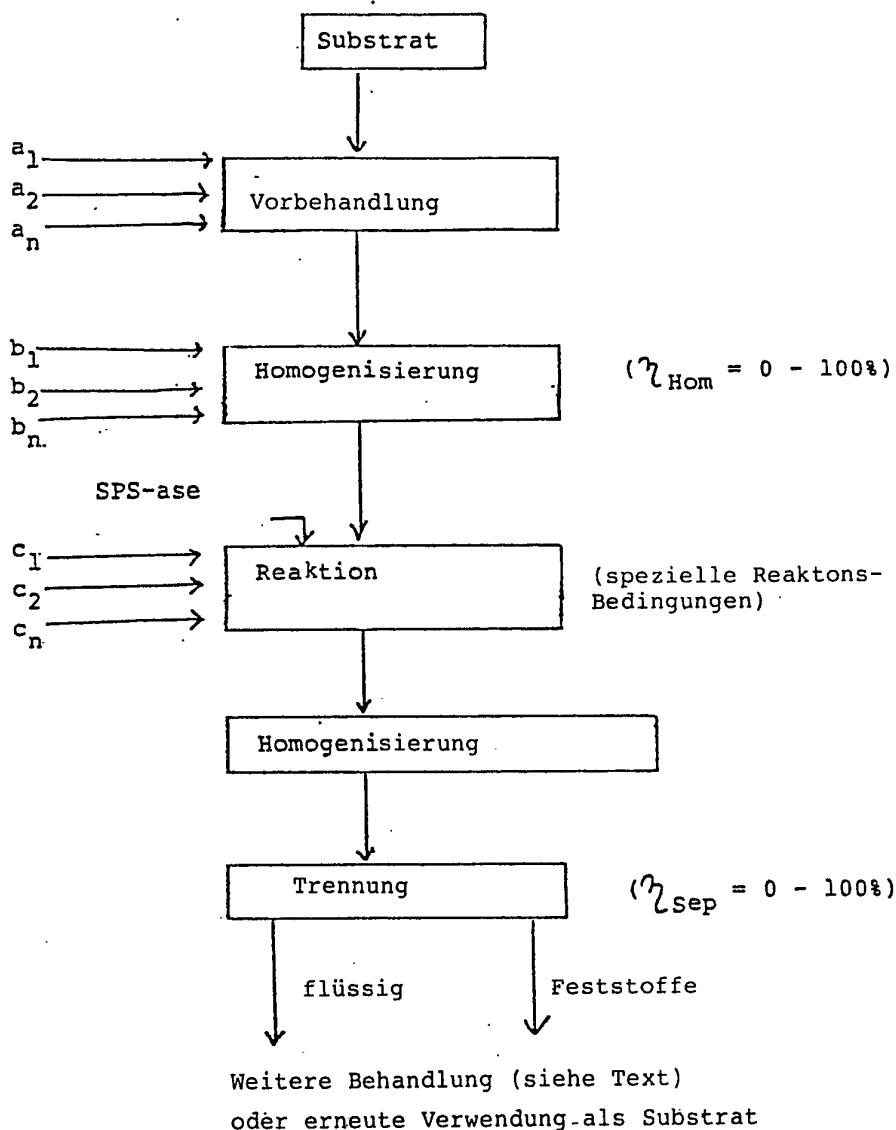
Die Trennungswirkung ist definiert als das Verhältnis zwischen dem absoluten Feststoff (sludge)-Gehalt in der festen Phase und dem absoluten Feststoff (sludge)-Gehalt des Reaktionsgemisches.

Die erhaltenen festen oder flüssigen Phasen können weiterbehandelt werden, z.B. eingeengt, getrocknet, mit Lösungs-

mittel extrahiert, um bestimmte Komponenten wie Fett oder Öl zu entfernen, fermentiert zur Bildung von Biomasse, Alkohol oder anderen Produkten (Enzymen, Antibiotika oder anderen wertvollen Bestandteilen).

5 Die erhaltenen Produkte können auch zur wiederholten Behandlung entsprechend dem Verfahrensschema zurückgeführt werden.

F l i e ß s c h e m a III



Im folgenden sind einige Beispiele für die Anwendung von SPS-ase-Zubereitungen angegeben und eine Übersicht dieser Anwendungen geht aus der folgenden Liste hervor.

Auch in der beiliegenden Tabelle I sind verschiedene Charakteristika zusammen mit dem Fliessschema 3 zusammengefasst.

55 Aufstellung von Anwendungsmöglichkeiten von SPS-ase-Zubereitungen

Art der SPS-ase-Zubereitung	Be-zugs-Nr.	
SPS-ase-Zubereitung, die im wesentlichen frei	A 1	Extraktion von Stärke aus Mais, Weizen und Kartoffeln
	A 2	Extraktion von Lipiden aus pflanzlichen Materialien
	A 3	Extraktion von ätherischen Ölen aus pflanzlichen Materialien

Art der SPS-ase-Zubereitung	Bezugs-Nr.				Bearbei- tungshil-fen	Bb 1	Bb 2	Bb 3	Bb 4	Bb 5	Bb 6	
ist von einer oder mehreren stören-den Enzym-aktivitäten	A 4	Extraktion von natürlichen Farbstoffen aus pflanzlichen Materialien	5									gewinnbaren Menge an löslichen Kaffeebestandteilen
	A 5	Extraktionen von Kautschuk von dem Guayul-Busch	10									Verhinderung und/oder Abbau von «Schleiern» in Apfelsaft
												Verwendung zur Klärung von Weisswein
Vollstän- Ba 1		Herstellung eines Milchersatz-Stoffes für Haustiere	15									Herstellung von ISSPH oder anderen pflanzlichen Protein-Hydrolysaten
digie Verflüs- Ba 2		Herstellung von verzuckerte Stärke enthaltenden Rohmaterialien		nicht modifi- zierte SPS-ase- Zuberei-tungen	Andere Anwen-dungs-arten	Bc 1	Bc 2	Bc 3	Bc 4	Bc 5	Bc 6	Maische-Enzym in der Brauerei Enzym-Zusatz bei der Bierfermentation und/oder Lagerung
sigung oder ähnl. Ba 3		Vollständige Verflüssigung von Birnen und anderen Früchten	20									Mittel zur Entfernung der Mandelhäutchen
Behand- lung Ba 4		Herstellung von Saft durch Behandlung von Früchten und Gemüsen										Abbau von unterschiedlichen Abfallprodukten
Ba 5		Behandlung im Zusammenhang mit der Extraktion oder dem Pressen von Zuckerrohr oder Zuckerrüben	25									Verzuckerung und gleichzeitige Fermentation
nicht modifi- zierte SPS-ase- Zuberei-tungen	Ba 6	Herstellung von Sojamilch										Abbau von Cellulose
	Ba 7	Behandlung zur Erhöhung der	30									Verwendung als Backhilfe
												Verbesserung der Alkoholausbeute und Ausbeute an Biomasse bei der Fermentation von Sulfitlauge von der Papierherstellung
												Entwässerung von biologischen Schlämmen
												Silage-Hilfe

Tabelle I

Lit.	Substrat	Zusätze a _i	b _i	c _i	1'Homogeni-sierung $\eta_{Hom} \%$	2'Homogeni-sierung $\eta_{Hom} \%$	Trennung $\eta_{Sep} \%$	flüssige Phase	weitere Behandlungen feste Phase	Vereinigte Phase (keine Trennung)
A 1	Mais	Wasser SO ₂	Wasser	NaOH oder HCl	20-50	10-30	30-50	(enthält Keime) Waschen, Ölgewinnung	Waschvor-gang	-
A 2	Maiskeime	-	-	NaOH oder HCl	0	0	100	-	-	-
Ba 1	Sojamehl (entfettet)	Wasser	-	HCl	0	0	-	-	Pasteurisie-rung, Konzentrie-rung, Sprühtrock-nung	
Ba 2	süsse Kartoffeln	Wasser	Terma-myly	NaOH oder HCl	-	-	0	-	-	Hefe für Alkohol-Fermen-tation, Destillation
Ba 5	Zuckerrüben	Wasser	-	NaOH oder HCl	10%	-	100	Kristallisa-tion	-	
Bc 1	Sojaquark od. Sojamilchrück-stände	Wasser	-	HCl	10%	-	0	-	-	Hefe für Alkohol-Fermen-tation, Destillation

A 1. Extraktion von Stärke aus Mais, Weizen und Kartoffeln

Die Extraktion von Stärke aus Mais, Weizen, Kartoffeln und anderen stärkehaltigen Pflanzen wird in einer oder mehreren Stufen durchgeführt: Einweichen, Nass-Mahlen und Trennen. Die Anwendung einer SPS-ase-Zubereitung mit im wesentlichen keiner amylolytischen Aktivität führt zu den folgenden Vorteilen, wobei Mais als Beispiel angewandt wird:

1. Die Stärkefreisetzung wird innerhalb einer kürzeren Einweichzeit erleichtert,
2. Der Wasserverbrauch kann verringert werden,
3. Die Freisetzung von Maiskeimen wird erleichtert ohne Freisetzung von Maiskeimöl,
4. Das Protein kann in höherer Reinheit erhalten werden,
5. Die Gewinnung von Maiswasser wird erleichtert.

A 2. Extraktion von Lipiden aus Pflanzenmaterial

Da die Lipide in pflanzlichen Materialien innerhalb der Zellen eingeschlossen und üblicherweise an Proteine gebunden sind, können Lipide in wässriger Phase durch Behandlung mit einer SPS-ase-Zubereitung extrahiert werden, die im wesentlichen frei ist von Lipasen. So wird Maiskeimöl üblicherweise isoliert durch Extraktion der getrockneten Maiskeime mit Hexan. Der Trockenvorgang ist jedoch überflüssig, wenn die nassen Maiskeime mit einer SPS-ase-Zubereitung der oben angegebenen Art behandelt werden. Ähnlich kann die Extraktion von Olivenöl in wässriger Phase verbessert werden, wenn das für die enzymatische Behandlung angewandte Enzym eine SPS-ase-Zubereitung der oben angegebenen Art ist, siehe z.B. Food, Pharmaceutical and Bioengineering, Nr. 172, Bd. 74, S. 93–94. Auch die wässrige Extraktion von z.B. Sojaöl, Rapsöl und Sonnenblumenöl kann auf ähnliche Weise verbessert werden.

A 3. Extraktion von ätherischen Ölen aus pflanzlichen Materialien

Wenn pflanzliche Materialien, die ätherische Öle enthalten, mit einer wässrigen Lösung einer SPS-ase-Zubereitung behandelt werden, die im wesentlichen frei ist von Enzymaktivität, die imstande ist, die ätherischen Öle abzubauen oder auf andere Weise zu verändern, werden die ätherischen Öle in hohen Ausbeuten zu sehr geringen Kosten extrahiert.

A 4. Extraktion von natürlichen Farbstoffen aus pflanzlichem Material

Wenn pflanzliche Materialien, enthaltend Farbstoffe z.B. rote Rüben, die den roten Farbstoff Betanin enthalten oder der Farbstoff in Preiselbeeren mit einer SPS-ase-Zubereitung behandelt werden, die im wesentlichen frei ist von Enzymaktivitäten, die imstande sind, die Farbstoffe abzubauen oder auf andere Weise zu verändern, werden die Farbstoffe in hohen Ausbeuten zu niedrigen Kosten gewonnen.

A 5. Extraktion von Gummi aus dem Guayul-Busch

Ein anderes Beispiel für ein Substrat für eine SPS-ase-Zubereitung, die im wesentlichen frei ist von Enzymaktivität, die imstande ist, Rohgummi abzubauen, ist das Zellwandmaterial von Wurzeln und Zweigen des Guayul-Busches.

Ba 1. Herstellung eines Milchaustauschstoffes für Haustiere, vorzugsweise Austauschstoff für Kälbermilch

Durch vollständige Verflüssigung von Sojabohnen, Sonnenblumensamen, Baumwollsamen, Fababohnen oder Felderbsen kann ein Kälbermilch-Austauschstoff hergestellt werden, der in kaltem Wasser bei einem pH-Wert von etwa 4,5 löslich ist. Bei Verwendung von stärkehaltigen Rohmaterialien wie Fababohnen oder Felderbsen muss eine Stärkeverflüssigung mit Hilfe einer α -Amylase vor, nach oder gleichzeitig mit einer Behandlung mit einer SPS-ase durchgeführt werden,

die schliesslich die Nichtstärke-Polysaccharide in dem Strukturmaterial der Zellwände verflüssigt. Ein detailliertes Beispiel unter Verwendung von Fababohnen ist unten angegeben, und bezüglich der Sojabohnen wird auf Tabelle I verwiesen. Die Vorbehandlung der Sojabohnen kann vorzugsweise ein Dampfstrahlkochen sein, das das Löschen des Rückstandes verbessert.

Beispiel Ba 1.1

10 15 kg Fababohnenmehl (Farine de Fèves des Grandes Minoteries à Fèves de France, Paris) wurden in 35 l Wasser suspendiert. 75 g Termamyl 60 L und 18 g CaCl₂ wurden zugegeben. Die Suspension wurde unter Rühren in einem Dampfmantelkessel auf 95 °C erwärmt. Die Suspension 15 wurde dann 60 min bei dieser Temperatur behandelt.

Anschliessend wurde der pH-Wert auf 4,5 eingestellt und das Produkt auf 50 °C gekühlt. 300 g der SPS-ase-Zubereitung KRF 68 wurden in 1 l Wasser gelöst und zugegeben. Die Reaktion wurde 440 min lang durchgeführt. Wenn 10 g Fun-

20 gamyl 800 L mit zugesetzt wurden, wurde die Stärkefraktion im wesentlichen in Disaccharid (Maltose) umgewandelt. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch 2 min bei 90 °C pasteurisiert. Ein Anteil des Produktes wurde dann gefriergetrocknet und für Stabilitätsuntersuchungen verwendet. Die 25 Probe wurde dann in einer Menge von 10% Feststoff (Trockenkunstsubstanz) gelöst, und die Lösung des Produktes blieb tagelang ohne Sedimentation stabil.

Geschmolzenes Fett oder Öl kann leicht in dem Produkt emulgiiert werden, wobei ein Endprodukt erhalten werden 30 kann, das Kuhmilch sehr ähnlich ist. Eine Emulsion, enthaltend 3,5 g Öl (Sojabohnenöl), konnte auch tagelang ohne Sedimentation stabil gehalten werden.

Beispiel Ba 1.2

35 Sojamehl (Sojamel 13) wurde 25 s, wie in Beispiel 8 beschrieben, bei 150 °C mit einem Dampfstrahl behandelt. Das so behandelte Sojamehl wurde sprühgetrocknet und für weitere Untersuchungen, wie im folgenden beschrieben, angewandt.

40 A: 50 g des mit Wasserdampf behandelten Sojamehls wurden mit 450 g Wasser vermischt und der pH-Wert mit 4,1 ml 6n HCl auf 4,5 eingestellt. Das Gemisch wurde dann im Was-

serbad auf 45 °C erwärmt und 0,250 g der SPS-ase-Zubereitung KRF 68 zu dem erwärmten Gemisch zugegeben, das 45 dann 5 h unter Röhren reagierte. Anschliessend wurde das Gemisch 2 min auf 80 °C erwärmt, um das Enzym zu inaktivieren. Eine 100-ml-Probe wurde bei Raumtemperatur 15 min mit 3000 × g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit einem Ionenaustauscher behandelt und auch die

50 Kohlenhydratzusammensetzung durch HPLC analysiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde auch auf den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl analysiert und der Feststoffgehalt und der Stickstofflöslichkeitsindex (NSI) und der Feststofflöslichkeitsindex (DSI) berechnet, siehe Ergebnisse in Tabelle Ba I.

55 100 ml des Reaktionsgemisches, das auf 20 °C gekühlt worden war, wurden in ein kalibriertes 100-ml-Glas gegeben und 2 Tage bei 4 °C gehalten. Die Dispersionsstabilität (%) wurde gemessen durch Ablesen des Volumens der erhaltenen Dis-

50 persionen (Tabelle Ba II) nach 1 und 2 Tagen. Zu 200 ml des Reaktionsgemisches (bei 0 °C) wurden 8 g Sojabohnenöl gegeben. Es wurde eine Emulsion hergestellt durch 2 min langes Vermischen in einem Waring Blender. Die Emulsionsstabilität (%) wurde, wie oben, nach 1 und 2 Tagen gemessen.

65 B: Es wurde eine Reaktion wie oben durchgeführt, in diesem Falle wurden jedoch 1,00 g der SPS-ase-Zubereitung angewandt. Es wurden die gleichen Arten von Analysen und Stabilitätsmessungen, wie in Absatz A beschrieben, durchge-

führt. Die Ergebnisse sind in Tabellen Ba I und Ba II angegeben.

Aus der chemischen Analyse der überstehenden Flüssigkeiten geht hervor, dass die Werte für NSI (%) und DSI (%) bei dem Versuch B höher sind als bei dem Versuch A. Die Stabilitätstests, die an den Reaktionsgemischen durchgeführt wurden, zeigen jedoch einen besseren Wert für die Proben A. Dies liegt möglicherweise an der größeren Länge der Peptidkette der Proteine in dem Reaktionsgemisch bei geringerer Enzymmenge.

Aus der durch HPLC gemessenen Kohlenhydratzusammensetzung geht hervor, dass hauptsächlich Mono- und Disaccharide gebildet worden sind. So sind Oligosaccharide, von denen bekannt ist, dass sie für Diarrhoe und Flatulenz verantwortlich sind, wenn sie Kälbern in zu grossen Mengen verabreicht werden, nur in geringen Mengen vorhanden.

Tabelle Ba I
Chemische Eigenschaften der überstehenden Flüssigkeit

Ver- suche	Verhältnis von Enzymmenge zu Substrat % (Gew./Gew.)	NSI, %*	DSI, %** (bei pH = 4,5)	HPLC-Ergebnisse (bei pH = 4,5) (Zusammensetzung der neutralen Zucker)
A	E/S = 0,5%	39,9	62,4	DP ₁ + DP ₂ : 79,7% DP ₃ : 7,4% DP ₄ : 12,2% DP ₄₊ : 8,1%
B	E/S = 2,0%	57,0	67,1	DP ₁ + DP ₂ : 84,4% DP ₃ : 6,1% DP ₄ : 3,7% DP ₄₊ : 5,7%

* NSI = Stickstofflöslichkeits-Index

** DSI = Feststofflöslichkeits-Index

Tabelle Ba II
Stabilitäts-Tests der Reaktionsmischungen

Ver- suche	Verhältnis von Enzymmenge zu Substrat % (Gew./Gew.)	Stabilität-Tests			
		ohne Öl	mit Öl	Dispersion 1. Tag	Dispersion 2. Tag
A	E/S = 0,5%	80%	63%	100%	87%
B	E/S = 2,0%	66%	35%	85%	71%

Ba 2. Herstellung von verzuckerte Stärke enthaltenden Rohmaterialien

Im Zusammenhang mit der Verzuckerung von Cassava und süßen Kartoffeln und anderen stärkehaltigen pflanzlichen Materialien führt die Zugabe einer SPS-ase-Zubereitung zur Lösung von Viskositätsproblemen. Bei Verwendung einer SPS-ase-Zubereitung ist es möglich, Stärkesuspensionen mit einem Feststoffgehalt von 25 bis 30% herzustellen, und nach der Verzuckerung kann die Maische fermentiert werden, wodurch ein billiges Ethanol erhalten werden kann.

Beispiel Ba 2.1

Auf der Basis von frischen und gerösteten süßen Kartoffeln (japanischen) wurde eine Maische mit einem Feststoffgehalt von 24% hergestellt. Der Stärkegehalt der süßen Kartoffeln betrug ungefähr 70% des Feststoffgehaltes. Eine Vorverflüssigung mit Hilfe der bakteriellen Amylase von Termamyl® 60 L in einer Dosis von 0,5 kg/t Stärke wurde durchgeführt durch Erhitzen der Maische auf 90 °C. Die Maische wurde

dann 30 min bei 90 °C gehalten. Die Viskosität η_1 des Reaktionsgemisches wurde dann mit Hilfe einer Haake-Spindel bei 90 °C gemessen.

Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch auf 55 °C gekühlt und der pH-Wert mit 2n H₂SO₄ auf 5,0 eingestellt. Dann wurde eine Verzuckerung eingeleitet durch Zugabe der Glucoamylase SAN 150 (Handelsname der Novo Industri A/S) in einer Dosis von 1,75 l/t Stärke. Das Verzuckerungsgemisch wurde dann in drei Teile A, B und C aufgeteilt, die 15 min, wie unten angegeben, mit Enzym behandelt wurden, bevor die Viskosität gemessen wurde.

A: Dieser Teil diente zum Vergleich. Die Viskosität η_2 wurde gemessen, siehe Tabelle Ba III.

B: Die Trichoderma viride-Cellulase von Celluclast® 200 N wurde in einer Dosis von 1 kg/t Feststoffe von süßen Kartoffeln zugegeben. Die Viskosität η_3 wurde gemessen, siehe Tabelle Ba III.

C: Die SPS-ase-Zubereitung KRF 68 wurde in einer Menge von 0,25 kg/t Feststoffe der süßen Kartoffeln zugegeben. Die Viskosität η_4 wurde gemessen, siehe Tabelle Ba III.

Reaktions-Gemisch	Viskosität bei 90 °C	Viskosität bei 55 °C
vorverflüssigte süsse Kartoffeln	$\eta_1 = 770 \text{ mPa} \cdot \text{s}$	$\eta^2 = 2190 \text{ mPa} \cdot \text{s}$
A	—	$\eta_2 = 2190 \text{ mPa} \cdot \text{s}$
B	—	$\eta_3 = 1970 \text{ mPa} \cdot \text{s}$
C	—	$\eta_4 = 950 \text{ mPa} \cdot \text{s}$

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass die Viskosität des Reaktionsgemisches wesentlich verringert werden kann durch die SPS-ase in einer geringen Menge, verglichen mit dem Celluclast® und SAN 150.

Ba 3. Gesamtverflüssigung von Birnen und anderen Früchten

Wenn ganze Birnen, die mechanisch zerstossen worden sind, anschliessend mit einer SPS-ase-Zubereitung behandelt werden, findet eine vollständige Verflüssigung statt, und nach Entfernung von kleineren Mengen Feststoffen wird ein klarer Birnensaft erhalten. Ein ähnliches Verfahren kann auf andere ähnliche Früchte, z.B. Äpfel, angewandt werden.

Beispiel Ba 3.1

Frische Äpfel wurden mit Hilfe einer Bucher-Zentralschleife grob gemahlen. Die Apfelmaische wurde dann in einem Kessel mit Heizmantel 5 min bei 90 °C pasteurisiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die vermaischten Äpfel wurden dann auf einer Fryma-Mühle mit Korundstein gemahlen, bis die Maische glatt war. Die Maische wurde dann erneut 10 min bei 80 °C pasteurisiert und auf 50 °C gekühlt.

Jetzt wurden Enzymreaktionen 30 min bei 50 °C mit einem Contraves-Rheomat 15 durchgeführt, wobei Röhren und Viskositätsmessungen (im Zusammenhang mit einer prozentualen Ablesung auf dem Rheometer bei Geschwindigkeit 13) gleichzeitig durchgeführt wurden. Nach vollständiger Enzymreaktion wurden 100 g Proben abgezogen und in einem kalibrierten Rohr 15 min bei 3000 × g zentrifugiert. Hierbei wurde der Prozentsatz an Saft und der Prozentsatz an Abscheidungen bzw. Feststoffen gemessen. Der pH-Wert und der Prozentsatz an Refraktometer-Feststoffen als °Brix wurden ebenfalls gemessen. Tabelle Ba IV zeigt einen Vergleich zwischen der Wirkung von SPS-ase, der Kombination von Celluclast und SPS-ase und der Kombination von Celluclast und Pectinex. Die SPS-ase-Zubereitung KRF 68 wurde angewandt.

Tabelle Ba IV
Ergebnisse der Gesamt-Verflüssigungsversuche mit
Apfel-Maische bei 50 °C, 30 min

SPS-ase Cellu- g/hl	Cellu- clast® g/hl	Pectinex® 3x g/hl	End-Vis- (%)	Kosität	Zentrifugation % Saft	Fest- stoffe %	pH	°Brix
Maische 200 1 g/hl	Maische							
0	0	0	100	59	41	3,8	9,7	10
25	0	0	19	81	19	3,5	10,5	
50	0	0	15	79	21	3,5	10,7	
50	50	0	4,8	83	17	3,5	10,8	
0	50	200	9,5	83	17	3,2	12,9	
0	50	2000	4,0	82	18	3,1	13,2	

Ba 4. Herstellung von Saft durch Behandlung von Früchten und Gemüsen

Es hat sich gezeigt, dass SPS-ase-Zubereitungen gut geeignet sind zur Herstellung von Saft durch Behandlung von verschiedenen Früchten, Beeren und Gemüsen, z.B. Karotten, Erbsen, Tomaten, Äpfeln, Birnen, schwarze Johannisbeeren, Bohnen und Kohl. Hierbei wird eine bessere Ausbeute an Saft sowie eine bessere Extraktion von Farb- und Geschmacksstoffen erreicht, verglichen mit der handelsüblichen Pectinase- und Cellulase-Zubereitung.

Beispiel Ba 4.1

Es wird auf Beispiel Ba 3.1 verwiesen, bei dem die SPS-ase-Zubereitung verglichen worden ist mit den im Handel erhältlichen üblichen Cellulase- und Pectinaseprodukten Celluclast® 200 L und Pectinex® 3x. Aus der Tabelle geht hervor, dass die Ausbeute an Saft leicht verbessert werden kann, wenn so wenig wie 50 g/hl SPS-ase verwendet werden, verglichen mit 2000 g/hl Pectinex®, beide zusammen mit 50 g/hl Celluclast®. Auch war die Viskosität etwas geringer. So scheint es, dass die SPS-ase ungefähr 40mal wirksamer ist als Pectinex.

Ba 5. Behandlung im Zusammenhang mit der Extraktion oder dem Pressen von Zuckerrohr oder Zuckerrüben

Es hat sich gezeigt, dass es möglich ist, die Ausbeute im Zusammenhang mit einfachen Extraktionsverfahren zu verbessern, wenn die SPS-ase-Zubereitung angewandt wird zur Behandlung von Zuckerrohr oder Zuckerrüben vor und/oder während der Extraktion oder dem Pressen. Auch kann der Rückstand (Bagasse) mit der SPS-ase-Zubereitung behandelt werden, wodurch er teilweise in fermentierbare Zucker umgewandelt wird, die als Ausgangsmaterial zur Ethanolfermentation verwendet werden können.

Beispiel Ba 5.1

10 kg Rückstand von Zuckerrüben (Pulpe), der erhalten worden war durch kontinuierliche Gegenstromextraktion in einem DDS-Diffuser bei Nakskov Sugar Factory, wurden zweimal in einer Fryma-Mühle (Typ MZ-110) vermahlen. Während des Mahlvorganges wurde Prozesswasser zugegeben.

300 g Anteile der Pulpe wurden jetzt 18 h bei 45 °C mit Enzym behandelt unter Verwendung der in Tabelle Ba V angegebenen Mengen. Das trockene Enzymprodukt (KRF 68) wurde zu der Pulpe zugegeben, die während der ersten Stunde mit einem Stab gerührt wurde. Daraufhin war die Pulpe so weit verflüssigt, dass die restliche Zeit erfolgreich magnetisch gerührt werden konnte. Am Ende der Reaktion wurde der pH-Wert gemessen (während des Beginns der Reaktion wurde keine pH-Korrektur vorgenommen), und das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert, bis eine klare überstehende Flüssigkeit erhalten wurde. Die Bestimmung des Fest-

stoffgehalts wurde an Reaktionsgemischen und an den überstehenden Flüssigkeiten vorgenommen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Prozentsatz an gelösten Feststoffen berechnet. Korrekturen für den Gehalt an löslichen Feststoffen des Enzymproduktes wurden bei allen Berechnungen vorgenommen.

Die überstehenden Flüssigkeiten 2, 3 und 4 wurden durch Ionenaustauscher behandelt und durch HPCL auf die Kohlenhydratzusammensetzung untersucht.

Tabelle Ba V
Ergebnisse bei der enzymatischen Verflüssigung von Rüben-Pulpe

Ver- such Nr.	Verhältnis der Enzymmenge zu Feststoffen E/S %	End-Messungen pH	überstehende Flüssigkeit		
			(Endwert)	% Feststoffe	% gelöste Feststoffe
1	0	5,5	4,18	0,0	0,0
2	0,35	3,6	3,85	2,58	66,9
3	0,56	3,5	3,81	2,56	66,2
4	1,02	3,5	3,86	2,73	70,4
5	1,58	3,3	3,17	2,34	73,4
6	3,10	3,4	3,23	2,49	76,4
7	7,52	3,4	2,66	2,18	80,5

Reaktionsbedingungen: M = 300 g, S = 4,18% Feststoffe, E/S wie oben angegeben, pH nicht eingestellt, T = 45 °C, t = 18

Tabelle Ba VI
HPLC-Werte

Zucker-Art (Neutral)	Versuch Nr.		
	2	3	4
	% neutrale Zucker		
Hochmolekular (DP4+)	43,6	31,9	25,3
Disaccharide	4,6	4,8	—
Glucose	20,4	23,7	27,8
Galactose	5,0	5,9	7,3
Fructose/Arabinose	26,4	32,2	33,2
Galacturonsäure	nicht gemessen		

Alle entsprechend der obigen Tabelle Ba VI entstandenen Zucker konnten zu Alkohol fermentiert oder für andere Zwecke verwendet werden.

Ba 6. Herstellung von Sojamilch

Sojamilch kann leicht durch vollständige Verflüssigung von gemahlenen Sojabohnen und anschliessende Homogenisierung des erhaltenen Gemisches hergestellt werden. Sojamilch wird häufig hergestellt durch Einweichen von Sojabohnen in siedendes Wasser, Mahlen der eingeweichten Bohnen und Extraktion mit Wasser und anschliessende Trennung des unlöslichen Rückstandes, z.B. von Proteinen und Polysacchariden. Um die Ausbeute an Sojamilch zu verbessern, können diese unlöslichen Rückstände durch Umsetzung mit der SPS-ase verflüssigt werden.

Beispiel Ba 6.1

Das Sojamilchverfahren wird durch die folgende Reihe von Enzymreaktionen erläutert, wobei Berechnungen des Protein-Löslichkeitsindex (PSI, %) und des Feststoff-Löslichkeitsindex (DSI, %), die nach Abtrennung bei pH 7 erhaltenen Ausbeuten zeigen (siehe Tabelle Ba VII). Die Enzymreaktionen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Substrat:	Vollfettes Sojamehl (Dansk Sojakagefabrik A/S)
Menge des Reaktionsgemisches:	220 g
Menge des Substrats:	20 g
Temperatur:	50 °C
pH:	4,5 (6n HCl)
Reaktionszeit:	Reihe A 1 h
Reaktionszeit:	Reihe B 0,5–6 h
Enzym:	SPS-ase (KRF 68)
Enzymmenge:	Reihe A: E/S-Verhältnis (Gew./Gew.) 0–8,0 Reihe B: E/S-Verhältnis (Gew./Gew.) 1,0

Nach der Reaktion wurde der pH-Wert mit Hilfe von 4n NaOH auf 7 eingestellt und die Trennung durch 15 min langes Zentrifugieren bei $300 \times g$ durchgeführt.

- ⁵ Ba 7. Behandlung zur Erhöhung der zurückgewinnbaren Menge an löslichen Kaffeebestandteilen
Es hat sich gezeigt, dass die Behandlung von Kaffeebohnen bei unterschiedlichen Stufen während der Herstellung von Instantkaffee zu einer erhöhten Ausbeute an löslichen Kaffeebestandteilen führt. So können z.B. verbrauchte Kaffeerückstände (Kaffeesatz) oder grüne Bohnen enzymatisch mit günstigen Ergebnissen behandelt werden.

Tabelle Ba VII
Berechnung der Mengen-Bilanz im Zusammenhang mit dem enzymatischen Sojamilch-Verfahren

Reihen	Reaktionszeit h	Enzymmenge E/S %	Reaktionsmischung % Protein	% Feststoffe	überstehende Flüssigkeit % Protein	% Feststoffe	Löslichkeits-Indices PSI %	DSI %
A	1,0	0	3,65	8,70	1,87	5,72	49,6	63,7
	1,0	0,5	3,68	8,74	2,41	6,28	63,7	70,0
	1,0	1,0	3,71	8,78	2,48	6,43	65,1	71,4
	1,0	2,0	3,78	8,86	2,98	7,18	77,5	79,5
	1,0	4,0	3,92	9,03	3,36	7,69	84,6	83,9
	1,0	8,0	4,19	9,37	3,76	8,08	88,5	85,0
B	0,5	1,0	3,64	8,78	2,39	6,41	64,0	71,1
	1,0	1,0	3,64	8,78	2,56	6,60	68,7	73,4
	2,0	1,0	3,63	8,78	2,79	6,91	75,2	77,1
	4,0	1,0	3,63	8,78	3,10	7,29	84,0	81,7
	6,0	1,0	3,63	8,78	3,39	7,69	92,3	86,5

Bb 1. Verhinderung und/oder Abbau des «Schleiers» in Apfel- oder Birnensaft

Nach der Herstellung von Apfelsaft oder Birnensaft und anderen Fruchtsäften, die klar sein sollen und die vorher mit üblichen Pectinase- und Cellulasezubereitungen behandelt worden sind, um die Bildung einer Trübung zu vermeiden, können «Schleier» auftreten. Es hat sich gezeigt, dass die SPS-ase-Zubereitungen gut geeignet sind zum Abbau derartiger Schleier, die hauptsächlich aus Araban, das an Proteine gebunden ist, bestehen.

Beispiel Bb 1

Birnensaftkonzentrat, das hergestellt worden war durch enzymatische Verflüssigung von Rückständen von der Herstellung von Birnenkonserven unter Verwendung von Cellulast® und Pectinex®, wurde beim Stehen wolkig. Der «Schleier» wurde isoliert und mit 0,01 n H₂SO₄ 24 h hydrolysiert und durch HPLC analysiert. Das Chromatogramm zeigte Arabinose und kleine Mengen an Oligosacchariden.

Durch Inkubation von 0,5% (Gew./Vol.) dieses Kohlenhydrats in 1 mMol Acetatpuffer, 3 h bei pH 4,5 und 40 °C mit SPS-ase (KRF 68 und KRF 92 1:1) mit einer Enzymkonzentration von 0,05% (Gew./Vol.) zeigte es sich, dass 84% der ursprünglichen schleierbildenden Kohlenhydrate (Feststoffe) in Arabinose umgewandelt wurden.

Auch ein verdünntes Birnenkonzentrat (20° Brix) wurde 2 h bei 40 °C mit einer Enzymmenge von 0,15% (Gew./Vol.) der oben erwähnten SPS-ase oder mit 1% (Gew./Vol.) eines Handelsproduktes, das als Clarex® bezeichnet wird, behandelt. Es zeigte sich, dass die SPS-ase imstande war, den relativen HPLC-Spitzenbereich eines arabanartigen Schleiers um

86% zu verringern, während die entsprechende Verringerung mit Clarex® (in einer wesentlich höheren Menge als die SPS-ase-Zubereitung) nur 78% betrug.

Bb 2. Anwendung als Klärmittel für Weisswein

Es hat sich gezeigt, dass Weissweine, die eine sehr unerwünschte Trübung zeigen, wirksam mit Hilfe von SPS-ase geklärt werden können. Es hat sich gezeigt, dass das Trübung bildende Material hauptsächlich aus Arabinogalactanen besteht, die an Hydroxyprolinreste in einem Zellwand-Strukturprotein gebunden sind.

Bb 3. Herstellung von ISSPH oder anderen pflanzlichen Proteinhydrolysaten

Vor der Abtrennung des ISSPH (isoelektrisch löslichen Sojaproteinhydrolysats) oder anderer pflanzlicher Proteinhydrolysate aus der Aufschlammung, wie in der US-PS 4 100 024 oder in Process Biochemistry, Bd. 14, Nr. 7 (1979), S. 6 bis 8 und 10 bis 11 beschrieben, kann das Reaktionsgemisch mit einer SPS-ase-Zubereitung behandelt werden. Hierdurch wird eine leichtere Trennung erzielt.

Bb 4. Maische-Enzym für die Brauereiindustrie

Bei der Herstellung von Bier beeinflussen Kohlenhydrate der Ausgangsmaterialien z.B. der β-Glucane von Malz und Gerste die Viskosität und Filtrierbarkeit des Extraks. Die Zugabe von SPS-ase während des Maischens verringert die Viskosität des Extraks und verbessert die Filtrierbarkeit und die Ausbeute an Extrakt. Darüber hinaus führt die Zugabe von SPS-ase während des Maischvorganges zu einer Verbesserung der Fermentierbarkeit des Extraks und des Stickstoffgehalts in dem Extrakt.

Beispiel Bb 4.1

Im Labor wurden 50 g gemahlene Körner, bestehend aus 50% Malz und 50% Gerste, mit 275 g Wasser (15% Feststoffgehalt) nach dem folgenden Maischdiagramm vermaischt:
52 °C (60 min)/63 °C (60 min)/76 °C (30 min).

Um die Wirkung der SPS-ase zu zeigen, wurden vier Versuche durchgeführt, siehe die im folgenden angegebene Tabelle, wobei die Enzyme während des Maischvorgangs zugegeben wurden (pH der Maische 5,5 bis 6,0).

Enzym	keines	Cereflo	SPS-ase (KRF 68)
Aktivität der β-Glucanase/g	200	1630	1630
Menge an Enzym per kg Körner	0	BGU	FBG
Gesamtmenge der Enzym-Aktivitätseinheiten per kg Körner	0	300	80 FBG
Filtrationsgeschwindigkeit des Extrakts nach 10 min	120 ml	135 ml	160 ml
Viskosität des Extrakts 10° Balling (25 °C)	1,52	1,36	1,36
	mPa·s	mPa·s	mPa·s
			1,30

BGU = β-Glucanase-Einheiten, bestimmt nach der analytischen Methode AF 70/4-GB, erhältlich von Novo Industri A/S.

FBG = Pilz-β-Glucanase-Einheiten, bestimmt nach der analytischen Methode AF 70.1/2-GB, erhältlich von Novo Industri A/S.

Der einzige Unterschied zwischen BGU und FBG ist der pH-Wert, bei dem die Enzymbestimmung durchgeführt wurde: pH 7,5 für BGU und pH 5,0 für FBG.

Cereflo ist eine bakterielle β-Glucanasezubereitung, wie sie beschrieben ist in dem Informationsblatt B 214b-GB 1500 Juli 1981, erhältlich von Novo Industri A/S.

Beispiel Bb 4.2

Im Labor wurden 50 g gemahlene Körner, bestehend aus 40% Malz und 60% Gerste, mit 150 g Wasser (25% Feststoffgehalt) entsprechend dem folgenden Schema vermaischt: 45 °C (60 min)/63 °C (90 min)/75 °C (15 min).

Um die Wirkung der SPS-ase nachzuweisen, wurden drei Versuche durchgeführt, siehe die im folgenden angegebene Tabelle, wobei die Enzyme während des Vermaischens zugegeben wurden (pH-Wert der Maische 5,5 bis 6,0).

Enzym	keines	Ceremix	SPS-ase (KRF 68) + Ceremix, wie im vorhergehenden Versuch zugegeben
Aktivität der β-Glucanase/g	200	BGU	1630 FBG
Enzymmenge per kg Körner	-	1,65 g	0,033 g
Gesamtmenge der Enzym-Aktivitäts-Einheiten per kg Körner	0	330	50 FBG
Filtrationsgeschwindigkeit des Extrakts nach 30 min	48 ml	98 ml	111 ml
Extrakt, °Balling	18,6	19,0	19,5
Viskosität des Extrakts 10° Balling (25 °C)	1,72	1,37	1,27
	mPa·s	mPa·s	

Die Definition von BGU und FBG ist wie in Beispiel Bb 4.1 angegeben. In der letzten Spalte der obigen Tabelle ist nur die Menge und Aktivität von SPS-ase angegeben.

Ceremix ist eine bakterielle β-Glucanasezubereitung, wie sie beschrieben ist in dem Informationsblatt B 216 b-GB 1000 Febr. 1982, erhältlich von Novo Industri A/S.

Bb 5. Enzymatischer Zusatz zur Anwendung während der Bierfermentation und/oder Lagerung

SPS-ase kann während der Fermentation von Extrakt oder während der Lagerung von Bier zugesetzt werden, um den Gehalt an β-Glucanen zu verringern und dadurch die Filtrierbarkeit und Stabilität gegenüber einer Schleierbildung von Bier zu verbessern. SPS-ase zeigt auch eine Wirkung auf Proteine, die für die beim Kühlung auftretende Trübung verantwortlich sind.

Bb 6. Mittel zur leichteren Entfernung von Mandelhäutchen
Während der mechanischen Entfernung von Mandelhäuten nach dem Blanchieren von Mandeln wird ein bestimmter Anteil von Mandelhäutchen nicht entfernt. Es hat sich gezeigt, dass eine Enzymbehandlung der Mandeln zu einer Verringerung des erwähnten Prozentsatzes führt.

Bc 1. Zersetzung unterschiedlicher Abfallprodukte
Im Zusammenhang mit bestimmten Herstellungsverfahren werden grosse Mengen kohlenhydrathaltiger Abfallprodukte gebildet. Z. B. ist dies der Fall im Zusammenhang mit der Herstellung von Sojaisolat durch Wassereztraktion und Säureausfällung, Sojamilch und Sojaquark (einer speziellen Art von japanischem Käse). Auch in diesem Zusammenhang kann Abfallpulpe aus z.B. Äpfeln, Birnen oder Zitrusfrüchten erwähnt werden. Es hat sich gezeigt, dass eine SPS-ase-Zubereitung imstande ist, diese kohlenhydrathaltigen Abfallprodukte vollständig zu verflüssigen und fermentierbare Zucker zu bilden, die als Ausgangsmaterial zur Ethanolfermentation verwendet werden können.

Beispiel Bc 1.1

Bei der üblichen Herstellung von Sojamilch oder Sojaquark werden Sojabohnen häufig in siedendem Wasser eingeweicht, gemahlen und mit heißem Wasser extrahiert, woraufhin eine Trennung durchgeführt wird. Der Rückstand von dieser Trennung ist das Material, das für diesen Versuch angewandt wird. Die flüssige Phase ist die Sojamilch, die weiter zur Herstellung von Sojaquark angewandt werden kann.

10 kg ganze Sojabohnen, erhalten von Aarhus Oliefabrik A/S, wurden gleichzeitig mit 70 l siedendem Wasser in einer Fryma-Mühle Typ MZ 110 vermahlen. Die gemahlene Aufschämmung wurde dann 15 min oberhalb 85 °C gehalten, um

die natürlichen Bohnenenzyme zu inaktivieren, die den bekannten Sojabohnenbeigeschmack erzeugen. 5 l dieser Sojabohnenaufschämmung wurden dann im Labor 15 min mit 3000 × g zentrifugiert. Die Analyse zeigte, dass der Rückstand 20,45% bzw. 20,06% Feststoffe (Doppelbestimmungen, berechnetes Mittel 20,26%) enthielt. Es wurde langsam 6 n HCl zugegeben und mit einem Spatel in den Rückstand eingearbeitet, bis ein pH-Meter 4,50 zeigte, wenn die Elektrode direkt in die Masse eingetaucht wurde.

In einem 500-ml-Becher-Glas wurde bei 50 °C Enzymreaktionen an 2 × 200 g der Masse mit zwei verschiedenen Mengen an SPS-ase (KRF 68) durchgeführt, nämlich E/S = 0,5%, bezogen auf die Feststoffe und E/S = 3,0%, bezogen auf die Feststoffe. Das trockene Enzym wurde zu der Masse zugegeben. Während der ersten 1 bis 2 h wurde mit einem Spatel gerührt und anschließend war die Menge soweit verflüssigt, dass mit einem Magnetrührer erfolgreich gerührt werden konnte. Die Gesamtreaktionszeit betrug 21 h. Während der Reaktion wurde die Osmolalität mit einem Osmometer

(Advanced Digimatic 3DII von Advanced Instruments Inc.) gemessen. Die Ergebnisse in Tabelle Bc I zeigen den Verlauf der Reaktion. Am Ende des Versuchs wurde das Gemisch 15 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. An der Oberfläche der überstehenden Flüssigkeit trat eine Ölschicht auf, deren Volumen bestimmt wurde. Als Bodenschicht trat eine lockere Schlammschicht auf. Die überstehende Flüssigkeit einschließlich des Öls wurde mit einer Pipette entfernt. Das Öl wurde mit der klaren wässrigen Phase durch Homogenisieren zusammengegeben und eine Probe zur Bestimmung des Fest-

stoffgehalts abgezogen. Die in Tabelle Bc I angegebenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass dieses Abfallprodukt durch enzymatische Reaktion verflüssigt werden kann und dass rohes Öl, wie in Abschnitt A4 angegeben, erhalten werden kann. Nach Gewinnung des Öls kann der gelöste Rückstand auf verschiedene Weise verwendet werden, z.B. zur Fermentation zu wertvollen Verbindungen oder zum Einengen und Trocknen und anschliessende Verwendung als Futtermittel oder Nahrungsmittelprodukt oder nach weiterer Reinigung zur Herstellung wertvoller Produkte.

Tabelle Bc I
Bei der Verflüssigung von Sojamilch und Sojaquark erhaltene Ergebnisse

Reaktionsbedingungen und Versuch A			Versuch B		
	Ergebnisse				
Menge des Rückstands	200 g		200 g		
Menge an SPS-ase (KRF-68)	0,20 g		1,20 g		
Temperatur	50 °C		50 °C		
pH	4,50		4,50		
Reaktionszeit	21 h		21 h		
Ergebnisse, gemessen mit dem Osmometer während der Reaktion	t min	Osmola-ΔOsmolalität mOsm	t min	Osmola-ΔOsmolalität mOsm	
ΔOsmolalität ist der korrigierte Wert für die Osmolalität der Mischung bei t = 0	0 10 40 95 250 1260	287 313 391 501 634 907	0 26 104 214 347 620	282 368 497 718 875 1145	0 86 215 319 593 863
Reaktionsmischung					
Feststoffe		20,3%		20,7%	
überstehende		18,0%		19,4%	
Flüssigkeit: Feststoffe					
überstehende		8–10%		8–10%	
Flüssigkeit: Ölgehalt					
Berechnung % Lösliche Feststoffe		88,6%		93,5%	

Bc 2. Verzuckerung und gleichzeitige Fermentation

Kohlenhydrathaltige Pflanzenmaterialien, z.B. Knollen, wie Jerusalem-Artischocken, Kartoffeln, süsse Kartoffeln, Cassawa oder Pulpe von solchen Knollen, d.h. das nach Entfernung der extrahierten Komponenten verbleibende Material kann durch Behandlung mit einer SPS-ase-Zubereitung verzuckert und gleichzeitig die erhaltenen fermentierbaren Saccharide zu Ethanol fermentiert werden.

Beispiel Bc 2.1

Die Herstellung von Ethanol durch Fermentation der abgebauten inulinhaltigen Jerusalem-Artischocken wurde im Labormassstab durch gleichzeitige Verzuckerung mit SPS-ase und Inulinase und bei vier unterschiedlichen Vorbehandlungen der Jerusalem-Artischocken untersucht.

SPS-ase: Es wurde die SPS-ase-Zubereitung KRF 68 angewandt

Inulinase: Die Inulinase wurde gebildet durch Fermentation von Asp. ficuum (CBS 55 565). Die Inulinaseaktivität wurde bestimmt, wie auf S. 99 von Research Disclosure Nr. 21 234 (Dezember 1981), S. 456–458 angegeben.

Fermentation im Labor: 150 g Anteile der vorbehandelten Mische (später beschrieben) wurden nach Zugabe von 4,5 g Bäckerhefe und 1 ml einer 4%igen Lösung von Pluronic als Antischaummittel fermentiert. Die Fermentationskolben waren mit CO₂-Fallen, enthaltend 98% Schwefelsäure, versehen, und die Fermentation wurde durch Messung des Gewichtsverlustes aufgrund von freigesetztem CO₂ verfolgt. Der Kolbeninhalt wurde während der bei 30 °C durchgeföhrten Fermentation gerührt. Es wurden für jeden untersuchten Parameter drei Kolben angewandt.

In Tabelle Bc II ist der durch Freisetzung von CO₂ auftretende Gewichtsverlust in Ethanol umgerechnet, angenommen, dass 1 Mol freigesetztes CO₂ 1 Mol C₂H₅OH, d. h. 1 g CO₂ ~ 46/44 g C₂H₅OH entspricht.

Vorbehandlung der Artischocken:

Behandlung A: 14,1 kg Artischocken (22,8% Feststoffgehalt) wurden 20 min bei 140 °C und 4 bis 5 bar gekocht (Heize). Das Gewicht nach dem Kochen betrug 19,0 kg (~ 16,9% Feststoffgehalt). Die Fermentation wurde direkt an der Maische durchgeführt.

Behandlung B: Gewaschene und in Scheiben geschnittene Artischocken wurden mit Wasser (1:1) in einem

Waring-Mischer vermischt. Die Maische wurde dann 1 h bei 85 °C und pH 4,5 behandelt.

Behandlung C: Wie B, jedoch ohne Einstellung des pH-Werts.

Behandlung D: Wie B, aber ohne Wärmebehandlung und ohne pH-Wert-Einstellung.

Ergebnisse: In Tabelle Bc II zeigen die Ergebnisse die Wirkung des Zusatzes von SPS-ase zu der vorbehandelten Maische auf die Ethanolausbeute. Eine deutliche Verbesserung der Ethanolausbeute wurde bei allen vorbehandelten Maischen erzielt, wenn SPS-ase zugesetzt wurde.

Tabelle Bc II

Fermentations-Ergebnisse im Zusammenhang mit der gleichzeitigen Fermentation und enzymatischen Verzuckerung von Jerusalem Artischocken

Vorbe-Zugabe von hand-Inulinase zu 1 g Feststoff	SPS-ase E/S %	Verlust an CO ₂ (g) nach 42–44 h Fermentation	% entstandenes Ethanol im Verhältnis zu Feststoffen
A	1,5	7,65 ± 0,05	31,5
	1,5	8,07 ± 0,08	33,2
B	1,5	4,85 ± 0,03	29,7
	1,5	5,41 ± 0,03	33,1
C	1,5	5,70 ± 0,05	34,8
	1,5	5,97 ± 0,01	36,5
	1,5	6,13 ± 0,06	37,5
	1,5	6,13 ± 0,00	37,5
	1,5	6,18 ± 0,05	37,8
D	1,5	5,77 ± 0,02	35,3
	1,5	5,89 ± 0,00	36,0
	1,5	6,04 ± 0,11	36,9
	1,5	6,01 ± 0,01	36,7
	1,5	6,02 ± 0,03	36,8
	0	5,48 ± 0,02	33,5

Bc 3. Abbau von Cellulose

Es hat sich gezeigt, dass cellulosehaltige Materialien, wie Stroh, z.B. Weizenstroh, Sägespäne, Papier und Lignocellulose, in einem grösseren Ausmass mit einer SPS-ase-Zubereitung hydrolysiert werden können als mit üblichen Cellulasen. Das wird durch das folgende Beispiel gezeigt, bei dem ein kristallines Cellulosematerial (Avicel) mit Hilfe einer üblichen Cellulase Celluclast® 200, erzeugt von Trichoderma reesei sowie der SPS-ase-Zubereitung KRF 68, behandelt worden ist.

Beispiel Bc 3.1

Avicel wurde in Wasser suspendiert (20% Feststoffe), der pH-Wert auf 5 eingestellt und die Temperatur auf 50 °C gehalten. Nach 24 h langer Reaktion wurde die Aufschlammung filtriert und der Gehalt an reduzierendem Zucker (mg Glucose/g Avicel) gemessen. Bei Verwendung von Enzymmengen von 5 und 20% wurden die folgenden Werte für den Cellulosegehalt gefunden:

Tabelle Bc III

Enzym	E/S %	mg Glucose/g Avicel
Celluclast	5	80
SPS-ase	5	200
Celluclast	20	100
SPS-ase	20	340

Bc 4. Anwendung als Backhilfe

Es hat sich gezeigt, dass SPS-ase-Zubereitungen ausgezeichnet geeignet sind als Backhilfen. So ist es, wenn eine SPS-ase-Zubereitung zu dem trockenen Mehl vor der Herstellung des Teiges zugesetzt wird, möglich, ein Brot mit einer besseren Qualität bezüglich Volumen, Krume und Geschmack zu erhalten. So ist es möglich, ein Brot hoher Qualität aus einem Weizenmehl geringer Qualität herzustellen, wenn eine SPS-ase-Zubereitung als Zusatz verwendet wird.

10

Bc 5. Verbesserung der Ausbeute an Alkohol und an Biomasse während der Fermentation von Sulphitlauge von der Papierherstellung

Es hat sich auch gezeigt, dass die Ausbeute an Ethanol verbessert werden kann, wenn Sulphitlauge von der Papierherstellung mit einer SPS-ase-Zubereitung behandelt wird, bevor sie als Kohlenhydratquelle zur Fermentation von Ethanol verwendet wird. Sulphitlauge von der Papierherstellung kann auch angewandt werden zur Herstellung von Biomasse, 20 z.B. Einzelzellprotein durch Fermentation, und auch in diesem Falle wird die Ausbeute an Biomasse verbessert, wenn die Sulphitlauge vorher mit einer SPS-ase-Zubereitung behandelt worden ist. Auch können der Abbau aufgrund des Vorhandenseins der SPS-ase-Zubereitung sowie die Fermentation gleichzeitig durchgeführt werden.

Bc 6. Entwässerung von biologischen Schlammprodukten

Während der üblichen Wasserextraktion von vielen biologischen Materialien aus Pflanzenrohmaterialien entstehen 30 grosse Volumina an unlöslichem Rückstand, bestehend aus grossen Mengen gequollener Polysaccharide. Das ist z.B. der Fall, wenn Sojamilch, Sojaquark oder Sojaisolat durch Wasserextraktion von Sojabohnen, entfettetem Sojamehl oder weissen Flocken hergestellt werden. Das strukturell gequollene Polysaccharidmaterial kann dann in geringem Ausmass mit SPS-ase behandelt werden, wodurch die Netzstruktur des Materials geöffnet wird und nur geringe Mengen Kohlenhydrate gelöst werden. Dadurch wird das Material entwässert und folglich ein höherer Feststoffgehalt in dem Schlamm 40 erhalten im Vergleich mit einem Produkt, das ohne Enzymbehandlung erhalten wird. So führt das Enzymverfahren zu dem Vorteil eines wesentlich geringeren Energieverbrauchs zur Entfernung von Wasser durch Trocknen, und es eröffnet auch die Möglichkeit, ein billigeres trockenes Tierfuttermittel oder 45 massebildendes Mittel für Futterzwecke herzustellen.

Bc 7. Silage-Hilfsmittel

Es ist bekannt, Enzyme als Silage-Hilfsmittel zuzusetzen, um die Geschwindigkeit des Silierungsprozesses und die Fermentation der Silage zu verbessern. Es hat sich gezeigt, dass SPS-ase-Zubereitungen besser sind im Vergleich mit bekannten enzymatischen Silage-Hilfen.

55	Fig. Nr.	Bezieht sich auf	stellt dar
----	----------	------------------	------------

60	1	allgemeinen Teil der Beschreibung	Bindungswirkung zwischen SPS und Sojaprotein
	2	allgemeinen Teil der Beschreibung	Fliessschema, das die Herstellung von SPS beschreibt
65	3	Abschnitt 2	Eichkurve für HPLC-Gel-Filtrations-Chromatographie
	4	Abschnitt 2	HPLC-Gel-Filtrations-Chromatogramm von SPS

Fig. Nr.	Bezieht sich auf	stellt dar
5	Abschnitt 2	HPLC-Gel-Filtrations-Chro- matogramm von durch SPS-ase abgebautem SPS 5
6	Abschnitt 2 und 3	HPLC-Gel-Filtrations-Chro- matogramm der überstehenden Flüssigkeit von SPS, inkubiert mit Sojaprotein 10
7	Abschnitt 2	HPLC-Gel-Filtrations-Chro- matogramm der überstehenden Flüssigkeit von abgebautem SPS, inkubiert mit Sojaprotein 15
8	Abschnitt 3	HPLC-Gel-Filtrations-Chro- matogramm von APS, abgebaut durch Pectolyase
9	Abschnitt 3	HPLC-Gel-Filtrations-Chro- matogramm von APS, abgebaut durch SPS-ase 20

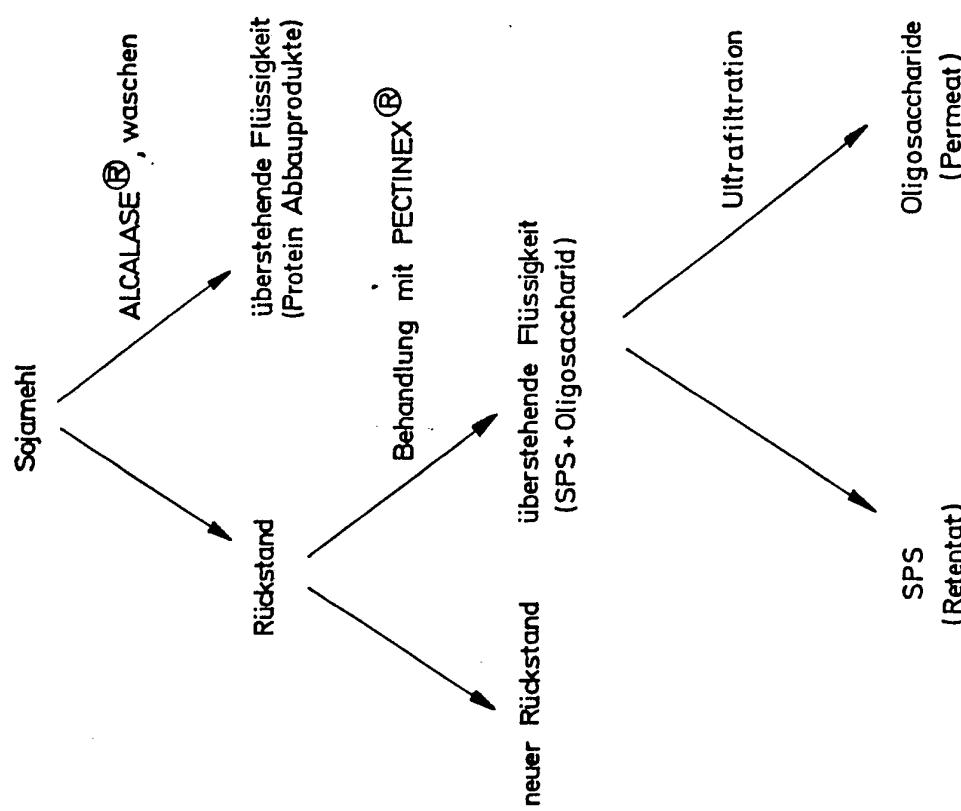


FIG. 2

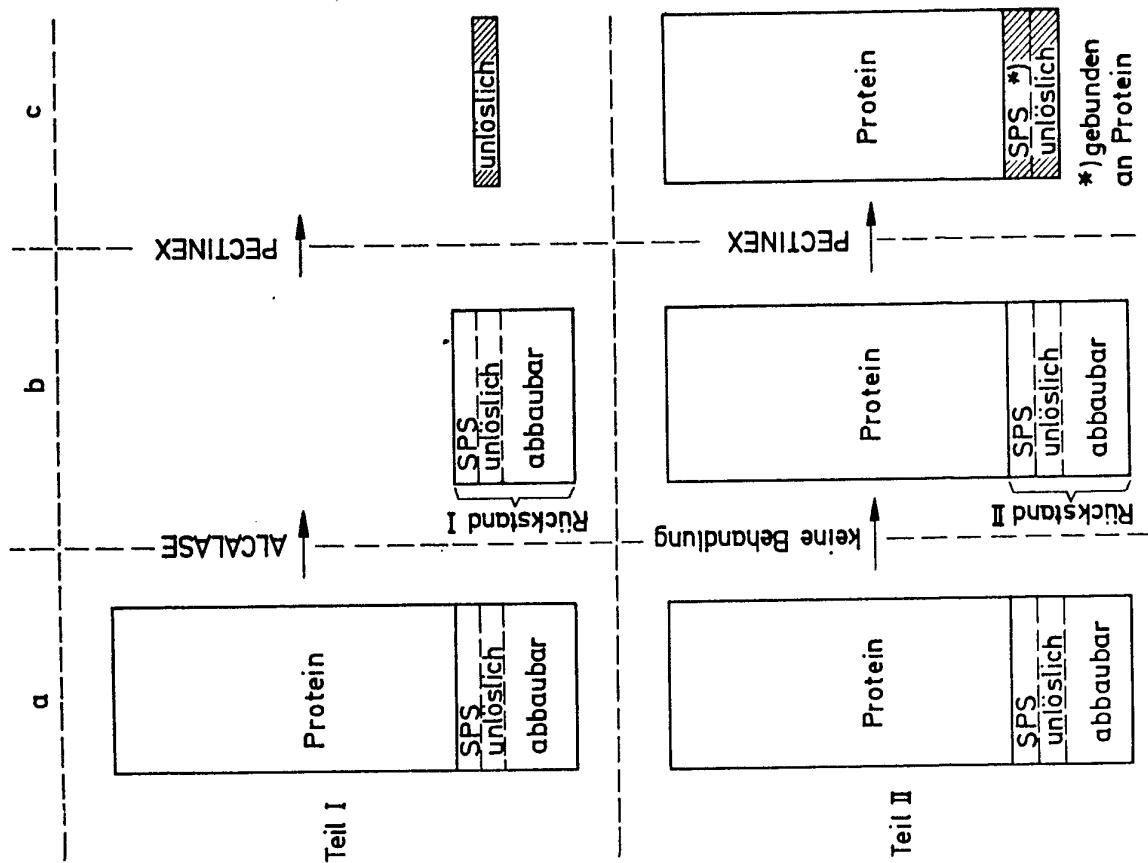


FIG. 1

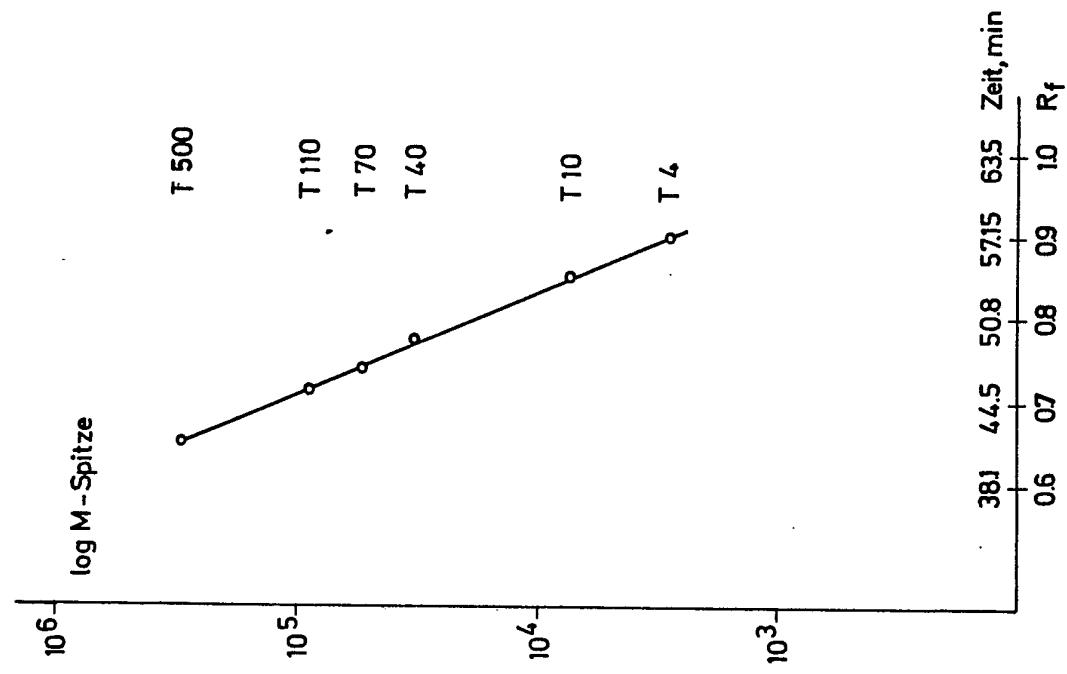


FIG. 3

FIG. 4

FIG. 5

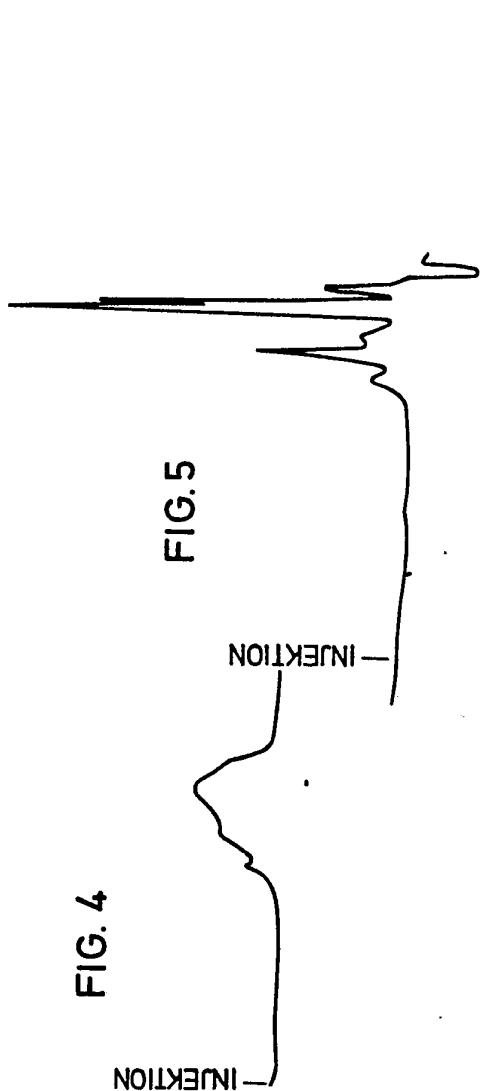


FIG. 6

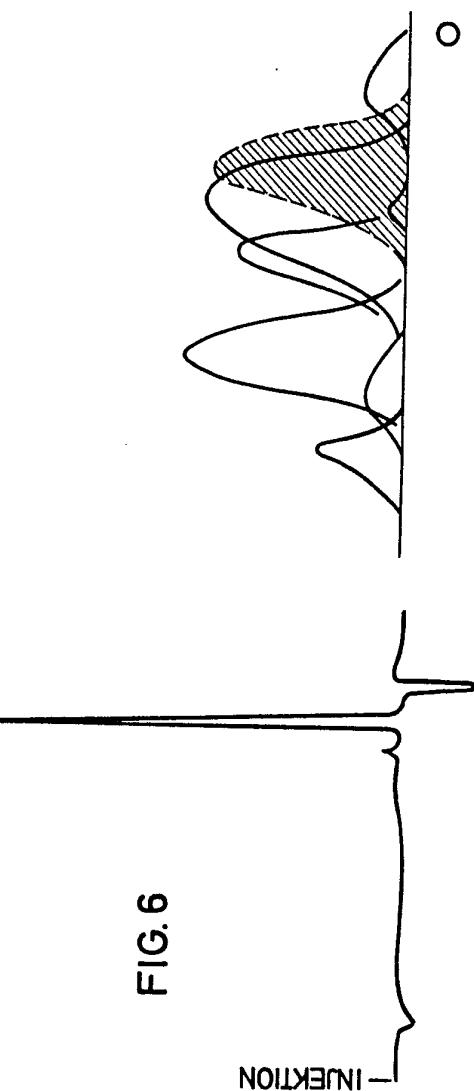


FIG. 11

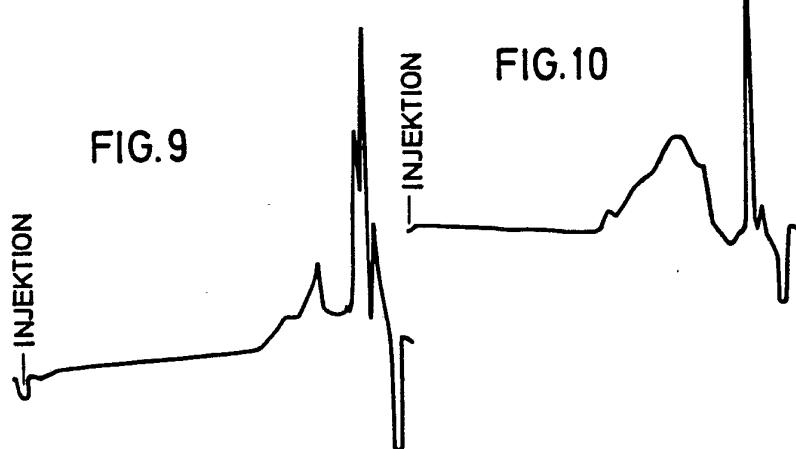
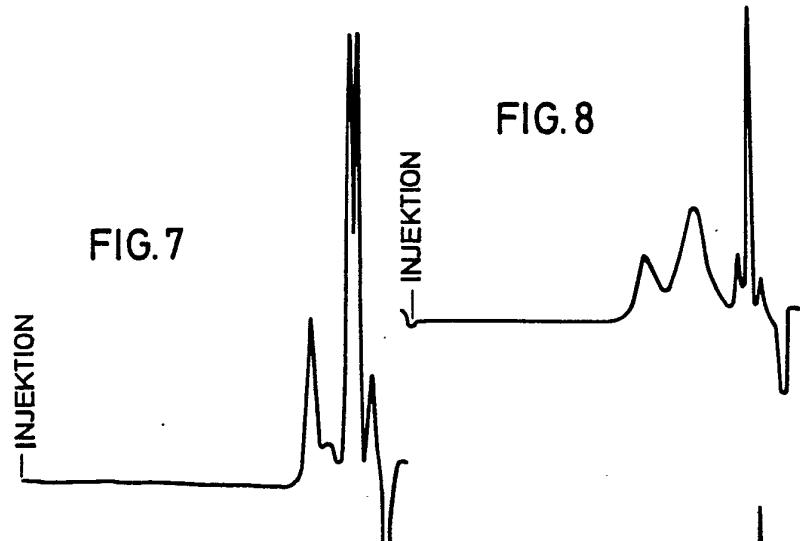
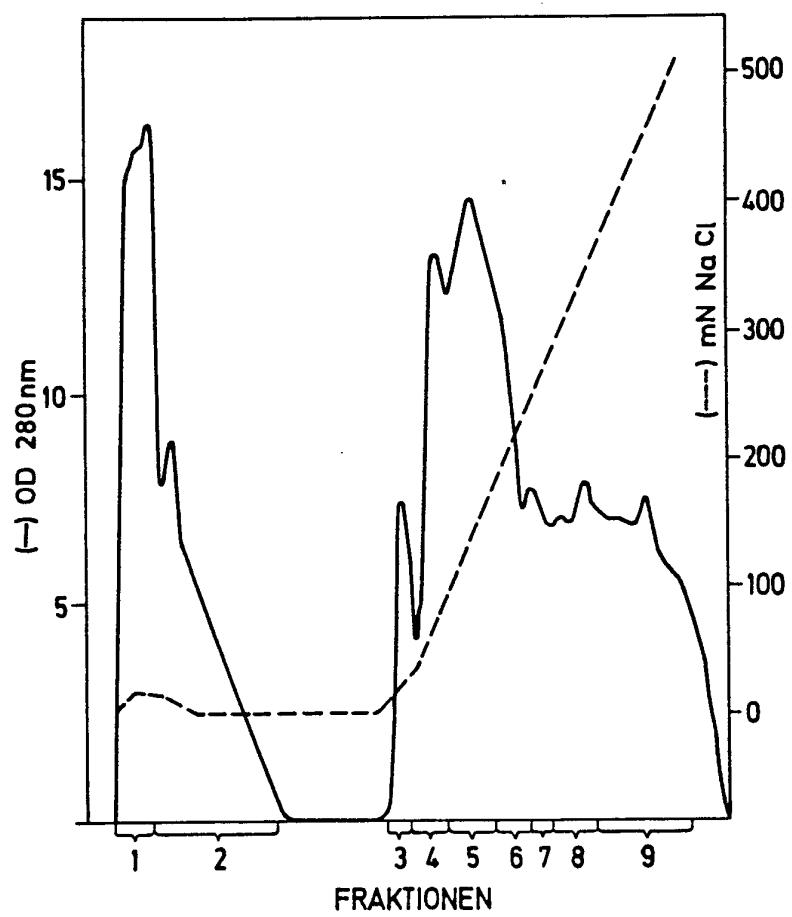


FIG. 12



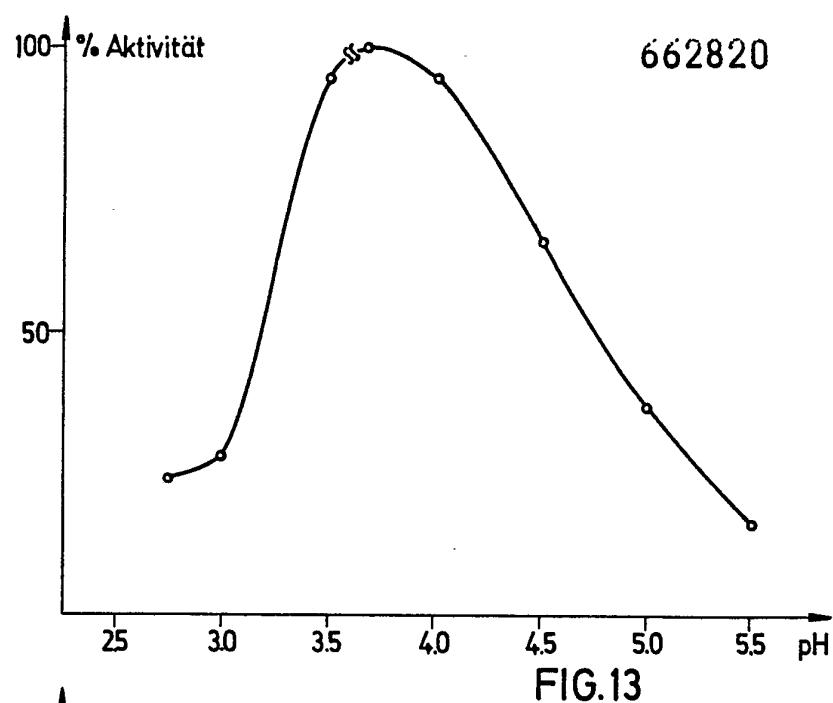


FIG.13

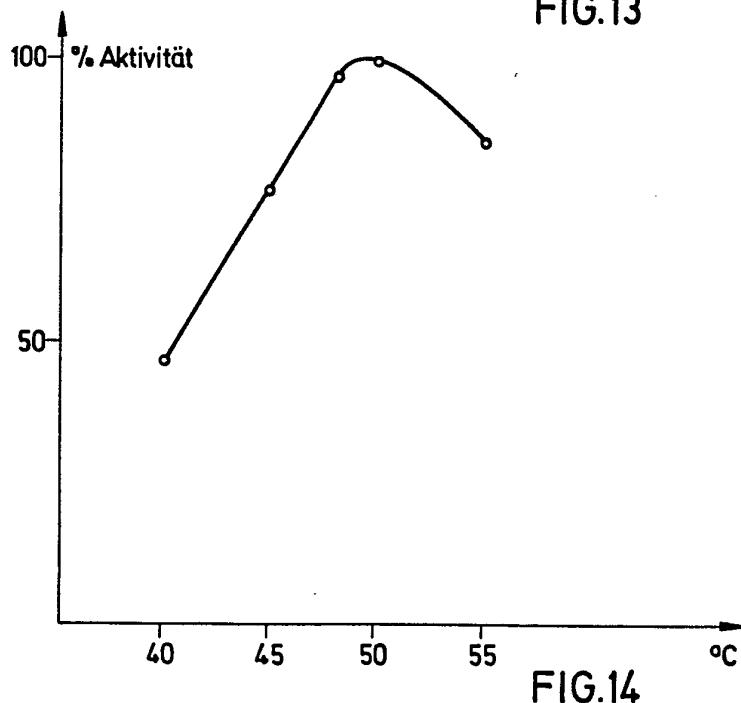


FIG.14

