



Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 467

Int.Cl.³

3(51) C 12 P 19/12

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 P/ 2552 312
(31) P3122216.1

(22) 02.06.82
(32) 04.06.81

(44) 13.06.84
(33) DE

(71) siehe (73)

(72) MATTES, RALF, DR.; BEAUCAMP, KLAUS, DR.; DE;

(73) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; MANNHEIM-WALDHOF, DE

(54) VERFAHREN ZUR SPALTUNG VON ALPHA-GALACTOSIDISCHEN ZUCKERN

(57) Die Erfindung betrifft ein Spaltungsverfahren von α -galactosidisch verknüpften Zuckern, die als Raffinose bei der Zuckerrübenextraktion anfallen. Ziel der Erfindung ist es, ein Abfallprodukt der Zuckerindustrie nutzbar zu machen. Erfindungsaufgabe ist es, mittels eines Spaltungsverfahrens über α -Galactosidase die Raffinose in Saccharose umzuwandeln. Erfindungsgemäß erfolgt dies, indem man ein α -Galactosidasepräparat einsetzt, welches frei von Invertase ist und aus einem Mikroorganismus stammt, der das Plasmid pBT 102 oder pBT 103 enthält. Es wird vorzugsweise das Enzym aus E. coli DSM 2091 oder aus Pseudomonas putida DSM 2107 eingesetzt.

Berlin, den 26.9.1983
Ausscheidung aus
AP C 12 N/240 391
(60 826/12)

Verfahren zur Spaltung von α -galactosidischen Zuckern

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Spaltung von α -galactosidischen Zuckern, das in der Zuckerindustrie breite Anwendung finden kann.

Bekannte technische Lösungen

Extrakte aus Zuckerrüben enthalten neben dem hauptsächlich vorkommenden Zuckeranteil Saccharose geringe Mengen Raffinose, ein Tri-saccharid, das aus den Monosacchariden Galactose/Glucose/Fructose besteht. Diese Raffinose hat die unangenehme Eigenschaft, daß sie sich in den Kristallisationsüberständen anreichert und bei Überschreiten von ca. 1 % an der Gesamt-Zuckermasse deren Kristallisation erschwert bzw. in gewissen Verfahren verhindert. Alleine in einer Zuckerfabrik fallen pro Tag während einer ca. 3monatigen Kampagne 5 bis 10 t Raffinose im Kristallisationsüberstand an. Alleine in der BRD dürfte die Raffinose-Menge pro Tag in der Dimension von mehr als 200 t liegen.

Die Überführung dieser Raffinose in Saccharose ist ein großer wirtschaftlicher Faktor, der bis jetzt nicht oder nur unzureichend bearbeitet werden konnte, da entsprechende Technologien in der gewünschten Präzision nicht zur Verfügung standen. Unter Präzision ist hier zu verstehen eine selektive Abspaltung der Galactose aus dem Raffinose-Molekül

unter Verbleib einer vom verwendeten Agens nicht weiter-spaltbaren oder abbaubaren Saccharose. Das ist bisher weder chemisch noch enzymatisch möglich.

Bekannt sind enzymatische Methoden, bei denen man sich eines natürlich vorkommenden Enzyms, der α -Galactosidase bedient. Dieses Enzym spaltet per Definition die Galactose quantitativ vom Raffinose-Molekül ab. Alle bekannten α -Galactosidase-Präparate sind jedoch bisher grundsätzlich mit einem Enzym verunreinigt, der Invertase, die Saccharose in Glucose und Fructose spaltet. In Anbetracht der hohen Konzentration an Saccharose im Verhältnis zur anwesenden Raffinose (ca. 60 bis 80 : 1) ist auch eine geringfügige Verunreinigung der α -Galactosidase durch Invertase sehr störend, weil erhebliche Anteile der Saccharose weiter-gespaltet werden und damit nur eine störende Verunreinigung gegen eine andere ausgetauscht wird. Entsprechende Verfahren konnten sich daher in der Praxis kaum einführen.

Hier ist anzumerken, daß es unter den bekannten, mit Invertase verunreinigten α -Galactosidasen, die bisher technologisch eingesetzt wurden, vor allem Pilz-Enzyme sind, die wegen ihrer Zugänglichkeit in der Zucker-Technologie Verwendung gefunden haben. Diese haben neben der genannten Verunreinigung noch den Nachteil, daß sie als Pilz-Enzyme ein Aktivitätsmaximum im deutlich sauren pH-Bereich haben, was bei einer großvolumigen Technologie (pro Fabrik mehrere 100 cbm/Stunde) erhebliche Probleme beim Ansäuern und Reneutralisieren aufwirft.

Eine einzige α -Galactosidase ist bekannt, die nach der Aufreinigung Invertase-frei sein soll. Diese α -Galactosi-

dase benötigt jedoch als Cofaktoren Mangan-Ionen und NAD, ist außerdem wenig stabil sowie nur in geringer Konzentration in der Biomasse vorhanden. Daher wurde diese α -Galactosidase im Verfahren unter den Bedingungen einer kontinuierlichen Zuckerfabrikation nicht in Betracht gezogen.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, ein Abfallprodukt der Zuckerindustrie nutzbar zu machen.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine α -Galactosidase bereitzustellen, die natürlicherweise absolut frei ist von Invertase. Gleichzeitig soll das Enzym noch folgende Eigenschaften haben:

Es soll sehr nahe beim Neutralpunkt seine höchste Aktivität entfalten, es sollte eine gewisse Temperaturstabilität zeigen und in relativ konzentrierten Zucker-Lösungen bzw. in Konzentraten von Pflanzenextrakten (Zuckerrüben) seine Aktivität über längere Zeit behalten, es soll keine Cofaktoren benötigen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Spaltung von α -galactosidisch verknüpften Zuckern wie Raffinose oder Stachyose mittels α -Galactosidase, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein α -Galactosidasepräparat verwendet, welches frei von Invertase ist und aus einem Mikroorganismus stammt, der das Plasmid pBT oder pBT103 enthält.

Die Herstellung von Mikroorganismen, die das Plasmid pBT 102 oder 103 enthalten und die Gewinnung der α -Galactosidase aus diesen ist in der DE-OS 3 122 216 eingehend beschrieben.

Bevorzugt wird das Enzym aus *E. coli* DSM 2091 oder *Pseudomonas putida* DSM 2107 verwendet.

Das verwendete Enzym ist frei von Invertasespuren und kann bei etwa neutralen pH-Werten Raffinose in Saccharosekristallisationsüberständen unter technisch anwendbaren Temperaturen spalten. Das Enzym benötigt keine Cofaktoren wie Mn-Ionen und NAD, es erwies sich als stabil und kann nach üblichen Methoden, wie z. B. Einwirkung auf bromcyanaktivierte unlösliche Polysaccharide, an Träger fixiert werden. Anstelle des isolierten Enzyms kann auch der Mikroorganismus selbst an geeignete Träger fixiert und in dieser Form technologisch eingesetzt werden. Dabei wird die infolge der Permease-Gen-Deletion für Raffinose unpassierbar gewordene Zellmembran durch den Fixierungsvorgang wieder für Raffinose durchgängig. In diesem Fall eignen sich die üblichen Fixierungsmethoden.

Die Isolierung der α -Galactosidase aus den Mikroorganismen kann in der für die Gewinnung von α -Galactosidase üblichen Weise erfolgen. Ein zweckmäßiges Verfahren besteht im Aufschluß der Biomasse nach üblichen Methoden wie Hochdruckdispersion, Ultraschallbehandlung und dergleichen. Zweckmäßig werden die für den Ursprungsmikroorganismus geeigneten Aufschlußmethoden angewendet.

Nach dem Aufschluß wird vorzugsweise eine Polyanionen-fällung durchgeführt, bei welcher die α -Galactosidase ge-

wöhnlich im Überstand verbleibt. Bevorzugt als Polyanionen werden Polyethylenimine, insbesondere solche mittleren Molekulargewichts.

Aus dem so erhaltenen Niederschlag kann das Enzym mit Ammoniumsulfat gefällt werden, wobei vorzugsweise die Fraktion 0,8 bis 1,6 M Ammonsulfat gewonnen wird. Durch Dialyse und Lyophilisierung erhält man in hohen Ausbeuten ein mehr als 90 % reines, zum technischen Einsatz geeignetes α -Galactosidase-Präparat.

Die erfindungsgemäß verwendete α -Galactosidase eignet sich weit besser zur Spaltung von Raffinose oder anderen alpha-galactosidisch verknüpften Zuckern, z. B. bei der Zuckerkristallisation aus Rüben-Zucker als die bisher bekannten α -Galactosidase-Präparate. Hierdurch wird es möglich, großtechnisch das Problem der Raffinoseanreicherung bei der Rüben-Zuckergewinnung wirtschaftlich zu lösen. Die erfindungsgemäß verwendeten ungereinigten oder gereinigten α -Galactosidase-Präparate lassen sich aber auch für andere Zwecke in der Lebensmitteltechnologie einsetzen, in denen eine Spaltung von α -galactosidischen Kohlehydraten erwünscht ist. Ein Beispiel hierfür ist die Entfernung von Stachyose aus Sojamehl. Diese Entfernung ist erforderlich, wenn das Sojamehl für Lebensmittelzwecke verwendbar sein soll.

Ausführungsbeispiel

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung weiter:

Spaltung von Raffinose im Kristallisationsablauf einer Zuckerfabrik

45 ml Ablauf, die 802 mg Raffinose enthielten, wurden mit 45 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Diese Lösung wurde in Parallelversuchen sowohl mit einem zellfreien Extrakt als auch mit Toluol-behandelten Zellen des Stammes E. coli DSM 2091, der das Plasmid pBT 102 enthält, inkubiert, wobei Extrakt bzw. behandelte Zellen je 57 Einheiten α -Galactosidase enthielten.

Das Gemisch wurde für 60, 120 und 180 Minuten bei 40 °C belassen. Zu den genannten Zeiten wurde der Galactose-Gehalt der Lösung mittels eines enzymatischen Tests ermittelt und die Restmenge Raffinose im Ansatz kalkuliert.

Nach den angegebenen Behandlungszeiten wurde eine Restmenge Raffinose von 459, 378 und 315 mg entsprechend einer Herabsetzung des ursprünglichen Raffinosegehaltes auf 57,2, 47,1 und 39,2 % gefunden. Die nachstehende Tabelle faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

T a b e l l e

90 ml Kristallisationsablauf-Lösung, enthaltend 802 mg Raffinose, behandelt mit 57 U α -Galactosidase bei 40 °C und pH 6,5.

-7-

26.9.1983

62 984/12

Behandlungszeit (min)	Raffinose-Gehalt (mg)	% vom Ausgangswert
0	802	100,0
60	459	57,2
120	378	47,1
180	315	39,2

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Spaltung von α -galactosidisch verknüpften Zuckern wie Raffinose oder Stachyose mittels α -Galactosidase, gekennzeichnet dadurch, daß man ein α -Galactosidasepräparat einsetzt, welches frei von Invertase ist und aus einem Mikroorganismus stammt, der das Plasmid pBT 102 oder pBT 103 enthält.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Enzym aus *E. coli* DSM 2091 oder aus *Pseudomonas putida* DSM 2107 eingesetzt wird.