

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164869 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5029/86

(51) Int.Cl.5

C 07 H 5/02
C 12 P 19/12

(22) Indleveringsdag: 20 okt 1986

(41) Alm. tilgængelig: 22 apr 1987

(44) Fremlagt: 31 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 okt 1985 GB 8525871

(71) Ansøger: *Tate & Lyle Public Limited Company; Sugar Quay; Lower Thames Street; London EC3R 6DQ, GB

(72) Opfinder: Elner Brean *Rathbone; GB, Khizar Sultan *Mufti; GB, Riaz Ahmed *Khan; GB, Peter Samuel James *Cheetham; GB, Andrew John *Hacking; GB, Jonathan Seth *Dordick; GB

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) 4,1',6',6''-tetrachlor-4,1',6',6''-tetraeoxygalactoraffinose (TCR) samt en fremgangsmåde til fremstilling af sucralose ud fra TCR

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5029-86

O- α -D-6-chlor-6-deoxygalactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-4-chlor-4-deoxygalactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-1,6-dichlor-1,6-dideoxyfructofuranosid (TCR) kan anvendes til fremstilling af sucralose, idet en opløsning af TCR inkuberes i nærværelse af et enzym, som fjerner 6-chlor-6-deoxygalactosyldelen fra 6-stillingen, især et enzym, som er derivet fra en stamme af *Mortierella vinacea*, *Circinella muscae* eller *Aspergillus niger*. TCR fremstilles ved at behandle raffinose med thionylchlorid i nærværelse af triphenylphosphinoxid eller -sulfid.

DK 164869 B

Den foreliggende opfindelse angår den hidtil ukendte tetra-
chlorerede raffinoseforbindelse 4,1',6',6''-tetrachlor-
4,1',6',6''-tetradeoxygalactoraffinose samt anvendelse
deraf til fremstilling af højintensitetssødemidlet sucralo-
5 se (4,1',6'-trichlor-4,1',6'-trideoxygalactosucrose, også
kendt som TGS), som er ca. 600 gange sødere end sucrose.

Veje, der fører til sucralose (jfr. fx Khan et al., Carbo-
hydrate Research 39, 1975, s. 253; Fairclough et al.,
Carbohydrate Research 40, 1975, s. 285-298, US 4362869 og
10 GB 2065648) omfatter dannelsen af derivater af sucrose,
hvor i 6-stillingen er blokeret, således at chlorering hin-
dres i den stilling, hvorimod 4-, 1'- og 6'-stillingerne
er chlorerede. I den vej, der er anført i US 4362869 og i
Carbohydrate Research 40, 1975, s. 285-298, Fairclough et
15 al., trityleres sucrose i de tre primære stillinger (6-,
1'- og 6'-) og peracetyleres derpå. Tritylgrupperne fjernes
derpå, således at der tilvejebringes 2,3,4,3',4'-pentaace-
tatet. Acetatet i 4-stillingen påvirkes derpå, således at
det flytter til 6-stillingen, hvis der er tale om den pa-
20 tenterede fremgangsmåde med behandling med fortyndet eddi-
kesyre i et inert opløsningsmiddel, således at der tilveje-
bringes 2,3,6,3',4'-pentaacetatet, som kan chloreres. Fordi
fremgangsmåden omfatter kombinerede trin med tritylering,
acetylering, detritylering og isomerisation, er der et
25 klart behov for en lettere fremgangsmåde til sikring af, at
6-stillingen ikke chloreres.

En anden fremgangsmåde (jfr. fx US 4380476 og GB 2079749)
omfatter den selektive acetylering af 6-stillingen efter-
fulgt af den selektive chlorering af 4-, 1'- og 6'-stillin-
30 gerne i nærværelse af ubeskyttede hydroxygrupper ved 2-,
3-, 3'- og 4'-stillingerne. Den selektive acetylering er
imidlertid ikke let at udføre.

Der er således stadig et behov for en lettere fremgangsmåde
til fremstilling af sucralose ved hjælp af et begrænset
35 antal trin.

Et alternativ til selektiv 6-acylering kan være at inkorporere en større gruppe i 6-stillingen, fx et sukker. Hvis et sådant trisaccharid betragtes som udgangsmateriale, indfinder der sig umiddelbart to problemer.

- 5 For det første skal trisaccharidet være i stand til at blive chloreret i 4-stillingen (med inversion) og i 1'- og 6'-stillingerne, og eventuelt i stillinger på sukkeret i 6-stillingen. Nærværelse af en massiv sukkergruppe i 6-stillingen betyder imidlertid, at den kritiske 4-stilling sterisk hindres, og det ville være vanskeligt at inkorporere et halogenatom.

Et trisaccharid af den rigtige type, som er relativt almindeligt, er raffinose, der er O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- α -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranosid.

- 15 Chloreringen af raffinose blev undersøgt af Hough et al. (Carbohydrate Research 71, 1979, s. 85-93). Under anvendelse af sulfurylchlorid, som er et potent chloreringsmiddel, der er i stand til at chlorere sucrose i 4-, 6-, 1'- og 6'-stillingerne, fandt de, at der ikke blev opnået noget 4-chlor-substitueret produkt. En blanding af mono-, di- og trisaccharider blev overraskende opnået sammen med nogle chlorerede methylglycosider.

- Undersøgelser i forbindelse med nærværende sammenhæng har vist, at omsætning af raffinose med et Vilsmeier-reagens
25 ligeledes resulterede i en complex blanding af reaktionsprodukter.

- Det andet problem er, at selv hvis der kunne opnås et egnet 4,1',6'-chloreret trisaccharid, ville det være nødvendigt at finde en eller anden kemisk eller enzymatisk måde til at
30 fjerne sukkeret fra 6-stillingen til frigivelse af sucralose. Chlorering af molekylet gør det imidlertid meget forskelligt, hvad angår polaritet, konfiguration og især konformation, fra det uchlorerede sukker, hvorpå et enzym er

tilpasset til at virke. Dette betyder, at enzymer, som virker på raffinose til fjernelse af galactoseringen, ikke nødvendigvis vil virke på et chloreret derivat af raffinose, hvori en chlorsubstituent er til stede i en stilling
 5 nær ved glycosidbindingen (dvs. i 4-stillingen). Analog hermed er forskellen mellem sucrose og sucralose. Et antal mikroorganismer er i stand til at spalte sucrose hurtigt, men sucralose nedbrydes ikke in vivo, skønt den nedbrydes langsomt af visse jordmikroorganismer.

- 10 De krav, der er, for at denne strategi til fremstilling af sucralose er levedygtig, er, at trisaccharidet kun skal være chloreret i 4-, 1'- og 6'-stillingerne i sucroседelen og eventuelt i én eller flere stillinger i den tredje ring, og at det chlorerede produkt kun må spaltes ved (1 → 6)-
 15 galactosylbindingen uden spaltning af den chlorerede galacto-sucrose eller dechlorering af den del.

Det har overraskende vist sig, at det i nærværende sammenhæng er lykkedes at chlorere raffinose til opnåelse af 6-O-(6-chlor-6-deoxygalactose)substitueret sucralose. Endvidere
 20 er der ved undersøgelser i nærværende sammenhæng fundet enzymer, som kan spalte dette tetrachlor-sukker til frigivelse af sucralose.

Ifølge ét aspekt af den foreliggende opfindelse er der tilvejebragt en hidtil ukendt tetrachlorraffinose, nemlig O-
 25 α -D-6-chlor-6-deoxygalactopyranosyl-(1 → 6)- α -D-4-chlor-4-deoxygalactopyranosyl-(1 → 2)- β -D-1,6-dichlor-1,6-dideoxyfructofuranosid eller 4,1',6',6"-tetrachlor-4,1',6',6"-tetradeoxygalactoraffinose. Denne forbindelse vil i det følgende blive betegnet med forkortelsen TCR.

- 30 Forbindelsen TCR fremstilles ved omsætning af raffinose med thionylchlorid i nærværelse af et triarylphosphinoxid, fx triphenylphosphinoxid.

Triphenylphosphinoxidet (TPPO) ledsages fortrinsvis af en del af triphenylphosphin (TPP), fx ved anvendelse af en blanding af fra 5 til 25 mol%, fx 7,5 til 15%, TPP og 95 til 75 mol%, fx 92,5 til 85%, TPPO. TPP selv kan også anvendes, eftersom biproduktet af TPP/thionylchlorid-chloreringsmidlet er TPPO. Dette betyder, at efterhånden som reaktionen skrider frem, vil der dannes en blanding af TPPO og TPP.

Andre triarylphosphinoxider kan træde i stedet for TPPO, især sådanne, hvori én af de tre phenylringe er bundet til en polymerkæde, fx de reagenser, der er beskrevet af Regen og Lee (J. Org. Chem. 40, 1975, s. 1669-1670), hvor phenyl er erstattet af styren.

På lignende måde kan TPPO erstattes af sulfidet (TPPS), som reagerer på lignende måde.

Forholdet mellem triarylphosphin/triarylphosphinoxid eller -sulfid og raffinose er fortrinsvis 3-4 mol pr. mol, fx ca. 3,2 mol pr. mol, og forholdet mellem thionylchlorid og raffinose er fortrinsvis 8 til 15 mol% pr. mol, fx 10 til 11 mol pr. mol.

Reaktionen forløber i nærværelse af et non-hydroxyrisk opløsningsmiddel for raffinosen og chloreringsreagenserne. Egnede opløsningsmidler omfatter aminer og amider, især aromatiske tertiære aminer såsom pyridin og lutidin, eller N,N-dialkylamider såsom DMF.

Reaktionen påbegyndes hensigtsmæssigt ved ca. 0°C, som derefter lades stige til sædvanligvis ca. 110°C.

TCR isoleres hensigtsmæssigt i form af heptaesteren, fx heptaacetatet, og estergrupperne fjernes derpå ved hydrolyse, fx med fortyndet alkoholisk natriumalkoxid.

Ifølge et yderligere aspekt af den foreliggende opfindelse tilvejebringes endvidere en særlig fremgangsmåde til fremstilling af sucralose, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en opløsning af TCR inkuberes i nærværelse af et enzym, som tjener til at fjerne 6-chlor-6-deoxy-galactosyl-delen fra 6-stillingen.

Enzymet kan vælges blandt de mange tilgængelige enzymer, enten direkte eller ved dyrkning af mikroorganismer, som er i stand til at fremstille enzymerne. Galactosidaser har særlig interesse, idet melibiase dog kan anses for at have mindre interesse i lyset af, at skønt melibiose [O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranose] er en bestanddel af raffinose, har chloreret TCR en inverteret konfiguration. Mange af disse enzymer har ikke nogen nyttig virkning på TCR, skønt de er i stand til at frigive sucrose fra raffinose. Der blev undersøgt ca. 20 α -galactosidase-enzymmer fra bakterie-, svampe- og plantekilder, men kun 8 udviste en virkning ved hydrolyse af TCR, og de var alle fra svampe. De mest aktive enzymer var fra stammer af Mortierella vinacea, Circinella museae og fra en stamme af Aspergillus niger (leveret af Novo A/S). Det har overraskende vist sig, at den melibiase, som er derivet fra Mortierella vinacea var. raffinoseutilizer (ATCC 20034), leveret fra Hokkaido Sugar Co., var den mest aktive. Ikke desto mindre er hastigheden for virkning på TCR kun nogle få procent af hastigheden på raffinose selv. Alligevel er selv denne aktivitetshastighed - i betragtning af de signifikante konformations- og konfigurationsforskelle mellem raffinose og TCR - uventet, og den medførte praktisk talt fuldstændig hydrolyse af TCR til sucralose.

Bundfældede celler fra M. vinacea var. raffinoseutilizer er blevet anvendt siden 1968 til fremstilling af roesukker i Japan og tidligere i USA (J. Obara & S. Hashimoto, Sugar Technology Reviews 4, 1976/77, s. 209 og US 3867256 og 3957578 (Narita et al.)).

Enzymbehandlingen udføres hensigtsmæssigt i vandig opløsning, men skønt reaktionen kræver vand, har det vist sig, at α -galactosidase kraftigt kan hydrolysere TCR til sucralose i visse organiske opløsningsmidler. Således har det
5 vist sig, at enzymet er mest stabilt og aktivt i ikke-vandblandbare organiske opløsningsmidler, hvorimod TCR kun er stærkt opløseligt i hydrofile opløsningsmidler. Således blev hydrofile, men ikke-vandblandbare organiske opløsningsmidler såsom ethylacetat, n-butanol og methyloisobutylketon anset for at være de mest egnede opløsningsmidler til
10 TCR-hydrolyse. Hastigheden for TCR-hydrolyse, defineret som det katalytiske turnover-antal (K_{kat}) i ethylacetat, som er formættet med vandig buffer (som tilvejebringer tilstrækkeligt vand til hydrolyse), er fx af lignende art som i vandig buffer. Dette antyder, at enzymet bevarer sin fulde
15 katalytiske aktivitet, selv når det suspenderes i et organisk opløsningsmiddel. Det skal understreges, at hvert organisk opløsningsmiddel, skønt formættet med vandig buffer, forbliver i en enkelt organisk fase. Der er ikke tale om et bifasisk opløsningsmiddelsystem, og enzymet virker i
20 den organiske fase.

Foruden de opløsningsmidler, som er nævnt ovenfor, blev der undersøgt adskillige andre opløsningsmidler med henblik på deres evne til at understøtte TCR-hydrolyse. Stærkt vandblandbare opløsningsmidler (fx dioxan, acetone, methanol og THF) var ikke i stand til at understøtte hydrolyse, selv i
25 nærværelse af 30% v/v vandig buffer. Hydrofobe ikke-vandblandbare opløsningsmidler (fx n-octanol, nitrobenzen og butyronitril) var i stand til at understøtte TCR-hydrolyse, men den ringe opløselighed for TCR i disse opløsningsmidler
30 (mindre end 5% w/v) begrænser den praktiske anvendelse af disse i stor målestok. De hydrofile ikke-vandblandbare opløsningsmidler (fx ethylacetat, n-butanol og methyloisobutylketon) var i stand til at understøtte høj katalytisk
35 aktivitet og høj TCR-opløselighed.

Tabel 1 viser opløseligheden for både TCR og sucralose ved 55°C i forskellige opløsningsmidler (alle formættede med vandig buffer) sammenlignet med vandig buffer.

TABEL 1

5	Opløsningsmiddel	TCR	Sucralose
	Vand	15%	30%
	n-Butanol	>50%	>50%
	Methylisobutylketon	>50%	6%
10	Ethylacetat	>50%	5,7%
	n-Octanol	5%	<1%
	Nitrobenzen	<2%	<1%

Det ses klart, at TCR-opløselighed var maksimal i de hydrofile ikke-vandblandbare opløsningsmidler. På den anden side blev der fundet stor variabilitet i sucraloseopløselighed. Dette kan anvendes til at krystallisere sucralose selektivt i ethylacetat eller methylisobutylketon til batch-reaktioner eller til at muliggøre, at kontinuerlig fixed-bed-fremgangsmåde kan udføres i n-butanol (alle reaktanter og produkter opløselige).

Blandt fordelene ved at udføre hydrolysereaktionen i organiske medier er forøget termisk stabilitet (stabiliteten for α -galactosidase ved 55°C i ethylacetat er næsten 50% højere end i vandig opløsning) og forøget substratopløselighed (opløseligheden for TCR i ovennævnte opløsningsmidler er større end 50% w/v, hvorimod opløseligheden i vandig buffer kun er 15% w/v).

I både vandige og organiske systemer bør behandlingen naturligvis ske ved den optimale temperatur og pH for enzymet, hvilket for M. vinacea melibiase er ca. 55°C og pH 4,5-5,5. I vand-mættede organiske opløsningsmidler henviser dette til pH-værdien i den vandige buffer. Ved denne tempe-

ratur og ved en pH på 5,0 har det vist sig, at den dannede sucralose ikke nedbrydes.

Enzymet kan opløses eller dispergeres i det vandige system som en celle-fri ekstrakt, som fx er produceret ved sonikering af bundfældningerne, eller det kan anvendes i immobiliseret form, fx som bundfældninger, der er pakket i beds eller søjler. I de organiske systemer forbliver enzymet i uopløselig form og kan igen anvendes i beds eller søjler.

Adskillelsen af sucraloseproduktet kan opnås ved ethvert hensigtsmæssigt trin, fx ved inddampning og ekstraktion i et organisk opløsningsmiddel, ved chromatografiske teknikker eller ved selektiv krystallisation af enten de vandige eller de ikke-vandige systemer.

Følgende eksempler belyser opfindelsen yderligere:

15 EKSEMPEL 1

a) 4,1',6',6"-Tetrachlor-4,1',6',6"-tetra~~deoxy~~galactoraffinose-heptaacetat

Til en afkølet opløsning af vandfrit raffinose (4,0 g), triphenylphosphinoxid (5,9 g) og triphenylphosphin (0,66 g, 10 vægtprocent TPPO, total TPPO og TPP 3 molækvivalenter) i pyridin (40 ml) ved ca. 0°C blev sat thionylchlorid (8,6 ml, 15 molækvivalenter) under omrøring. Reaktionsblandingen blev bragt til omgivelsestemperatur i løbet af en periode på 1 time og derpå opvarmet ved 105-110°C i 4,5 timer. Efter tilsætning af methanol (10 ml) blev opløsningen derpå koncentreret til en sirup. En opløsning af siruppen i pyridin (50 ml) blev behandlet med eddikesyreanhydrid (5 ml) ved stuetemperatur i 2 timer. Tyndtlagschromatografi (TLC) (ether-acetone, 4:1) viste et hurtigt-bevægende biprodukt og et langsomt-bevægende hovedprodukt. Opløsningen blev koncentreret og elueret gennem en søjle af silicagel

under anvendelse af ether-acetone (2:1, v/v), hvilket gav 4,1',6',6"-tetrachlor-4,1',6',6"-tetra~~deoxygalactoraffino~~-se-heptaacetat (4,75 g) som en sirup. Prøven viste tilstedeværelse af TPPO og ifølge TLC nogle langsomt-bevægende
5 urenheder.

b) 4,1',6',6"-Tetrachlor-4,1',6',6"-tetra~~deoxygalactoraffi~~-nose

Den ovennævnte sirup (4,75 g) blev deesterificeret under anvendelse af natriummethoxid i methanol (50 ml) ved pH 9,5
10 ved stuetemperatur i 3 timer. Opløsningen blev neutraliseret med Amberlyst® 15 (H)⁺-resin og koncentreret, hvilket gav en halvfast remanens, og den blev ekstraheret med vand. Det uopløselige TPPO blev fjernet ved filtrering, og vand-ekstrakten blev oprenset ved eluering gennem en søjle af
15 silicagel (100 g) under anvendelse af ethylacetat-acetone (2:1, v/v), hvilket gav ren 4,1',6',6"-tetrachlor-4,1',6',6"-tetra~~deoxygalactoraffino~~se (1,49 g, 32,6% baseret på raffinose), $[\alpha]_D = +80^\circ$ (c = 0,7 i acetone).

Konventionel acetylering af produktet med eddikesyreanhydrid og pyridin gav peracetatet ifølge trin a), $[\alpha]_D = +132^\circ$ (c = 0,25 i acetone).

Massespektrum-data for heptaacetat: m/z, 753, [(M+1)⁺ - 2 AcOH, octet (4 Cl)], 571 [4-chlorgalactopyranosyl-(1 → 6)-4-chlorgalactopyranosylkationer, triplet 9:6:1 (2 Cl)], 307
25 [6-chlorgalactopyranosylkation, dublet 3:1, (1 Cl)], 283 [1,6-dichlorfructofuranosylkation, triplet 9:6:1 (2 Cl)].

Massespektrum-data for TCR: m/z 596 [M+NH₄, octet, 4 Cl], 396 og 398 (overlappende toppe) [6-chlorgalactopyranosyl-(1 → 6)-4-chlorgalactopyranosylkation (2 Cl); 1,6-dichlorfructosyl-(2 → 1)-4-chlorgalactopyranosylkation (3 Cl)],
30 198 [6-chlorgalactopyranosyl + NH₄, dublet (3:1) (1 Cl)].

¹H-NMR-data for 4,1',6',6"-tetrachlor-4,1',6',6"-tetra-
deoxygalactoraffinose-heptaacetat

Proton	Kemisk skift (τ)	Koblingskonstant (Hz)
5 H-1	15,68	<u>d</u> , <u>J</u> _{1,2} 3,5
H-2	5,08	<u>q</u> , <u>J</u> _{2,3} 10,0
H-3	5,41	<u>q</u> , <u>J</u> _{3,4} 3,5
H-4	4,76	<u>q</u> , <u>J</u> _{4,5} 1,5
H-5	4,57	-
10 H-1'a, 1'b	4,04	-
H-3'	5,41	<u>d</u> , <u>J</u> _{3',4'} 6,5
H-4'	5,34	<u>t</u> , <u>J</u> _{4',5'} 6,5
H-5'	4,27	<u>m</u>
H-1"	5,43	<u>d</u> , <u>J</u> _{1",2"} 3,5
15 H-2"	5,16	<u>q</u> , <u>J</u> _{2",3"} 11,0
H-3"	4,94	<u>q</u> , <u>J</u> _{2",3"} 3,5
H-4"	5,01	-
Acetat H	1,92, 2,03, 2,04 2,05, 2,06, 2,07	<u>s</u>

¹³C-NMR-data for 4,1',6',6"-tetrachlor-4,1',6',6"-tetra-deoxygalactoraffinose

Carbon	Kemisk skift (τ)		
5	C-2'	103,05	
	C-1"	99,81	
	C-1	92,31	
	C-5'	82,40	
	C-3'	75,89	
10	C-4'	75,40	
	C-5"	71,17	
	C-3"	69,12	
	C-4"	69,04	
	C-2"	68,24	
15	C-2,3,5	67,88,	67,40, 67,32
	C-6	67,04	
	C-4	65,42	
	C-1'	46,35	
	C-6'	44,12	

20 EKSEMPEL 2

Isolering af TCR via 4,1',6',6"-tetrachlor-4,1',6',6''-tetradeoxygalactoraffinose-heptaacetat

I en opløsning af vandfri raffinose (10 g, 19,8 mmol) i pyridin (35 ml, 434 mmol) blev der opløst triphenylphosphin-oxid (16 g, 57,5 mmol) og triphenylphosphin (1,6 g, 6,1 mmol) under opvarmning og omrøring. Thionylchlorid (15 ml, 207 mmol) blev derpå sat til blandingen ved 0°C (is-saltbad) i løbet af en periode på 30 minutter. Reaktionsblandingen blev bragt til stuetemperatur (hvis der omrørtes, kunne der forekomme varmeafgivelse). Reaktionsblandingen blev derpå opvarmet ved 105-110°C. Inden for 5 minutter begyndte varmeafgivelsen, og den indre temperatur steg til 150°C. Temperaturen kom derpå ned til bad-temperaturen inden for 1/2 time. Opvarmningen blev fortsat i 4 1/2 time.

Opløsningen blev derpå bragt til stuetemperatur og behandlet med overskud af eddikesyreanhydrid (ca. 25 ml) ved stuetemperatur under omrøring i 24 timer. Acetyleringsreaktionstiden kan alternativt reduceres med 1 time ved at

5 udføre reaktionen ved 100°C.

Produktet blev isoleret ved at ekstrahere blandingen med varmt toluen. Toluenlaget blev vasket med vandigt natriumcarbonat, derpå med vand, og derefter tørret (Na_2SO_4), og filtratet blev koncentreret. Toluenekstrakten indeholdt

10 26 g faste stoffer, som omfattede en blanding af carbohydrat og triphenylphosphinoxid. Den sorte remanens blev yderligere omrørt med toluen og vandigt natriumcarbonat, hvorefter den sorte faste remanens blev frafiltreret, hvilket gav en yderligere toluenekstrakt, som blev fraskilt,

15 tørret (Na_2SO_4) og koncentreret (4 g fast stof). Diethylether blev sat til de forenede ekstrakter med henblik på at udpræcipitere triphenylphosphinoxidet (15 g). Etherekstrakten blev koncentreret til en sirup (ca. 15 g), taget op i methanol (ca. 100 ml) og behandlet med 1M natriummethoxid

20 (pH 10) i 2 timer. Opløsningen blev neutraliseret med en sur resin og filtreret gennem en trækul-bed. Opløsningen blev koncentreret og tørret i en vakuumovn ved 40°C i 24 timer (10,8 g). Remanensen blev derpå ekstraheret med vand, den tilbageværende TPPO blev frafiltreret, og filtratet

25 koncentreret, hvilket gav TCR (5,3 g). TLC (ethylacetat:acetone:vand, 8:6:1) viste, at ca. 80% af det tilstedeværende carbohydrat var TCR.

EKSEMPEL 3

Direkte isolering af TCR

30 En opløsning af vandfri raffinose (20 g, 39,7 mmol) i pyridin (70 ml, 868 mmol) blev behandlet med triphenylphosphinoxid (32 g, 115 mmol), triphenylphosphin (3,2 g, 12,2 mmol) og thionylchlorid (30 ml, 414 mmol) som beskrevet i det

foregående eksempel. Reaktionsblandingen blev bragt til stuetemperatur og derpå opvarmet ved 105-110°C i ca. 4 1/2 time. Methylisobutylketon (MIBK, 300 ml) blev derpå sat til den varme (ca. 70°C) reaktionsblanding og omrørt, og MIBK-laget blev dekanteret. Den sorte remanens blev yderligere ekstraheret med varmt (ca. 70°C) MIBK (100 ml). De forenede MIBK-ekstrakter blev vasket med koldt vandigt natriumcarbonat, tørret (CaSO₄) og koncentreret til en sirup. Siruppen blev taget op i methanol (50 ml) og behandlet med natriummethoxid (pH 10) ved stuetemperatur i ca. 1 time, hvilket gav TCR. TLC (ethylacetat:acetone:vand, 8:6:1) viste et hovedprodukt, som var sammenfaldende med TCR-standard. Methanolopløsningen blev afioniseret med sur resin, affarvet med aktiveret trækul og filtreret, og filtratet blev koncentreret til en fast remanens. Remanensen blev omrørt med varmt vand og filtreret, og filtratet blev koncentreret, hvilket gav fast TCR (9,8 g med 60,6% renhedsgrad, HPLC, udbytte 26%).

EKSEMPEL 4

20 Fremstilling af sucralose (lille målestok) i vandig opløsning

Tetrachlorgalactoraffinosen ifølge eksempel 1 (20 mg) blev anbragt i en skruelågsflaske sammen med 0,1M citratphosphatbuffer (pH 5,0) (2 ml), hvilket gav en 1% (w/v)-opløsning. Dette vandniveau blev opretholdt under den følgende inkuberingsperiode ved tilsætning af mere vand, når det var påkrævet.

Melibiose i form af bundfældede celler fra Mortierella vinacea var. raffinoseutilizer (ATCC 20034) (leveret af Hokkaido Sugar Co., Japan) blev tilsat (10 mg), og blandingen blev inkuberet ved 55°C i op til 100 timer. Hydrolysegraden blev fulgt periodisk ved TLC-analyse af udtagne alikvoter på 250 µl elueret med ethylacetat:ethanol:vand

(45:5:1) eller ved HPLC på en omvendt-fase-søjle (Waters Dextropak C18) elueret med acetonitril 20% (v/v), og produkterne blev målt under anvendelse af en refraktionsindeks-detektor. Resultatet er optegnet på fig. 1. Det viste sig fx, at ca. 53% var blevet hydrolyseret efter 48 timer og ca. 70% efter 90 timer. Produkterne blev adskilt ved chromatografi, og foruden sucralose blev tilstedeværelse af 6-chlorgalactose og TCR påvist. TCR kan anvendes med op til 15% (w/v) i dette system. I vandig opløsning har enzymet en Michaelis-konstant (K_M) på 5,8 mM og en K_{kat} på 52,5 mg pr. enzym pr. time.

EKSEMPEL 5

Bundfældninger af Mortierella vinacea var. raffinoseutilizer (ATCC 20034) (3 g) blev hydreret i en opløsning af 0,1M citratphosphatbuffer, pH 5,0, som indeholdt raffinose 5% w/v og blev pakket i en søjle, 11 cm x 0,9 cm, bed-volumen 7 cm³ med en vandkappe. Denne søjle blev holdt ved 55°C under anvendelse af en cirkulationsvandpumpe. Ved anvendelse til hydrolyse af TCR til sucralose viste det sig, at søjlens halveringstid til 50% omdannelse var 13 dage.

EKSEMPEL 6

Organismer, som kan hydrolysere TCR til sucralose

Organismer, som angives at have en α -galactosidase-aktivitet, blev leveret fra ATCC. De blev dyrket ved 30°C i 500 ml rystekolber, som indeholdt 100 ml af et mineralsaltmedium (Jayasuria, 1955, Journal of General Microbiology 12, s. 419-428), som indeholdt 1 g/liter gærekstrakt plus 5 g/liter raffinose. Celler blev opsamlet ved centrifugering (5000 omdr./min. i 10 min.) i den sidste eksponentialvækstfase, resuspenderet i 5 gange deres volumen citratphosphatbuffer, pH 5,0, og holdt ved 0°C i et isbad og blev sprængt

ved 3 x 20 sek.- sprængninger i en MSE-sonikator (Dawe Soniprobe Type 1130A) ved maksimal ydelse. Den dannede suspension blev centrifugeret (17.000 omdr./min.) i 30 min., og både cellerester og supernatant blev undersøgt for α -galactosidase-aktivitet i enheder pr. g tør vægt cellerester under anvendelse af p-nitrophenyl- α -D-galactopyranosid (Sigma). Praktisk talt ingen enzymaktivitet blev påvist i supernatanten. De kulturer, som var positive, blev derpå undersøgt for TCR-hydrolyse som angivet i eksempel 4, og resultaterne blev angivet i mg sucralose pr. g tør vægt cellerester pr. time (til 70% omdannelse). Resultaterne var følgende:

	Organisme	ATCC-nr.	Enzym- enheder	TCR- hydrolyse
15	<u>Absidia griseola</u>	20430	35,5	0
	<u>Absidia griseola</u>	20431	18,6	<0,2
	<u>Absidia griseola</u>	22618	43,7	0
	<u>Aspergillus awamori</u>	44733	20,8	0
20	<u>Aspergillus niger</u>	36220	20,1	0,49
	<u>Circinella muscae</u>	16008	75,4	1,12
	<u>Circinella muscae</u>	20394	28,9	<0,2
	<u>Circinella muscae</u>	22337	11,3	0
	<u>Mortierella vinacea</u>	20034	18,2	1,09
25	<u>Mortierella vinacea</u>	34195	8,9	1,33
	<u>Mortierella vinacea</u>	42425	10,6	1,06
	<u>Saccharomyces uvarum</u>	42367	1,6	0
	<u>Talaromyces thermophilus</u>	16461	<1,0	0
	<u>Mortierella vinacea</u>	Hokkaido	21,3	4,3
30	(bundfældninger)			

EKSEMPEL 7

Fremstilling af sucralose i organiske medier

TCR ifølge eksempel 1 (23 mg) blev anbragt i en 5 ml skrue-
lågshætteflaske, og 2 ml af et organisk opløsningsmiddel,
5 som var blevet formættet med vandig buffer (natriumacetat,
50 mM, pH 5,0) blev tilsat, hvilket gav en 20 mM (1,15%
w/v) opløsning. α -Galactosidase i form af bundfældede cel-
ler fra M. vinacea var. raffinoseutilizer (ATCC 20034)
(100 mg) blev sat til hver hætteflaske, og reaktionerne
10 blev påbegyndt ved tilsætning af 1% v/v vandig buffer,
hvirvelblanding i 30 sek. og anbringelse af hætteflasken i
en vandbadsryster ved 55°C og 100 omdr./min. Periodisk blev
der udtaget alikvoter, og 25 μ l blev injiceret i et HPLC-
system, som var forsynet med en omvendt-fase-søjle (Waters
15 Dextropak C18), under anvendelse af 20% vandig acetonitril
som elueringsmiddel med henblik på at måle den dannede su-
cralose og tilbageværende TCR. Det organiske opløsningsmid-
dels virkning på produktionen af sucralose i løbet af en
24 timers inkubation er vist i fig. 2. På figuren er afteg-
20 net forløbet af hydrolysen af TCR til sucralose med tiden
for vandig buffer (kurve 1) og for tre opløsningsmidler,
methyloisobutylketon (2), ethylacetat (3) og n-butanol (4).
Hydrolysereaktionen i methyloisobutylketon og i vandig buf-
fer svarede til hinanden. Lavere hastigheder og omdannelser
25 blev opnået i henholdsvis ethylacetat og n-butanol. I alle
tilfælde blev der på 24 timer iagttaget en omdannelse, som
var større end 50%, og med 70% omdannelse i vandig buffer
og methyloisobutylketon.

I et separat eksperiment udviste enzymet Michaelis-Menten-
30 kinetik i både vandig buffer og ethylacetat. K_m - og K_{kat} -
værdien i ethylacetat var henholdsvis 16,4 mM TCR og 56,3
mg sucralose/g bundfældninger/time. Årsagen til, at tids-
forløbet for TCR-hydrolyse i ethylacetat var lavere end i
vandig buffer ved 20 mM TCR, skyldtes den højere K_m for
35 TCR i ethylacetat og ikke en lavere katalytisk aktivitet.

Når der blev anvendt 50 mM TCR, var hastighederne og omdannelserne for TCR-hydrolyse af lignende art som i vandig buffer.

PATENTKRAV

- 5 1. O- α -D-6-chlor-6-deoxygalactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-4-chlor-4-deoxygalactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-1,6-dichlor-1,6-dideoxyfructofuranosid (TCR).
2. Fremgangsmåde til fremstilling af sucralose,
k e n d e t e g n e t ved, at en opløsning af TCR inkube-
10 res i nærværelse af et enzym, som tjener til at fjerne 6-chlor-6-deoxygalactosyldelen fra 6-stillingen.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er deriveteret fra en
stamme af Mortierella vinacea, Circinella muscae eller
15 Aspergillus niger.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er deriveteret fra
Mortierella vinacea var. raffinoseutilizer.
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene
20 2-4,
k e n d e t e g n e t ved, at TCR er opløst i en vandig
opløsning eller i et ikke-vandblandbart hydrofilt organisk
opløsningsmiddel.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5,
25 k e n d e t e g n e t ved, at opløsningsmidlet er methyl-
isobutylketon, ethylacetat eller n-butanol.

7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 2-6,

k e n d e t e g n e t ved, at den udføres ved en temperatur på ca. 55°C og en pH på 4,5-5,5.

