



Nederland

⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8204924**

⑲ NL

- ⑤④ **Verbeteringen in en met betrekking tot een enzym voor de ontleding van een koolhydraat met groot molecuulgewicht, het geïsoleerde koolhydraat met groot molecuulgewicht, een werkwijze voor het selecteren van een microorganisme, dat een dergelijk enzym voortbrengt en een werkwijze voor de bereiding van een dergelijk enzym.**
- ⑤① Int.Cl.³: C12N 9/50, C12N 9/42// C12P 7/06.
- ⑦① Aanvrager: NOVO Industri A/S te Bagsvaerd, Denemarken.
- ⑦④ Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

- ②① Aanvraag Nr. 8204924.
- ②② Ingediend 21 december 1982.
- ③② Voorrang vanaf 22 december 1981, 6 mei 1982.
- ③③ Land van voorrang: Denemarken (DK).
- ③① Nummers van de voorrangsaanvragen: 5690/81 , 2025/82 .
- ⑥② --

- ④③ Ter inzage gelegd 18 juli 1983.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Verbeteringen in en met betrekking tot een enzym voor de ontleding van een koolhydraat met groot molecuulgewicht, het geïsoleerde koolhydraat met groot molecuulgewicht, een werkwijze voor het selecteren van een microorganisme, dat een dergelijk enzym voortbrengt en een werkwijze voor de bereiding van een dergelijk enzym.

Een werkwijze ter bereiding van een gezuiverd plantaardig proteïneprodukt (pvp) door enzymatische verwijdering van de remanentie zonder oplossing en herprecipitatie van het proteïne is beschreven in het Belgische octrooischrift 882.769. De zuiverheid van het pvp, dat verkrijgbaar is volgens de bekende methode, is niet bevredigend en is daarom open voor verbetering. In de voorbeelden werd een zuiverheid van het pvp van ongeveer 85% aangetoond. Zelfs wanneer het mogelijk is een pvp met een zuiverheid van ongeveer 90% volgens de bekende methode te verkrijgen, is dit alleen verkrijgbaar met bepaalde voorbehandelde uitgangsprодукten, bijvoorbeeld sojaproteïneconcentraat. Het zou wenselijk zijn in staat te zijn een zuiverheid van het pvp van ongeveer of meer dan 90% te verkrijgen met een veel breder spectrum van uitgangsprодукten, in het bijzonder gedopt en ontvet sojameel.

De uitvinding is gebaseerd op de verrassende vondst, dat een bepaald gedeelte van het remanentie ontledingsprodukt, zoals dit optreedt tijdens de hiervoor aangegeven enzymatische behandeling, d.w.z. een in water oplosbaar koolhydraat met groot molecuulgewicht, zich zelf hecht aan een deel van het plantaardige proteïne, zoals later gedetailleerd zal worden toegelicht. Dit resulteert vanzelfsprekend in een lagere zuiverheid van het proteïne. Ook werd gevonden, dat dit koolhydraat met groot molecuulgewicht een vermogen heeft zich zelf te hechten aan proteïnen van dierlijke oorsprong.

Derhalve is een oogmerk van de onderhavige uitvinding het verschaffen van een enzym voor de ontleding van het hiervoor gegeven koolhydraat met groot molecuulgewicht, dat de mogelijkheid zal openen voor de bereiding van een pvp met verbeterde zuiverheid en een werkwijze ter bereiding van een dergelijk enzym.

De basis van de uitvinding kan op de volgende wijze onder verwijzing naar fig. 1, waarin slechts materiaal, dat bestaat als niet-opgeloste vaste stoffen, is aangegeven, terwijl alle bovenstaande lagen zijn weggelaten, beschreven worden. Een hoeveelheid sojameel werd in twee gelijke delen verdeeld, deel I en deel II (kolom a in fig. 1). Deel I werd proteolytisch ontleed bij een pH-waarde van ongeveer 8 door middel van ALCALASE (een proteolytisch enzym bereid door middel van

B. licheniformis en op de markt gebracht door NOVO INDUSTRI A/S, 2880 Bagsvaerd, Denemarken) en werd vervolgens verder bij ongeveer pH 8 gewassen teneinde de totale hoeveelheid proteïne te elimineren en de remanentie werd van de bovenstaande laag afgescheiden en gewassen (zie
 5 deel I, kolommen a en b, fig. 1). Op deze wijze werd een zuivere remanentie (aangeduid als remanentie I) geïsoleerd (kolom b in fig. 1). Deel II van het sojameel werd niet behandeld; korthedshalve wordt de remanentie in deel II aangeduid met remanentie II (kolom b in fig. 1). Nu worden zowel remanentie I en deel II ontleed door middel van een
 10 pectinase uit de handel, bijvoorbeeld PECTINEX (een pectolytisch enzym bereid door Schweizerische Ferment AG, Basel, Zwitserland) (zie kolommen b en c in fig. 1). Verrassenderwijze werd gevonden, dat het niet opgeloste deel van remanentie I veel kleiner is dan het niet opgeloste deel van remanentie II op basis van stikstof en droge stof massabalansen, zie fig. 1, waar de gearceerde gebieden in kolom c overeenkomen
 15 met de niet oplosbare non-proteïne materialen bij de hiervoor aangegeven trap. Wanneer voorts de bovenstaande laag uit de met pectinase behandelde remanentie I tezamen wordt gebracht met een sojaproteïnesuspensie bij pH 4,5 wordt een polysaccharide in de bovenstaande laag aan
 20 het sojaproteïne gebonden. Dit polysaccharide in de bovenstaande laag uit remanentie I, die een deel is van het remanentie ontledingsprodukt en die duidelijk oplosbaar is in water bij afwezigheid van sojaproteïne, evenwel aan sojaproteïne gebonden bij of ongeveer het isoëlektrische punt van sojaproteïne, wanneer sojaproteïne aanwezig is, wordt
 25 aangeduid als SPS (oplosbaar polysaccharide), zie fig. 1. Het SPS heeft een molecuulgewichtverdeling tussen 5×10^6 en $4,9 \times 10^4$. De produktie van geïsoleerd SPS blijkt uit het stromingsdiagram, dat in fig. 2 is gegeven, die eveneens een deel van de in fig. 1 beschreven processen omvat. Derhalve is het probleem een enzym te vinden, dat in staat
 30 is het SPS op een zodanige wijze te ontleden, dat de SPS ontledingsprodukten sojaproteïne niet binden of sojaproteïne in een veel mindere mate binden dan SPS sojaproteïne bindt.

Hoewel de beschrijving specifiek verwijst naar sojaproteïne is de uitvinding niet beperkt tot sojaproteïne, maar omvat alle soorten
 35 plantaardige proteïnen, zie bijvoorbeeld de proteïnen die in het Belgische octrooischrift 882.769 op blz. 1 vermeld zijn.

Volgens de onderhavige uitvinding werd nu gevonden, dat door vergelijkend onderzoek op het vermogen soja SPS te ontleden, het mogelijk is mircoörganismen te selecteren, die in staat zijn een verbinding
 40 voort te brengen, die een enzymatische activiteit vertoont om doelmatig

soja SPS te ontleden, in het volgende korthedshalve aangeduid met SPS-ase.

Derhalve heeft de onderhavige uitvinding in een eerste aspect betrekking op een SPS-ase, een carbohydrase in een geschikte vorm en in staat soja SPS te ontleden onder geschikte omstandigheden tot ontledingsprodukten, die zelf aan proteïne in een waterig milieu in een mindere mate hechten dan het soja SPS vóór de ontleding zelf aan hetzelfde proteïne onder overeenkomstige omstandigheden zou hechten.

Voorts werd gevonden, dat dit SPS-ase, dat in staat is soja SPS af te breken, in staat is polysaccharide soortgelijk aan SPS en afkomstig van planten en vruchten meer volledig af te breken dan pectinasen en cellulasen uit de handel.

De hiervoor aangegeven uitdrukking "in een geschikte vorm" beoogt van de uitvinding bijvoorbeeld een SPS-ase uit te sluiten, dat een samenstelling bevat, die toxische stoffen bevat of dat een zo geringe SPS-ase activiteit vertoont, dat het gebruik van een meer dan 10% SPS-ase bevattende samenstelling, betrokken op het gewicht van SPS in het substraat nodig is bij een reactie gedurende 24 uren en bij 50°C uitgevoerd bij het pH optimum van het betreffende SPS-ase, teneinde een ontleding van SPS van enig praktisch belang te verkrijgen.

Door totale of partiële eliminatie van het SPS uit het uiteindelijke plantaardige proteïne wordt de zuiverheid van het uiteindelijke plantaardige proteïne noodzakelijkerwijze verbeterd in vergelijking met de zuiverheid van het uiteindelijke plantaardige proteïne, dat verkrijgbaar is volgens de bekende werkwijze van het Belgische octrooi-schrift 882.769, aangezien dit bekende plantaardige proteïneprodukt met SPS was verontreinigd.

Het is op dit moment niet bekend of het in het volgende beschreven bijzondere SPS-ase zijn enzymatische activiteit ontleent aan een enkelvoudig enzym of aan een enzymcomplex, dat ten minste twee enzymen bevat. Sommige onderzoeken lijken aan te geven dat ten minste twee enzymen verantwoordelijk zijn voor het SPS-ase afbraakeffect, waarbij een van deze enzymen in staat is slechts een geringe ontleding van SPS uit te voeren, waarna een of meer enzymen in staat zijn een meer uitgebreide afbraak van het SPS uit te voeren. Aanvraagsters wensen zich echter niet te beperken door een dergelijke hypothese of soortgelijke hypothesen.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het SPS-ase in staat is soja SPS in een waterig milieu te ontleden tot ontledingsprodukten, die zelf aan

plantaardige proteïne in het waterige milieu in een mindere mate hechten dan het soja SPS voor de ontleding zich aan hetzelfde plantaardige proteïne in het waterige milieu zou hechten.

5 Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het SPS-ase in staat is soja SPS in een waterig milieu met een pH-waarde die niet meer dan 1,5 van 4,5 afwijkt te ontleden tot ontledingsprodukten, die zelf aan sojaproteïne in het waterige milieu in mindere mate hechten dan het soja SPS voor de ontleding zelf aan het sojaproteïne in het waterige milieu zou hechten.

10 Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat de ontledingsprodukten van soja SPS na voltooide afbraak zelf aan het plantaardige proteïne tot een mate van minder dan 50%, in het bijzonder minder dan 20% hechten, dan het soja SPS voor de ontleding zelf aan het plantaardige proteïne in het
15 waterige milieu zou hechten.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het SPS-ase een positieve SPS-ase-proef laat zien indien onderzocht volgens de kwalitatieve en kwantitatieve SPS-ase bepalingsmethode zoals in de onderhavige beschrijving beschreven.
20

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het SPS-ase werd geproduceerd door middel van een microorganisme behorende tot het genus *Aspergillus*, bij voorkeur behorende tot de *Aspergillus niger* groep.

25 Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het SPS-ase afkomstig is van de enzymen, die produceerbaar zijn door middel van Asp. aculeatus CBS 101.43. Hetzelfde SPS-ase kan geproduceerd worden door middel van Asp. japonicus IFO 4408. Gevonden werd, dat Asp. aculeatus CBS 101.43 tevens zeer
30 krachtige remanasen, cellulasen, pectinasen en hemicellulasen voortbrengt. Voorts werd gevonden, dat niet elke en iedere stam behorende tot de soorten Asp. aculeatus of Asp. japonicus een SPS-ase ontwikkelt dat voor de uitvinding nodig is. Derhalve is zoals later in de beschrijving (sectie 5) blijkt, aangetoond dat de stam Asp. japonicus ATCC
35 10236 niet zodanige hoeveelheden van een SPS-ase voortbrengt, als bepaald kan worden door middel van de enzymatische bepaling van in de beschrijving beschreven SPS-ase.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het SPS-ase volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het SPS-ase immuno-elektroforetisch
40 identiek is aan het SPS-ase, dat voortgebracht kan worden door middel

van Asp. aculeatus CBS 101.43 en identificeerbaar door middel van de immuno-elektroforetische bekledingstechniek, zie secties 6 en 7.

Wanneer een SPS-ase microbiëel voortgebracht is, wordt het gemengd met verschillende vergezellende stoffen gevormd, in het bijzonder andere enzymen. Desgewenste kan het betreffende SPS-ase gezuiverd worden, bijvoorbeeld door middel van chromatografische scheidingsmethoden, zoals later in de beschrijving (sectie 8) zal blijken.

In Agr.Biol.Chem 40 (1), 87-92, 1976 is beschreven, dat een stam van Asp. japonicus ATCC 20236, een enzymcomplex voortbrengt, dat in staat is een partiële afbraak uit te voeren van een zuur polysaccharide in sojasaus, genaamd APS, een fractie waarvan wordt aangeduid met APS-I. Dit zure polysaccharide is niet identiek met SPS, zoals later in de beschrijving meer gedetailleerd in sectie 3 zal blijken. Dus de HPLC gelfiltratiechromatogrammen van SPS en APS zijn duidelijk verschillend en voorts zijn de gelfiltratiechromatogrammen van APS ontleed door middel van het handelspectinase Pectolyase en van SPS behandeld met het handelspectinase Pectolyase duidelijk verschillend. Voorts blijkt uit het artikel niet, dat het zure polysaccharide aan het sojaproteïne is gebonden en dat het ontlede polysaccharide niet aan het sojaproteïne gebonden is of aan het sojaproteïne in een veel mindere mate gebonden is dan het niet ontlede zure polysaccharide. Eveneens is aangetoond, dat deze stam geen SPS-ase vormt in zodanige hoeveelheden, die bepaald kunnen worden door middel van de enzymatische bepaling van SPS-ase als in de beschrijving beschreven. Dit creëerde een vooroordeel tegen elke stam van Asp. japonicus als een producent van een SPS-ase, maar verrassenderwijze werd volgens de uitvinding gevonden dat sommige stammen van Asp. japonicus producenten van een SPS-ase zijn.

De uitvinding omvat in een tweede aspect het geïsoleerde SPS, geproduceerd op base van een plantaardig onzuiver proteïne als uitgangsprodukt.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het geïsoleerde SPS volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat het plantaardige onzuivere proteïne ontvet sojameel is. De produktie van dit geïsoleerde SPS is in het voorgaande in verband met fig. 2 beschreven.

De uitvinding omvat in een derde aspect een werkwijze voor het selecteren van een SPS-ase voortbrengend microorganisme voor het produceren van het SPS-ase volgens de uitvinding, waarbij het te beproeven microorganisme op een fermentatiemilieu wordt gekweekt, waarvan de voornaamste koolstofbron SPS is, waarna een monster van het fermentatiemilieu op SPS-ase wordt geanalyseerd en het betreffende microorganisme

wordt geselecteerd als een SPS-ase producerend microorganisme, wanneer de analyse op SPS-ase positief is.

De uitvinding omvat in een vierde aspect een werkwijze ter bereiding van SPS-ase, waarbij een volgens de voorafgaande selecteringsmethode van een SPS-ase producerend microorganisme te selecteren stam in
5 een voedingsmiddelmilieu gekweekt wordt. De kweek kan worden uitgevoerd als een ondergedompelde fermentatie of als een oppervlaktefermentatie.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat de stam Asp. aculeatus CBS
10 101.43 of Asp. japonicus IFO 4408 in een voedingsmiddelmilieu gekweekt wordt.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat de kweek wordt uitgevoerd als een ondergedompelde kweek bij een pH in het traject van 3 tot 7, bij
15 voorkeur van 4 tot 6, bij een temperatuur in het traject van 20 tot 40°C, bij voorkeur 25 tot 35°C waarbij het voedingsmiddelmilieu koolstof- en stikstofbronnen en anorganische zouten bevat.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het voedingsmiddelmilieu ver-
20 warmd sojameel bevat.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat het sojameel behandeld is met een proteolytisch enzym vòòr het gebruik als een component van het substraat, bij voorkeur het proteolytische enzym dat microbieel wordt
25 voortgebracht door middel van Bacillus licheniformis.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat een pectineoplossing aseptisch aan de fermentatievloei-stof gedurende de kweek wordt toegevoegd.

Gevonden werd, dat Asp. aculeatus CBS 101.43 tevens zeer krachtige
30 remanentie oplosbaar makende enzymen, cellulasen, pectinasen en hemicellulasen voortbrengt naast het SPS-ase en dat het enzymcomplex voortgebracht door middel van Asp. aculeatus CBS 101.43 uitstekend geschikt is als een agens voor gebruik in celwandafbraak van plantaardige materialen. Derhalve kan het enzymcomplex, dat voortgebracht kan worden
35 door Asp. aculeatus CBS 101.43 gebruikt worden in de voedselverwerkingsindustrie voor de behandeling van fruit en plantaardige beslagen en voor klarings- en viscositeitsverlagende doeleinden bij de verwerking van sap en wijn met uitstekende resultaten; ook kan het als ontwateringsmiddel gebruikt worden (d.w.z. een agens voor het ontleden voor
40 polysacchariden en dientengevolge voor het vrijmaken van het water dat

gebonden is binnen de polymere structuur van de polysacchariden) bij de verwerking van groenten.

Derhalve omvat in een vijfde aspect de uitvinding het gebruik van een SPS-ase of een werkwijze voor het ontleden van polysacchariden, bij voorkeur polysacchariden uit de celwand van planten, door middel van een carbohydrase, waarin een SPS-ase preparaat volgens de onderhavige uitvinding in een waterig milieu in contact wordt gebracht met een substraat voor dit SPS-ase preparaat, behalve voor de reeds in de Deense octrooiaanvraag 5691/81 beschreven ontledingen.

Derhalve werd volgens de onderhavige uitvinding gevonden, dat SPS-ase preparaten waardevolle enzympreparaten zijn voor het partiële of totale vloeibaar maken of ontleden van verschillende materialen, bij voorkeur plantaardige materialen, bijvoorbeeld vruchten en plantenafval, die proteïne, cellulose, hemicellulose (bijvoorbeeld glucanen, xy-
lan, galactanen en araban), gommen, pectine, lipiden, inuline, polyfe-
nolen, zetmeel en alginaten bevatten en voor daarbij verwante doelein-
den, zie de tabel zoals later in de beschrijving vermeld. Als voorbeel-
den van dergelijke verwante doeleinden kunnen alle doeleinden vermeld
worden, waarvoor handelspectinasen en cellulasen heden ten dage ge-
bruikt worden. Enkele voorbeelden zullen later in de beschrijving gege-
ven worden.

In verband met het extractie (isolatie)proces beschreven in bij-
voorbeeld voorbeeld II, wordt opgemerkt, dat het SPS-ase preparaat in
hoofdzaak proteïnasevrij is, ten gevolge van het feit dat het gewenste
eindprodukt, d.w.z. het proteïne, anders zou worden afgebroken. Even-
eens dient, wanneer het gewenst is andere biologische materialen dan
proteïnen uit een onzuiver biologisch produkt te extraheren (isoleren),
het gebruikte SPS-ase preparaat in hoofdzaak vrij te zijn van elk en-
zym, dat dit andere biologische materiaal afbreekt. Dergelijke gemodi-
ficeerde SPS-ase preparaten kunnen bereid worden door selectieve inac-
tivering van het ongewenste enzym, door fractioneren of door andere op
zichzelf bekende methoden.

Derhalve wordt een voorkeursuitvoeringsvorm van het gebruik vol-
gens de onderhavige uitvinding gekenmerkt door het feit, dat de ontle-
ding vergezeld gaat van de isolering of extractie van een biologisch
materiaal anders dan sojaproteïne en verwante plantaardige proteïnen
uit een onzuiver biologisch materiaal, waarbij het SPS-ase preparaat in
hoofdzaak vrij is van enig enzym, dat in staat is het biologische mate-
riaal af te breken.

Derhalve werd volgens de onderhavige uitvinding gevonden, dat de

gemodificeerde SPS-ase preparaten (gemodificeerd in de zin dat zij in hoofdzaak vrij zijn van enzymen, die in staat het te extraheren of isoleren biologische materiaal af te breken) waardevolle enzympreparaten zijn voor extractie (isolatie) van gespecificeerde biologische materialen, bijvoorbeeld zetmeel, lipiden, smaakstoffen, kleurstoffen en sappen, uit onzuivere biologische materialen. Verschillende voorbeelden zullen later in de beschrijving gegeven worden.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het gebruik volgens de onderhavige uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat een of meer van de reactieprodukten (waarbij het er niet toe doet of zij gewenste eindprodukten of halfprodukten zijn) verder gelijktijdig worden behandeld met of na de enzymbehandeling. Hierbij wordt een meer flexibel en aanpasbaar gebruik verschaft.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van het gebruik volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit, dat de verdere behandeling een alcoholische fermentatie is in het geval dat een van de reactieprodukten een fermenteerbare suiker is. Hierbij wordt een eenvoudige en goedkope werkwijze verschaft voor de bereiding van alcohol.

Teneinde de aard van de uitvinding duidelijk te maken wordt verwezen naar de volgende secties 1-10, die alle details beschrijven die verband houden met de uitvinding:

1. Produktie van SPS.
2. Kenmerking van SPS, in het bijzonder de molecuulgewichtsverdeling ervan.
3. Documentatie over het feit, dat SPS en APS verschillende verbindingen zijn.
4. Vergelijkend onderzoek voor SPS-ase voortbrengende microorganismen.
5. Kenmerking van enkele SPS-ase vormende microörganismen.
6. Algemene beschrijving van de bekledingstechniek die samenhangt met immuno-elektroforese.
7. Immuno-elektroforetische kenmerking van SPS-ase met polyspecifiek antilichaam en bekleding.
8. Zuivering van een SPS-ase preparaat.
9. pH-activiteit afhankelijkheid, temperatuur afhankelijkheid en stabiliteit van een SPS-ase.
10. Enzymatische activiteitsbepalingen.

SECTIE 1.

BEREIDING VAN SPS.

Zoals hiervoor vermeld kan het uitgangsmateriaal voor de bereiding

8204924

van SPS sojaremanentie zijn. Daarom wordt in de eerste plaats de bereiding van sojaremanentie beschreven.

Sojaremanentie is de proteïnevrije koolhydraatfractie (die in de praktijk ondergeschikte hoeveelheden lignine en mineralen kan bevatten)
 5 in ontvet en gedopt sojameel, welke koolhydraatfractie onoplosbaar is in waterig milieu bij pH 4,5 en kan op de volgende wijze verkregen worden, waarbij tevens verwezen wordt naar fig. 1.

Ontvet sojameel (Sojamel 13 van Aarhus Oliefabrik A/S) wordt in gedeïoniseerd water van 50°C in een gewichtsverhouding sojameel : water
 10 = 1:5 gesuspenderd in een tank met pH-staat en temperatuurregeling. De pH wordt met 4 N NaOH ingesteld (I). Nu wordt een pH-staat hydrolyse uitgevoerd met ALCALASE 0,6 L (een proteolytisch enzym op basis van B. licheniformis met een activiteit van 0,6 Anson eenheden/g, waarbij de activiteit bepaald is volgens de Ansonmethode zoals beschreven in NOVO
 15 ENZYME INFORMATION IB No. 058 e-GB), waarbij de verhouding enzym/substraat gelijk is aan 4% van de hoeveelheid proteïne in het sojameel (II). Na een hydrolyse van 1 uur wordt de slib afgescheiden door centrifugeren (III) en wassen (IV) waarbij deze bewerking tweemaal wordt uitgevoerd (V, VI, VII). De aldus behandelde slib wordt nog eenmaal ge-
 20 durende 1 uur gehydrolyseerd met ALCALASE No. 0,6 L (VIII, IX) soortgelijk zoals hiervoor aangegeven. Daarna wordt de slib door centrifugeren (X) afgescheiden en tweemaal gewassen (XI, XII, XIII, XIV) waarbij de uiteindelijke gewassen slib (VI) aan een sproeidroogbehandeling wordt onderworpen (XV). Het aldus voortgebrachte door sproeidrogen verkregen
 25 poeder is de sojaremanentie, die als grondstof dient voor de produktie van SPS.

SPS is de in water oplosbare polysaccharidefractie, die gevormd wordt door de gebruikelijke behandeling van de hiervoor aangegeven sojaremanentie met pectinase. Het SPS wordt op de volgende wijze voortge-
 30 bracht door middel van de hierna aangegeven 14 reactietrappen, waarbij eveneens naar fig. 2 wordt verwezen.

1. Het droge stofgehalte in de hiervoor aangegeven sojaremanentie wordt bepaald en de sojaremanentie wordt met water verdund tot 2% droge stof en bij 50°C in suspensie gehouden in een tank onder temperatuurre-
 35 geling.

2. De pH-waarde wordt met 6 N NaOH op 4,50 ingesteld.

3. Pectinex Super conc. L wordt toegevoegd in een hoeveelheid van 200 g/kg droge stof (een handelspectinase van Schweizerische Ferment AG, Bazel, Zwitserland met een pectinase-activiteit van 750.000 MOU,
 40 zoals bepaald volgens de brochure "Determination of the Pectinase units

on Apple Juice (MOU)" van 12.6.1981, verkrijgbaar bij Schweizerische Ferment AG, Basel, Zwitserland) en eveneens wordt Celluclast 200 L toegevoegd in een hoeveelheid van 200 g/kg droge stof, een handelscellulase beschreven in de brochure NOVO enzymes, information sheet B 153 e-GB
5 1000 July, 1981, verkrijgbaar bij NOVO INDUSTRI A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Denemarken).

4. De inhoud van de tank wordt gedurende 24 uren onder roeren op 50°C gehouden.

5. De enzymen worden geactiveerd door met 4 N NaOH de pH-waarde op
10 9,0 te verhogen. Het reactiemengsel wordt 30 minuten bewaard en de pH-waarde wordt opnieuw met 6 N HCl op 4,5 ingesteld.

6. Het reactiemengsel wordt gecentrifugeerd en zowel het centrifugeprodukt als de slib wordt verzameld.

7. Het centrifugeprodukt van trap 6 wordt onder controle gefiltreerd op een filterpers (de filter wordt met water gewassen voor de controlefiltratie).

8. Het controlefiltraat wordt aan een ultrafiltratie, diafiltratie en nog eens aan een ultrafiltratie onderworpen op een membraan met een grenswaarde van 30.000 (DDS GR 60-P van De Danske Sukkerfabrikker),
20 waarbij de volgende parameters gebruikt worden:

1. Ultrafiltratie overeenkomend met een volumeconcentratie van 6.

2. Diafiltratie tot het percentage droge stof in het permeaat 0 is ($\sim 0^\circ$ Brix).

25 3. Ultrafiltratie tot ongeveer 15% droge stof in het concentraat.

De temperatuur is 50°C, de pH is 4,5 en de gemiddelde druk is 3 bar.

9. Het geultrafiltreerde concentraat wordt op 5°C gekoeld en een
30 gelijk volume 96%'s ethanol wordt toegevoegd.

10. Het precipitaat wordt verzameld door middel van een centrifuge.

11. Het precipitaat wordt twee maal met 50 vol.% ethanol in water gewassen, overeenkomend met het volume van het centrifugeprodukt van
35 trap 10, d.w.z. twee centrifugeringen worden uitgevoerd.

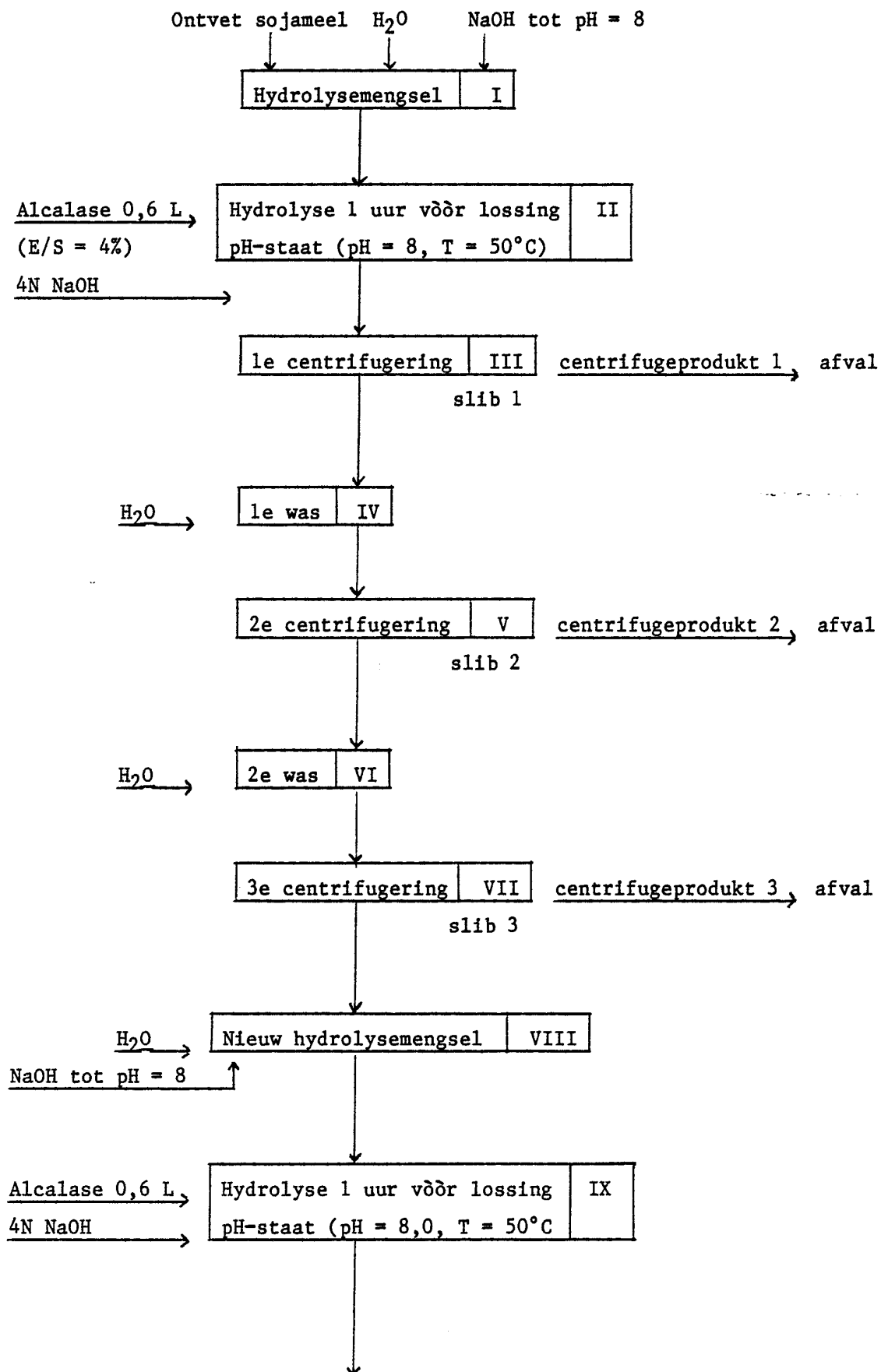
12. Het gewassen precipitaat wordt opnieuw in water opgelost met een volume, dat gelijk is aan het volume van het geultrafiltreerde concentraat van trap 9.

13. De vloeistof van trap 12 wordt onder controle gefiltreerd over
40 een glasfilter.

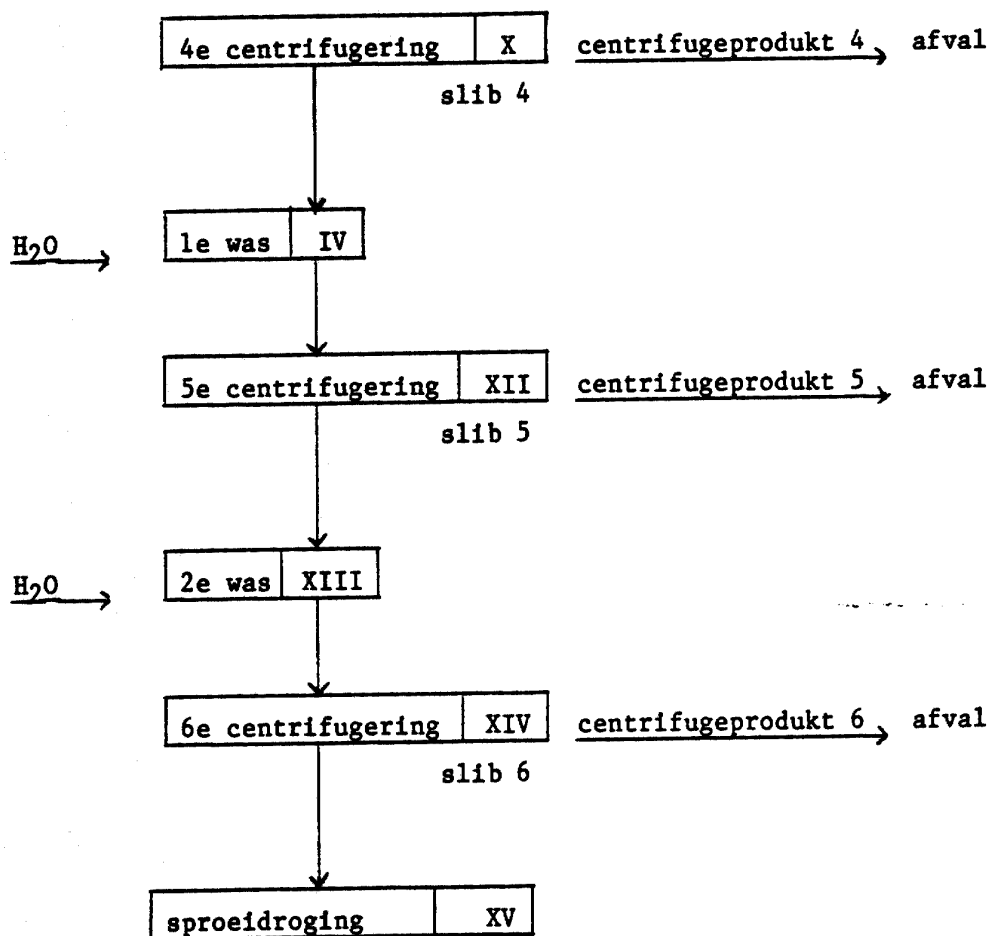
8204924

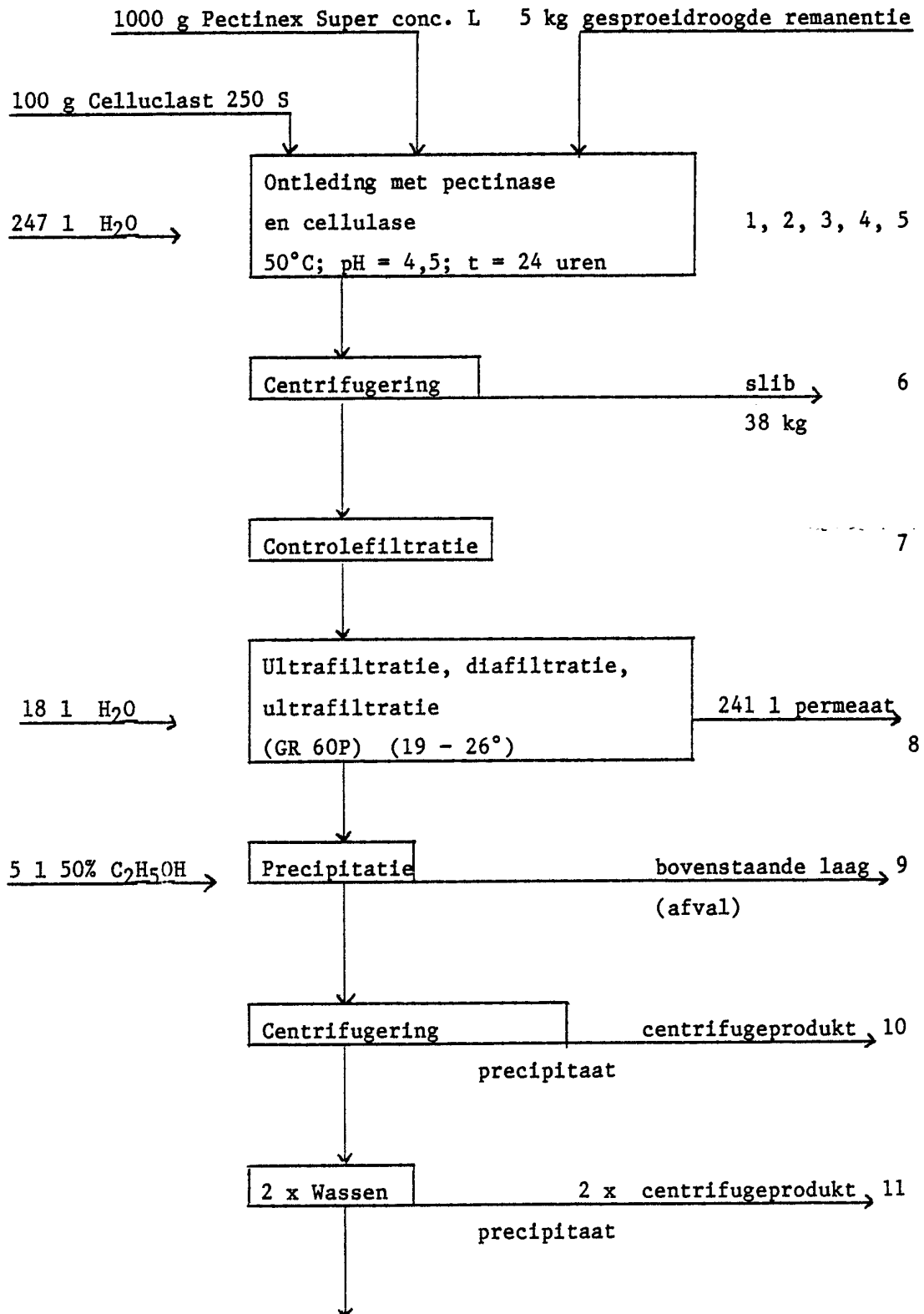
14. Het doorzichtige filtraat, dat zuiver SPS bevat, wordt gelyofiliseerd.

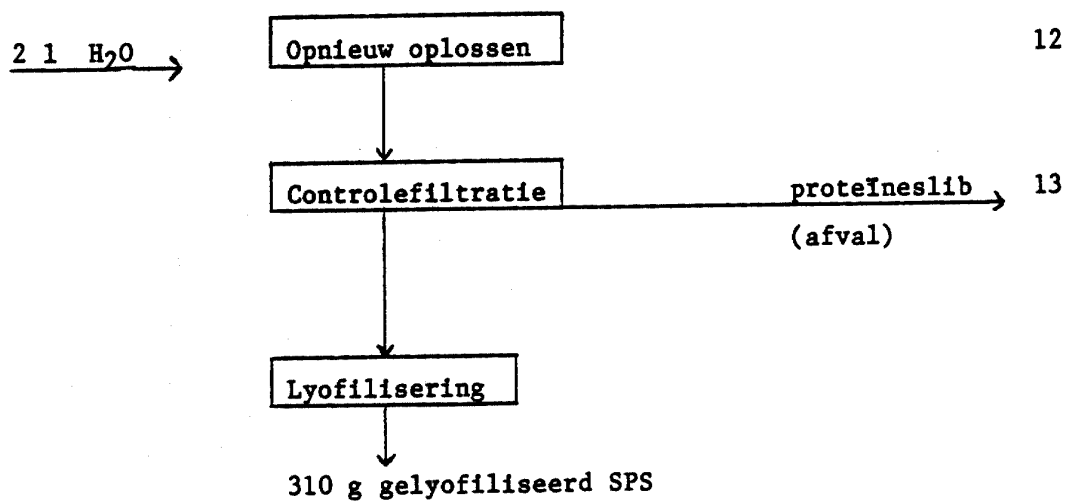
8204924

Stromingsdiagram nr. 1

8204924

Stromingsdiagram nr. 1 (vervolg)

Stromingsdiagram nr. 2

Stromingsdiagram nr. 2 (vervolg)

SECTIE 2.

KENMERKING VAN SPS, IN HET BIJZONDER DE MOLECUULGEWICHTSVERDELING ERVAN.

Door middel van gelchromatografie op HPLC apparatuur (Waters pump
 5 model 6000, Waters data module 730, en Waters refractometer R 401)
 wordt de molecuulgewichtsverdeling van het SPS, waarvan de produktie
 wordt uitgevoerd als in deze beschrijving aangegeven, bepaald (fig. 4).
 Door middel van dezelfde methode wordt eveneens de molecuulgewichtsver-
 deling van de ontledingsprodukten van SPS door middel van SPS-ase be-
 10 paald (fig. 5). Voorts wordt door middel van dezelfde methode het bin-
 dingseffect tussen sojaproteïne en SPS (fig. 6) en de afwezigheid van
 bindingseffect tussen sojaproteïne en SPS ontleed door middel van het
 agens volgens de onderhavige uitvinding (fig. 7) aangetoond.

De ijkcurve (de logaritme van het molecuulgewicht uitgezet tegen
 15 R_f , waarbij de R_f -waarde voor glucose arbitrair gedefinieerd is als
 1 en de R_f -waarde voor een specifiek dextran gedefinieerd wordt als
 de retentietijd voor dit dextran gedeeld door de retentietijd voor glu-
 cose) wordt vastgesteld door middel van enkele standaarddextranen met
 bekende molecuulgewichten (T 4, T 10, T 40, T 70, T 110, T 500) van
 20 Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-75104, Uppsala, Zweden. De R_f -
 waarde voor het maximum van elke dextranpiek wordt gevonden en het over-
 eenkomstige molecuulgewicht wordt berekend als $\sqrt{\bar{M}_w \cdot \bar{M}_n}$,
 waarbij $\bar{M}_w$ de gemiddelde waarde is van het molecuulgewicht
 volgens gewicht en $\bar{M}_n$ de gemiddelde waarde is van het mole-
 25 cuulgewicht volgens aantal. Als elueermiddel voor deze chromatografi-
 sche methode wordt 0,1 M NaNO_3 gebruikt. De gebruikte kolommen bij de
 chromatografische methode zijn 60 cm PW 5000 gevolgd door 60 cm PW 3000
 van Toyo Soda Manufacturing Co., Japan. Op deze wijze wordt het verband
 tussen het molecuulgewicht en de R_f voor de hiervoor aangegeven dex-
 30 tranen vastgesteld, zie fig. 3.

Op basis van fig. 4 kan berekend worden, dat SPS een molecuulge-
 wichtsverdeling heeft, die aanleiding geeft tot een waarde van
 $\bar{M}_w$ van ongeveer $5,4 \times 10^5$ en een waarde van $\bar{M}_n$ van
 ongeveer $4,2 \times 10^4$. Ook blijkt uit deze figuur, dat het chromatogram
 35 twee verschillende pieken vertoont bij een retentietijd van 34,5 min.
 (6%) overeenkomend met een molecuulgewicht van ongeveer 5×10^6 en
 een retentietijd van 47,12 min. (67%) overeenkomend met een molecuulge-
 wicht van ongeveer $4,9 \times 10^4$. Ook blijkt uit deze kromme, dat een
 schouder bestaat tussen deze twee pieken bij een retentietijd van 41,25
 40 min. (27%) overeenkomend met een molecuulgewicht van $2,8 \times 10^5$.

8204924

Na ontleding van SPS met SPS-ase werd het hydrolysemengsel door een membraan gefiltreerd en werd het filtraat gechromatografeerd. Gevonden werd, dat ongeveer 55% SPS wordt ontleed tot mono-, di- en trisacchariden en dat de resterende 45% worden ontleed tot een polymeer met drie pieken met de volgende molecuulgewichten: 5×10^4 , 10^4 en $4,4 \times 10^3$, zie fig. 5.

Teneinde het bindingseffect tussen sojaproteïne en SPS en de aanzienlijke vermindering van het bindingseffect tussen sojaproteïne en SPS ontleed door middel van een SPS-ase aan te tonen werden de volgende experimenten uitgevoerd.

3% SPS in 0,10 M acetaatbuffer bij pH 4,5 wordt toegevoegd aan een suspensie van geïsoleerde soja (Purina E 500) teneinde een suspensie voort te brengen met een verhouding geïsoleerd produkt/SPS van 10:1. Deze suspensie wordt gedurende 18 uren op een schudbad bij 50°C geïncubeerd. Na de incubatie wordt de suspensie gecentrifugeerd en wordt de doorzichtige bovenstaande laag volgens HPLC zoals hiervoor beschreven geanalyseerd. Uit fig. 6 blijkt uit vergelijking met fig. 4, dat het SPS volledig aan het geïsoleerde sojaproduct geadsorbeerd is.

Dezelfde methode zoals aangegeven in de voorafgaande paragraaf wordt uitgevoerd met een 3%'s SPS oplossing gehydrolyseerd met een SPS-ase voortgebracht door middel van CBS 101.43 (fig. 7). Een vergelijking tussen fig. 7 en fig. 5 laat zien, dat geen verbinding in het gehydrolyseerde SPS met een molecuulgewicht beneden ongeveer 10^4 aan het geïsoleerde sojaproduct geadsorbeerd wordt. De hydrolyse vermindert de kwantitatieve binding tot ongeveer 10-15% in relatie tot de binding van SPS aan sojaproteïne.

Een NMR-analyse van het SPS, waarvan de bereiding is uitgevoerd zoals in de onderhavige beschrijving aangegeven, geeft de volgende benaderde samenstelling van het SPS:

- 1) α -galacturonzuur in een hoeveelheid van ongeveer 45%, waarbij ongeveer 40% van de totale hoeveelheid α -galacturonzuur aanwezig is als de methylester,
- 2) rhamnopyranose in een hoeveelheid van ongeveer 20%,
- 3) galactopyranose in een hoeveelheid van ongeveer 15% en
- 4) β -xylopyranose in een hoeveelheid van ongeveer 20%.

De bestanddelen schijnen in een structuur aanwezig te zijn, die bestaat uit een rhamnogalacturon-hoofdketen en zijketens van xylose en galactose.

Volledige hydrolyse met zuur van SPS (8 uren in 1 N zwavelzuur) en daarop volgende dunne-laag-chromatografische analyse gaf aan, dat

8204924

slechts ondergeschikte hoeveelheden van de monosacchariden glucose en arabinose in het gehydrolyseerde SPS aanwezig waren.

Een HPLC analyse van het SPS, ontleed door het SPS-ase enzymcomplex gevormd door CBS 101.43 laat een indrukwekkende vermindering van het molecuulgewicht zien. In overeenstemming daarmee laat het NMR-spectrum van het SPS, ontleed zoals hiervoor aangegeven, zien dat het grootste deel van de estergroepen verdwenen is en dat eveneens het gehalte xylose en galactose in het produkt met het grotere molecuulgewicht afgenomen is. Het NMR-spectrum van het deel van het SPS ontledingsprodukt, dat neerslaat door toevoeging van 1 vol.deel ethanol op 1 vol.deel SPS ontledingsprodukt is soortgelijk aan het NMR-spectrum van het SPS, met de hiervoor aangegeven modificaties, met betrekking tot de estergroepen en het gehalte xylose en galactose.

SECTIE 3

15 DOCUMENTATIE OVER HET FEIT DAT SPS EN APS VERSCHILLENDE VERBINDINGEN ZIJN.

APS werd bereid zoals aangegeven in Agr.Biol.Chem., 36, No. 4, (1972) 544-550.

Nu werden dit polysaccharide en SPS gehydrolyseerd met verschillende enzymen, waarna het ontledingsmengsel aan gelchromatografie werd onderworpen op HPLC apparatuur, zoals aangegeven in sectie 2, "kenmerking van SPS, in het bijzonder de molecuulgewichtsverdeling ervan".

Meer gedetailleerd werden de hydrolyses uitgevoerd door behandeling van 25 ml oplossing van hetzij 2% APS hetzij 2% SPS in 0,1 M acetaatbuffer van pH 4,5 met 10 mg KRF 68 of 30 mg Pectolyase. KRF 68 is een SPS-ase preparaat, waarvan de bereiding in voorbeeld I beschreven is. De resultaten blijken uit de volgende tabel.

Poly- saccharide	Enzym	HPLC gel chromatogram	Polysaccharide	
			ontleed	niet onleed
5 APS	Pectolyase	fig. 8	x	
APS	KRF 68	fig. 9	x	
10 SPS	Pectolyase	fig. 10		x
SPS	KRF 68	fig. 5	x	

15 SECTIE 4

VERGELIJKEND ONDERZOEK VOOR SPS-ASE PRODUCERENDE MICROORGANISMEN.

Het te onderzoeken microorganisme wordt op een schuin opgesteld agarsubstraat geïncubeerd met een samenstelling, die de groei van het microorganisme mogelijk maakt. Na initiële groei op het schuin opge-

20 stelde agarsubstraat wordt het microorganisme overgebracht naar een vloeibaar hoofdsubstraat, waarin de voornaamste koolstofbron SPS is (bereid zoals aangegeven), waarin de stikstofbron NO_3^- , NH_4^+ , ureum, vrije aminozuren, proteïnen of andere stikstof bevattende ver-

25 bindingen is en dat voorts een mengsel van noodzakelijke zouten en vitaminen, bij voorkeur in de vorm van gistextract, bevat. De samenstelling van het hoofdsubstraat hangt af van de microorganismesoort, waarvan het voornaamste punt is, dat het hoofdsubstraat in staat moet zijn groei en metabolisme van het microorganisme te ondersteunen. Wanneer de groei heeft plaats gehad in een geschikte tijdsperiode, in de orde van

30 grootte van 1 tot 7 dagen, afhankelijk van de groeisnelheid van het betreffende microorganisme, wordt een monster van de fermentatievloeistof geanalyseerd op SPS-ase volgens de in de onderhavige beschrijving beschreven enzymatische SPS-ase bepaling of volgens elke andere SPS-ase bepaling die is aangepast aan andere specifieke gebruiken van het SPS-

35 ase dan het gebruik als bestanddeel van een middel voor ontleding van sojaremanentie.

Teneinde een meer gevoelige methode te bereiken voor de bepaling van de enzymatische activiteit kan de temperatuur tot 40°C verlaagd en kan de incubatietijd tot 20 uren verhoogd worden gedurende de bepaling

40 van de SPS-ase activiteit, waarbij antibiotica aan het substraat moeten

8204924

worden toegevoegd om infectie te vermijden.

Door deze proefmethode te volgen kunnen andere SPS-ase voortbrengende microorganismen gevonden worden, die beide behoren tot het genus *Aspergillus* of tot andere genera.

5 SECTIE 5

KENMERKING VAN ENKELE SPS-ASE VORMENDE MICROORGANISMEN

Volgens het hier aangegeven vergelijkende onderzoek voor SPS-ase voortbrengende microorganismen werd gevonden, dat de in het bovenste deel van de volgende tabel opgesomde microorganismen SPS-ase producenten zijn. Ook bevat de tabel een stam, behorende tot de soort Asp. japonicus, die geen SPS-ase producent is.

15	SPS-ase producent		Soort		Onze identificatie- aanduiding	Officiële identificatie- aanduiding	eerste deponeringsjaar
	ja	neen	<u>Asp.</u> <u>japo-</u> <u>nicus</u>	<u>Asp.</u> <u>acule-</u> <u>atus</u>			
20	x			x	A 805	CBS 101.43; DSM 2344	1943
	x		x		A 1443	IFO 4408; DSM 2346	1950
25		x	x		A 1384	ATCC 20236; DSM 2345	1969

Een korte identificatie van de hiervoor aangegeven stammen kan in de volgende kweekcatalogi worden aangetroffen:

30 List of Cultures 1978 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

Institute for Fermentation Osaka, List of Cultures, 1972, 5th edition, 17-85 Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan.

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

Alle stammen in de hiervoor aangegeven tabel komen nauw overeen met de taxonomische beschrijving van de soorten Asp. japonicus en Asp. aculeatus, die voorkomen in The genus *Aspergillus* van Raper and Fennell, 1965 (zie bijvoorbeeld blz. 327-330).

40 SECTIE 6

8204924

ALGEMENE BESCHRIJVING VAN DE BEKLEDINGSTECHNIEK, DIE SAMENHANGT MET DE IMMUNO-ELEKTROFORESE.

Een methode aangeduid als de top-agar bekledingstechniek is door aanvraagsters ontwikkeld voor identificatie van afzonderlijke componenten van een enzymcomplex door gekruiste immuno-elektroforese met een polyspecifiek antilichaam tegen alle enzymcomponenten in het enzymcomplex. De methode is gebaseerd op het feit dat enzymen nog actief zijn na de specifieke enzym-antilichaambinding of anders gezegd dat de actieve enzymplaats niet identiek is met de plaats van de enzym-antilichaambinding. De enzym-antilichaamcomplexen slaan neer als aparte bogen in de gel gedurende de elektroforese. De gelplaat wordt bedekt met oplosbaar SPS in een top-agar. Na verwarming op 45°C gedurende 20 uren in een atmosfeer met een relatieve vochtigheid van 100% zal de boog, die SPS-ase activiteit bezit, verschijnen als een verhelderingszone in de SPS bedekking na precipitatie met een mengsel van gelijke volumedelen ethanol en aceton bij het erop kijken tegen een zwarte achtergrond. Bogen, die geen SPS-ase activiteit hebben blijven onzichtbaar.

SECTIE 7

IMMUNO-ELEKTROFORETISCHE KENMERKING VAN SPS-ASE MET POLYSPECIFIEK ANTILICHAAM EN BEKLEDING.

Konijnen werden geïmmuniseerd met het SPS-ase, dat enzymcomplex bevat verkregen door fermentatie van Aspergillus aculeatus CBS 101.43, zoals aangegeven in voorbeeld I (KRF 68) en het polyspecifieke antilichaam werd op op zichzelf bekende wijze teruggewonnen. Door middel van dit polyspecifieke antilichaam werd een gekruiste immuno-elektroforese van het enzymcomplex verkregen door fermentatie van Asp. aculeatus CBS 101.43, zoals aangegeven in voorbeeld I, KRF 68, uitgevoerd, zoals beschreven in N.H. Axelsen c.s., "A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis", 6' printing 1977. Verwezen wordt naar fig. 11, die de bogen laat zien, die overeenkomen met verschillende proteïnen voortgebracht door het microorganisme. Door middel van de hiervoor beschreven top-agar bekledingstechniek werd gevonden, dat het gearceerde gebied overeenkomt met SPS-ase.

Wanneer de hiervoor aangegeven hypothese, die de aanname inhoudt, dat SPS-ase uit ten minste twee enzymen bestaat, juist is, is het gearceerde gebied het gebied, waarin alle enzymen verantwoordelijk voor de SPS-ase activiteit aanwezig zijn. Wanneer deze enzymen bij andere uitvoeringsvormen van de uitvinding op een zodanige wijze door de immuno-elektroforese zouden worden gescheiden, dat zij niet elk wederzijds gebied bedekken, kan een gedeelte van de SPS-ase activiteit geïdentifi-

ceerd worden door middel van immuno-elektrolyse met een bekleding met zowel SPS als een handelspectinase.

SECTIE 8

ZUIVERING VAN EEN SPS-ASE PREPARAAT

5 De zuivering van het SPS-ase preparaat KRF 92 (zie voorbeeld I) werd door ionenuitwisseling uitgevoerd. De buffer is 50 mmol Tris (tris-hydroxymethylaminoethaan) die met HCl op pH 7 is ingesteld. De kolom is K 5/30 van Pharmacia, Zweden. Het ionenuitwisselingsmateriaal is DEAE-trisacryl van LKB, Bromma, Zweden (300 ml). De stroomsnelheid
10 is 100 ml/uur.

15 15 g van het SPS-ase preparaat KRF 92 werden in 450 ml water bij 6°C opgelost en alle volgende aangegeven bewerkingen werden uitgevoerd tussen 6°C en 10°C. De pH werd met 1 M Tris op 7,0 ingesteld. De kolom werd met de buffer in evenwicht gebracht en vervolgens werd het SPS-ase
15 monster op de kolom gebracht. OD_{280} en de geleidbaarheid werden bij het eluaat gemeten, waarbij verwezen wordt naar fig. 12. Fractie 1 is het eluaat, dat niet aan het ionenuitwisselingsmateriaal is gebonden. Vervolgens wordt de kolom met 2000 ml buffer gewassen, waarbij fractie 2 verkregen wordt. Nu wordt een 0-500 mmol NaCl gradiënt tot
20 stand gebracht, waarbij de fracties 3-9 verkregen worden. Alle negen fracties werden tot 200 ml geconcentreerd en tegen water gedialyseerd tot een geleidbaarheid van 2 M mSi door middel van dialyse (Hollow Fiber DP 2 from Amicon, Massachusetts, U.S.A.). Vervolgens werden de negen fracties aan een vriesdroogbehandeling onderworpen. Alleen de
25 fracties 1 en 2 vertoonden een SPS-ase activiteit.

Fractie 1 werd verder gezuiverd door gelfiltratie. 1,5 g van fractie 1 werden opgelost in 10 ml 50 mmol natriumacetaat met een pH van 4,5 (500 mmol KCl). De kolom is 2,5 x 100 cm van LKB. Het gelfiltratie vulmateriaal is Sephacryl S-200 van Pharmacia, Zweden. De stromings-
30 snelheid is 300 ml/uur. De fracties, die materialen bevatten met molecuulgewichten tussen 70.000 en 100.000, geijkt met bolvormige proteïnen, bevatten een als enzymcomplex aangeduide factor G, die SPS niet kan ontleden bij onderzoek volgens de kwalitatieve agarproef; echter wordt SPS ontleed volgens de kwalitatieve agarproef wanneer factor G
35 met een pectinase wordt gemengd. Gevonden werd, dat factor G in staat is galactose, fucose en enig galacturonzuur van SPS af te splitsen, maar het hoofdontledingsprodukt volgens de HPLC analyse is nog een product met groot molecuulgewicht zeer veel gelijkend op SPS.

SECTIE 9

40 pH-ACTIVITEIT AFHANKELIJKHEID, TEMPERATUURACTIVITEIT AFHANKELIJKHEID EN

8204924

STABILITEIT VAN EEN SPS-ASE.

Fig. 13 laat de pH-activiteit afhankelijkheid zien van het SPS-ase preparaat KRF 68. Vanaf pH 2,7 tot pH 3,5 werd een mierzuurbuffersysteem gebruikt en vanaf pH 3,7 tot 5,5 werd een acetaatbuffersysteem gebruikt.

Fig. 14 laat de temperatuur activiteit afhankelijkheid zien van het SPS-ase preparaat KRF 68.

Fig. 15 laat de temperatuurstabiliteit zien van het SPS-ase preparaat KRF 68.

10 SECTIE 10

ENZYMATISCHE ACTIVITEITSBEPALINGEN.

De hierna aangegeven tabel is een overzicht van de verschillende enzymatische activiteitsbepalingen die betrekking hebben op de uitvin-

15

		Definitie van activiteiteenheid en beschrijving van de enzymatische activiteitsbepaling		
20	Enzym	soort activiteit, korte aanduiding	publiekelijk beschikbaar	later in de beschrijving beschreven
	SPS-ase	SPS-ase		x
25	Remanentie oplosbaar-making	SRU SRUM-120	x	1
	Protease	HUT		x
	Cellulase	C	x	2
30	Pectinase	Pu	x	3
		PGE	x	4
		UPTE	x	5
		PEE	x	6
35	Hemi-cellulase	VHCU	x	7

De in de laatste kolom van de voorafgaande tabel aangegeven referenties worden gedetailleerd in de volgende tabel.

5	Referentie nr.	Identificatie van de referentie	Referentie kan verkregen worden bij		
			NOVO INDUS-TRI A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Denemarken	Schweizerische Ferment AG, Basel, Zwitserland	een bibliotheek
10	1	Analyseforskrift AF 154/4 of 1981-12-01	x		
15	2	Analytical Biochemistry 84, 522-532 (1978)			x
		Analytical method AF 149/6-GB of 1981-05-25	x		
20	3	Determination of Pectinase Activity with Citrus Pectin (PU) of 23.3.1976		x	
25	4	Viskosimetrische Poly- galacturonase-Bestimmung (PGE) of 10.11.77		x	
30	5	Bestimmung der Pectin- transeliminase (UPTE/g) of 24.Sept.1975		x	
	6	Determination of the Pectinesterase activi- ty (undated) with initials WJA/GW		x	
35	7	Analytical method AF 156/1-GB	x		

40 In verband met de cellulase activiteitsbepaling kan worden opge-

8204924

merkt, dat de analyse werd uitgevoerd zoals aangegeven in AF 149/6-GB en dat de principes van de bepaling zijn toegelicht in Analytical Biochemistry.

SECTIE 10a

5 ENZYMATISCHE BEPALING VAN SPS-ASE.

De enzymatische bepaling van SPS-ase wordt in twee trappen uitgevoerd, d.w.z. een kwalitatieve agarplaatproef en een kwantitatieve SPS-ase activiteitsbepaling op basis van de meting van de hoeveelheid totaal vrijgemaakte suikers. Wanneer de kwalitatieve agarplaatproef negatief is, is de SPS-ase activiteit nul, zonder te letten op de waarde die komt uit de kwantitatieve SPS-ase activiteitsbepaling. Wanneer de kwalitatieve agarplaatproef positief is, is de SPS-ase activiteit gelijk aan de waarde die komt uit de kwantitatieve SPS-ase activiteitsbepaling.

15 I. Kwalitatieve agarplaatproef.

Een SPS-agarplaat werd op de volgende wijze vervaardigd. Een buffer (B) wordt bereid door 0,3 M azijnzuur door middel van 1 N NaOH op een pH-waarde van 4,5 in te stellen. 1 g SPS wordt opgelost in 20 ml B. 1 g agarose (HSB Litex) wordt met 80 ml B gemengd en onder roeren op het kookpunt verwarmd. Wanneer de agarose is opgelost wordt de SPS-oplossing langzaam toegevoegd. De verkregen 1% SPS agaroseoplossing wordt in een waterbad van 60°C geplaatst. De platen worden nu gegoten door 15 ml van de 1% SPS-agaroseoplossing op een horizontale glasplaat met de afmetingen 10 cm x 10 cm te gieten. Vervolgens worden 9 plaatsen met een afstand van 2,5 cm uitgeponst in de gestolde laag van SPS-agarose. In elke plaats wordt 10 µl van een 1% oplossing van het op SPS-ase activiteit te onderzoeken enzymewit gebracht. De plaat wordt 18 uren bij 50°C en een relatieve vochtigheid van 100% geïncubeerd. Nu nog niet ontleed SPS wordt geprecipiteerd met een oplossing van gelijke volumedelen ethanol en aceton. De SPS-ase agarplaatproef is positief voor een monster, dat in een specifieke plaats is geplaatst, wanneer een doorzichtige ringvormige zone rond deze plaats verschijnt.

II. Kwantitatieve SPS-ase activiteitsbepalingsproef.

Het doel van deze proef is de bepaling van enzymatische activiteiten, die in staat zijn SPS tot een zodanige mate te ontleden, dat de ontledingsprodukten een sterk verminderde of geen adsorptie of bindingsaffiniteit voor sojaproteïne vertonen. Experimenten hebben aangetoond, dat dat gedeelte van de SPS ontledingsprodukten, die niet worden neergeslagen door een mengsel van gelijke volumina water en ethanol, geen enkele adsorptie-bindingsactiviteit voor sojaproteïne hebben.

8204924

De SPS-ase bepaling is gebaseerd op een hydrolyse van SPS onder standaardomstandigheden gevolgd door een precipitatie van dat gedeelte van SPS, dat niet met ethanol gehydrolyseerd wordt. Na precipitatie wordt het gehalte koolhydraat, dat niet is neergeslagen, bepaald door
 5 kwantitatieve analyse op totaal suiker (volgens AF 169/1, verkrijgbaar bij NOVO INDUSTRI A/S, 2880 Bagsvaerd).

De standaardomstandigheden zijn:

temperatuur : 50°C

pH : 4,5

10 reactietijd : controle 210 minuten met alleen substraat, gevolgd door 2 minuten met toegevoegd enzym
 reactietijd : hoofdwaaarde 212 minuten.

De apparatuur omvat:

een schuddend waterbad met een thermostaat op 50°C geregeld
 15 een Whirlimixer menginrichting
 centrifuge
 ijswaterbad

De reagentia omvatten:

buffer : 0,6 M azijnzuur in gedemineraliseerd water (a)
 20 1,0 M NaOH (b)
 substraat : de pH-waarde van 50 ml van a wordt op 4,5 met b ingesteld, vervolgens worden 4,0 g SPS toegevoegd en na oplossing van het SPS wordt de pH opnieuw op 4,5 ingesteld en wordt het volume met gedeioniseerd water
 25 op 100 ml gebracht.
 stopreagens: absolute ethanol.

Een SPS-ase activiteitseenheid SAE of SPSU wordt gedefinieerd als de SPS-ase activiteit, die onder de boven aangegeven standaardomstandigheden een hoeveelheid in 50%'s ethanol oplosbaar koolhydraat equivalent
 30 aan 1 μ mol galactose per minuut vrijmaakt.

Zelfs wanneer in het begingedeelte de standaardenzymkromme een rechte lijn is, dient te worden opgemerkt, dat het niet het punt (0.0) kruist.

SECTIE 10 b

35 ENZYMATISCHE BEPALING VAN REMANENTIE OPLOSBAAR MAKENDE ACTIVITEIT UITGEDRUKT ALS SRUM 120.

Principe

Bij de methode voor de bepaling van hydrolyseactiviteit wordt het onoplosbare deel van ontvet, gedeproteïniseerd en van doppen bevrijd
 40 sojameel onder standaardomstandigheden gehydrolyseerd. De enzymreactie

8204924

wordt gestopt met stopreagens en het onoplosbare gedeelte wordt afgefiltreerd. De hoeveelheid opgeloste polysacchariden wordt spectrofotometrisch bepaald na zure hydrolyse volgens AF 169/1, verkrijgbaar bij NOVO INDUSTRI A/S, 2880 Bagsvaerd.

- 5 Carbohydrasen met endo- zowel als exo-activiteit worden volgens de methode bepaald.

Het substraat dat betrekking heeft op deze enzymatische bepaling is identiek aan het remanentiesubstraat beschreven voor de SRU methode. Het substraat wordt opgelost als een 10% oplossing in de hierna aan-

- 10 gegeven citraatbuffer:

0,1 N citraat-fosfaat buffer pH 4,5

5,24 g citroenzuur 1-hydraat (Merck type 244)

8,12 g dinatriumwaterstoffosfaat 2-hydraat (Merck type 6580)

tot 1 l gedemineraliseerd H₂O

- 15 pH 4,5 $\pm$ 0,05

stabiel gedurende 14 dagen

Het stopreagens heeft de volgende samenstelling:

100 ml 0,5 N NaOH

200 ml 96% ethanol

- 20 In een koelkast te bewaren tot het gebruik ervan.

Standaardomstandigheden

temperatuur 50°C

pH 4,5

reactietijd, monster 120 min.

- 25 reactietijd, blanco 5 min.

Definitie van de eenheid

Een sojaremanentie oplosbaar makende eenheid (SRUM) 120 (M voor hand) is de hoeveelheid enzym die onder de gegeven reactieomstandigheden per minuut oplosbaar gemaakte polysacchariden equivalent aan 1 micromol galactose vrij maakt.

- 30 SECTIE 10 c

ENZYMATISCHE BEPALING VAN PROTEOLYTISCHE ACTIVITEIT.

HUT METING

Methode voor de bepaling van proteïnase in een zuur milieu.

- 35 De methode is gebaseerd op de ontsluiting van gedenatureerd hemoglobine door het enzym bij 40°C, pH 3,2 gedurende 30 minuten. Het ontsloten hemoglobine wordt met 14 gew./vol.% trichloorazijnzuur neergeslagen.

- 40 Alle enzymmonsters worden bereid door oplossing in 0,1 M acetaatbuffer bij een pH van 3,2.

8204924

Het hemoglobinesubstraat wordt bereid onder toepassing van 5,0 g gelyofiliseerd, runderhemoglobinepoeder, geconserveerd met 1% thiomersalaat en 100 ml gedemineraliseerd water, dat 10 min. wordt geroerd, waarna de pH met 0,33 N HCl op 1,7 wordt ingesteld.

- 5 Na nog eens 10 min. roeren wordt de pH met 1 N NaOH op 3,2 ingesteld. Het volume van deze oplossing wordt met 0,2 M acetaatbuffer tot 200 ml verhoogd. Dit hemoglobinesubstraat moet gedurende 5 dagen in een koelkast gehouden worden.

- 10 Het hemoglobinesubstraat wordt op kamertemperatuur gebracht. Op het tijdstip nul worden 5 ml substraat aan een proefbuis toegevoegd, die 1 ml enzym bevat. Na 1 seconde schudden wordt de buis gedurende 30 min. in een waterbad van 40°C geplaatst. Na precies 30 min. worden 5 ml 14%'s trichloorazijnzuur aan de reactiebuis toegevoegd, die vervolgens wordt geschud en gedurende 40 min. op kamertemperatuur wordt gebracht.

- 15 Voor de blancoproef wordt het hemoglobinesubstraat op kamertemperatuur gebracht. Op het tijdstip nul worden 5 ml van het substraat aan een proefbuis toegevoegd, die 1 ml enzym bevat. Na 1 seconde schudden wordt de buis gedurende 5 min. in een waterbad van 40°C geplaatst. Na precies 5 min. worden 5 ml 14%'s trichloorazijnzuur aan de reactiebuis
20 toegevoegd, die vervolgens wordt geschud en gedurende 40 min. op kamertemperatuur wordt gebracht.

- Na 40 min. worden de blancoproeven en de monsters geschud, èèn- of tweemaal gefiltreerd door Berzelius filter nr. 0 en in een spectrofotometer geplaatst. Het monster wordt afgelezen tegen de blancoproef bij
25 275 nm terwijl de spectrofotometer tegen water wordt ingesteld.

Aangezien het absorberend vermogen van tyrosine bij 275 nm een bekende factor is, is het niet noodzakelijk een standaardkromme voor tyrosine te maken, tenzij het noodzakelijk is de Beckman spectrofotometer te controleren.

30 Berekeningen

- 1 HUT is de hoeveelheid enzym, die in 1 min. een hydrolysaat vormt in absorberend vermogen bij 275 nm equivalent aan een oplossing van 1,10 microgram/ml tyrosine in 0,006 N HCl. Deze waarde van absorberend vermogen is 0,0084. De reactie dient bij 40°C, een pH van 3,2 en
35 in 30 min. plaats te hebben.

$$\text{HUT} = \frac{\text{monster-blanco}}{0,0084} \times \frac{\text{vol. in ml}}{\text{reactietijd in min.}}$$

5

$$\text{HUT} = \frac{\text{monster-blanco}}{0,0084} \times \frac{11}{30} = (S-B) \times 43,65$$

10

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

15 Een onderzoek over de pH-stabiliteit afhankelijkheid van het protease in KRF 68 uitgevoerd door middel van de HUT analyse met pH-waarden van 2,0 tot 8,0 liet zien, dat de stabiliteit van het protease boven pH 8,0 zeer klein was, zie fig. 16.

20 Teneinde de uitvinding toe te lichten wordt verwezen naar de volgende voorbeelden I tot VIII, waarbij voorbeeld I de produktie van SPS-ase toelicht en waarin de voorbeelden II tot VIII de toepassing van SPS-ase toelichten met een grondstof op sojabasis teneinde een gezuiverd plantaardig proteïne voort te brengen. Andere toepassingen van SPS-ase worden in de sectie tussen voorbeeld VIII en het overzicht van de figuren gegeven.

25 Verschillende fermentaties met de hier aangegeven stammen Asp. aculeatus en Asp. japonicus werden op laboratoriumschaal uitgevoerd. Hierbij werden preparaten verkregen, die SPS-ase bevatten volgens de hier aangegeven SPS-ase proef. Aangezien vrij grote hoeveelheden SPS-ase vereist zijn om de toepassingsproeven uit te voeren werden soortgelijke fermentaties op proeffabrieksschaal uitgevoerd, zie het volgende
30 voorbeeld I.

Voorbeeld I

Bereiding van SPS-ase op proeffabrieksschaal.

35 Een SPS-ase werd bereid door onderdompelingsfermentatie van Aspergillus aculeatus CBS 101.43.

Een agarsubstraat met de volgende samenstelling werd in een kolf volgens Fernbach bereid:

	Pepton Difco	6 g
	Aminolin Ortana	4 g
	Glucose	1 g
5	Gistextract Difco	3 g
	Vleesextract Difco	1,5 g
	KH ₂ PO ₄ Merck	20 g
	Moutextract Evers	20 g
	Met ionenuitwisselaar behandeld H ₂ O	1000 ml

10

De pH werd tussen 5,30 en 5,35 ingesteld. Vervolgens werden 40 g Agar Difco toegevoegd en werd het mengsel 20 min. bij 120°C in een autoclaaf behandeld (het substraat wordt E-agar genoemd).

De stam CBS 101.43 werd gekweekt op een schuin opgesteld E-agar (37°C). De sporen van de schuin geplaatste agar werden in gesteriliseerde taptemelk gesuspendeerd en de suspensie werd in flesjes gelyofiliseerd. De inhoud van een gelyofiliseerd flesje werd overgebracht naar de Fernbach kolf. De kolf werd vervolgens gedurende 13 dagen bij 30°C geïncubeerd.

20 Een substraat met de volgende samenstelling werd bereid in een kiemfermentatieinrichting:

	CaCO ₃	1,2 kg
	Glucose	7,2 kg
25	Rofec (droge stop van maisweekvloei-stof)	3,6 kg
	sojaboonolie	1,2 kg

Leidingwater werd tot een totaal volume van ongeveer 240 l toegevoegd. De pH werd op ongeveer 5,5 ingesteld voordat CaCO₃ werd toegevoegd. Het substraat werd in de kiemfermentatieinrichting gedurende 1 uur bij 121°C gesteriliseerd. Het totale volume voor de inoculatie was ongeveer 300 l.

De sporensuspensie uit de Fernbach kolf werden naar de kiemfermentatieinrichting overgebracht. De kiemfermentatieomstandigheden waren:

Type gebruikelijke beluchte en geroerde
 fermentatieinrichting : fermentatieinrichting met een hoogte/diameter
 verhouding van ongeveer 2,3

- 5 Roeren : 300 omw./min. (twee turbinebladen)
 Beluchting : 300 normaal liter lucht per minuut
 Temperatuur : 30-31°C
 Druk : 50 kPa
 Tijd : ongeveer 28 uren

10

Ongeveer 28 uren na de inoculatie werden 150 l uit de kiemfermen-
 tatieinrichting naar de hoofdfermentatieinrichting overgebracht.

Een substraat met de volgende samenstelling werd in een hoofdfer-
 mentatieinrichting van 2500 l bereid:

15

Verwarmd sojameel	90 kg
KH_2PO_4	20 kg
Pluronic®	150 ml

20

Leidingwater werd tot een totaal volume van ongeveer 900 l toege-
 voegd. Het verwarmde sojameel werd in water gesuspenderd. De pH werd
 met NaOH op 8,0 ingesteld en de temperatuur werd op 50°C verhoogd.

Daarna werden ongeveer 925 Ansoeenheden ALCALASE® 0,6 L aan de sus-
 pensie toegevoegd. Het mengsel werd 4 uren op 50°C en pH 8,0 gehouden

25

(toevoeging van Na_2CO_3) zonder beluchting, zonder druk en 100 omw.-
 /min. roeren. Daarna werden de resterende substraatcomponenten toege-
 voegd en werd de pH met fosforzuur op ongeveer 6,0 ingesteld. Het sub-
 straat werd gesteriliseerd in de hoofdfermentatieinrichting gedurende
 90 min. bij 123°C. Het eindvolume voor de inoculatie was ongeveer 1080

30 1.

Vervolgens werden 150 l kiemcultuur toegevoegd.

De fermentatieomstandigheden waren:

Type gebruikelijke beluchte en geroerde
fermentatieinrichting : fermentatieinrichting met een hoogte/diameter
verhouding van ongeveer 2,7

- 5 Roeren : 250 omw./min. (twee turbinebladen)
Beluchting : 1200 normaal liter lucht per minuut
Temperatuur : 30°C
Druk : 50 kPa
Tijd : ongeveer 151 uren

10

Vanaf 24 fermentatieuren tot ongeveer 116 fermentatieuren werd een
pectineoplossing aseptisch aan de hoofdfermentatieinrichting toegevoegd
bij een constante snelheid van ongeveer 8 l per uur. De pectineoplos-
sing met de volgende samenstelling werd bereid in een doseringstank van

15 500 l:

Pectin genu *	22 kg
Geconc. fosforzuur	6 kg
Pluronic®	50 ml

20

* Genu pectin (citrus type NF van The Copenhagen pectin factory Ltd.)

- Leidingwater werd tot totaal volume van ongeveer 325 l toegevoegd.
Het substraat werd in de doseringstank gedurende 1 uur bij 121°C geste-
25 riliseerd. Het eindvolume voor het begin van de dosering was ongeveer
360 l. Wanneer deze portie werd afgevoerd werd een andere soortgelijke
portie bereid. Het totale volume van de pectineoplossing voor een fer-
mentatie was ongeveer 725 l.

- Na ongeveer 151 fermentatieuren werd het fermentatieproces ge-
30 stopt. De ongeveer 1850 l kweekvloei stof werden op ongeveer 5°C gekoeld
en de enzymen werden volgens de volgende methode gewonnen.

- De cultuurvloei stof werd gefiltreerd over een vacuümtrommelfilter
(Dorr Oliver), dat vooraf bekleed was met Hy-flo-super-cel diatomeeën-
aarde (filtratiehulpmiddel). Het filtraat werd tot ongeveer 15% van het
35 volume van de kweekvloei stof door verdamping geconcentreerd. Het con-
centraat werd gefiltreerd over een Seitz filtervel (type supra 100) met
0,25% Hy-flo-super-cel als filtratiehulpmiddel (in de volgende tabel
aangehaald als filtratie I). Het filtraat werd neergeslagen met 561 g
(NH₄)₂SO₄/l bij een pH van 5,5 en 4% Hy-flo-super-cel diatomeeën-
40 aarde wordt als filtratiehulpmiddel toegevoegd. Het neerslag en het

8204924

filtratiehulpmiddel worden door filtratie over een framefilter gescheiden. De filterkoek wordt in water opgelost en onoplosbare gedeelten worden door filtratie over een framefilter afgescheiden. Het filtraat wordt ter controle gefiltreerd over een Seitz filtervel (type supra
5 100) met 0,25% Hy-flo-super-cel als filtratiehulpmiddel (in de volgende tabel aangehaald als filtratie II). Het filtraat wordt aan een diafiltratie onderworpen over een ultrafiltratieinrichting. Na de diafiltratie wordt de vloeistof geconcentreerd tot een gehalte droge stof van 12,7% (in de volgende tabel aangehaald als droge stofgehalte in concen-
10 traat).

Een facultatieve behandeling met base voor partiële verwijdering van de proteaseactiviteit kan bij deze trap worden uitgevoerd. In het geval dat de behandeling met base wordt uitgevoerd, wordt deze uitgevoerd bij een pH van 9,2 gedurende 1 uur, waarna de pH-waarde op 5,0
15 wordt ingesteld.

Nu wordt de vloeistof ter controle gefiltreerd en gefiltreerd met het doel van kiemvermindering en het filtraat wordt op een vriesdroog-apparatuur van de firma Stokes aan een vriesbehandeling onderworpen.

Vier fermentaties werden op de hierna beschreven wijze uitgevoerd,
20 waarbij de stam gebruikt voor de fermentatie, het gebruik van de facultatieve behandeling met base en andere parameters werden gevarieerd, zoals aangegeven in de volgende tabel.

Microörganisme	behandeling met base		be- rel- dings- code	Concentratie (%) filtratiehulpmiddel in verband met			droge stof- gehalte in concen- traat	opmer- kingen
	toegepast	niet toegepast		filtratie I	de precipitatie	filtratie 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	

* Na de kiemverminderende filtratie wordt het filtraat geconcentreerd door verdamping in een verhouding van 1 : 2,3. Een ondergeschikt gedeelte van het geconcentreerde filtraat werd door sproeien gedroogd en het resterende deel werd door vriezen gedroogd.

Teneinde de proteaseactiviteit verder te verminderen werd een gedeelte van de hiervoor aangegeven preparaten behandeld zoals hierna aangegeven, waarbij slechts een van de drie alternatieven A, B en C werd gebruikt.

5 A. 100 g SPS-ase preparaat worden in 1 l gedeïoniseerd water onder roeren bij $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ opgelost. De pH wordt met 4 N NaOH op 9,1 ingesteld. Deze behandeling met base wordt gedurende 1 uur uitgevoerd. Vervolgens wordt de pH-waarde met ijsazijn op 4,5 ingesteld en er wordt tegen ijskoud gedeïoniseerd water gedialyseerd tot een geleidbaarheid
10 van 3 mSi. Vervolgens worden de vriesbehandeling en lyofilisering uitgevoerd.

B. 500 g SPS-ase preparaat worden in 4 l gedeïoniseerd water onder roeren bij $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ opgelost. De pH wordt met 4 N NaOH op 9,1 ingesteld. Deze behandeling met base wordt gedurende 1 uur uitgevoerd. De
15 pH-waarde wordt met ijsazijn op 5,1 ingesteld. Het verkregen materiaal wordt gelyofiliseerd.

C. 50 g SPS-ase preparaat worden in 400 ml gedeïoniseerd water onder roeren bij $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ opgelost. De pH wordt met 4N NaOH op 9,1 ingesteld. Deze behandeling met base wordt gedurende 1 uur uitgevoerd.
20 Vervolgens wordt de pH met ijsazijn op 5,7 verminderd. Het verkregen materiaal wordt gelyofiliseerd.

25	SPS-ase preparaat gebruikt als uitgangsmateriaal voor de behandeling met base	toegepaste behandeling met			preparaat-code
		A	B	C	
30	KRF 68	x			KRF 68 BII
	KRF 68		x		KRF 68 BIII
	KRF 92			x	KRF 92 BI
35					

De hiervoor aangegeven preparaten worden door hun activiteiten van de enzymen met betrekking tot de uitvinding in de volgende tabel gekenmerkt.

8204924

Enzymactiviteit per g		KRF 68	KRF 68 BII	KRF 68 BIII	KRF 74	KRF 83	KRF 92	KRF 92 BI
SAE	plantenproef	+	+	+	-	+	+	+
	kwantitatieve proef	350	301	349	0	168	476	430
SRU		737	507	481	142	683	626	757
SRUM ₁₂₀		2125	1560	1720	578	753	1640	1030
HUT pH 3,2		67000	105	339	1630	12800	5960	397
Cx		8000	8044	9396	1320	8040	5700	3092
PU		10300000	9000000	8800000	840000	7500000	8400000	7600000
PGE		119400	72000	77700	4100	64600	60000	68800
UPTE		78100	83700	76900	15130	327000	44000	62400
PEE		840	910	770	370	690	1000	790
VHCU		1600000	1100000	1000000	65000	2200000	1100000	742000

8204924

Voorbeeld II (toepassingsvoorbeeld)

Dit voorbeeld beschrijft de produktie van een p.v.p. uit een van
doppen bevrijd en ontvet sojameel, "Sojamel 13" (in de handel verkrijg-
baar bij Aarhus Oliefabrik A/S). Het gehalte droge stof van dit meel
5 was 94,0% en het gehalte van (N x 6,25) op basis van droge stof was
58,7%. Het sojameel werd behandeld met de SPS-ase preparaten KRF 68 B
II (voorbeeld I) op de volgende wijze:

85,2 g van het sojameel werden gesuspendeerd en bij 50°C in 664,8
g water geroerd en de pH werd door middel van 7,5 ml 6 N HCl op 4,5 in-
10 gesteld. 50 g van een oplossing, die 4,00 g van het SPS-ase preparaat
bevatte, werden toegevoegd en het reactiemengsel werd vervolgens gedu-
rende 240 min. bij 50°C geroerd. Daarna werd het mengsel gecentrifu-
geerd in een laboratoriumcentrifuge (Beckman Model J-6B) gedurende 15
min. bij 3000 x g. De bovenstaande laag werd gewogen en geanalyseerd op
15 Kjeldahl stikstof en droge stof. Vervolgens werd de vaste base gewassen
met een volume water equivalent aan de massa van de bovenstaande laag
verkregen bij de eerste centrifugering. Deze behandeling werd tweemaal
uitgevoerd. Vervolgens werd de vaste base aan een vriesdroogbehandeling
onderworpen, gewogen en geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof bij
20 Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, 8000 Aarhus C, Denemarken.
Dit laboratorium is door de staat gemachtigd voor analyses op voeder en
melkprodukten. De bij dit experiment verkregen resultaten blijken uit
tabel 2.1.

Tabel 2.1 Verkregen resultaten

Component	Massa g	N x 6,25 %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
sojameel SPS-ase preparaat	85,2 4,00	55,2 75,6	94,0 -	100 6,4	100 -
1. Centrifugeringsproduct p.v.p.	666 44,5	1,50 87,5	5,04 95,7	21,2 82,7	42,0 53,2

8204924

Derhalve werd een p.v.p. verkregen met een proteïnezuiverheid, d.w.z. N x 6,25 op basis droge stof, van 91,4% en met een totaal rendement aan proteïne van 83%.

Voorbeeld III (toepassingsvoorbeeld)

5 Dit voorbeeld werd uitgevoerd om de proteïnerendementen, de voedingskwaliteit en enkele functionele eigenschappen van sojaproteïneprodukten bereid volgens de volgende drie methoden te vergelijken:

A: De traditionele isoelektrische precipitatie voor de bereiding van geïsoleerd sojaproteïne.

10 B: De traditionele isoelektrische wasbehandeling voor de bereiding van geconcentreerd sojaproteïne.

C: De isoelektrische wasbehandeling volgens de uitvinding met inbegrip van een remanentie oplosbaarmakend enzym voor de bereiding van p.v.p.

15 Teneinde een ware vergelijking van de werkwijze volgens de uitvinding (C) met de gebruikelijke sojaproteïneprocessen (A en B) te ontwikkelen is dezelfde grondstof in alle gevallen gebruikt. Ook zijn de experimenten op een zodanige wijze uitgevoerd, dat overeenkomstige temperaturen en behandelingstijden in alle drie gevallen dezelfde zijn.

20 Slechts de pH-waarden waren verschillend ten gevolge van de fundamentele verschillen tussen de drie experimenten.

A. De traditionele isoelektrische precipitatie voor de bereiding van geïsoleerd sojaproteïne.

425,8 sojameel (Sojamel 13 bereid door Aarhus Oliefabrik A/S) werden in 3574,2 g leidingwater bij 50°C geëxtraheerd. De pH werd met 20,1 g 4 N NaOH op 8,0 ingesteld. Na 1 uur roeren werd de suspensie bij 3000 x g gedurende 15 min. gecentrifugeerd onder toepassing van 4 bekers van 1 l in een laboratoriumcentrifuge (Beckman Model J-6B). Het centrifugeprodukt I en het precipitaat I werden gewogen. Het precipitaat I werd
30 opnieuw met water geëxtraheerd tot een totaalgewicht van 4000 g. De temperatuur werd op 50°C gehouden, de pH werd met 4 N NaOH op 8 ingesteld en de suspensie werd gedurende 1 uur geroerd. Een centrifugering en een weging van centrifugeprodukt II en precipitaat II werden zoals hiervoor uitgevoerd. Monsters werden onttrokken aan de centrifugeprodukten I en II en het precipitaat II voor Kjeldahl en droge stof bepalingen. Hierna werden de centrifugeprodukten I en II gemengd en op 50°C
35 gehouden. Het proteïne werd vervolg isoelektrisch geprecipiteerd bij pH 4,5 door middel van 45 g 6 N HCl. Na 1 uur roeren bij 50°C werd het proteïne door centrifugeren bij 3000 x g gedurende 15 min. gewonnen.
40 Het centrifugeprodukt III werd gewogen en geanalyseerd op Kjeldahl N

- en droge stof. De vaste fase III werd gewogen en met water gewassen in een hoeveelheid die overeenkomt met het gewicht van centrifugeprodukt I. De wasbehandeling werd uitgevoerd door 1 uur bij 50°C te roeren. Het gewassen proteïne werd door centrifugeren bij 3000 x g gedurende 15
- 5 min. gewonnen. Het centrifugeprodukt IV en de vaste fase IV werden gewogen. Het centrifugeprodukt IV werd geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof. De vaste fase werd in 1550 g water bij 50°C gesuspendeerd en de pH werd met 17 g 4 N NaOH op 6,5 ingesteld. Het mengsel werd gedurende 1 uur geroerd en indien noodzakelijk opnieuw op pH 6,5 ingesteld.
- 10 Tenslotte werd het produkt aan een vriesdroogbehandeling onderworpen, gewogen en geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof. De massabalansberekeningen worden in tabel 3.1 vermeld.

Tabel 3.1 Massabalansberekeningen van de traditionele isoelektrische precipitatie voor de bereiding van geïsoleerd sojaproteïne

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Extractie: sojameel	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
water	3574,2	0	0	0	0
4 N NaOH	20,1	0	16,0	0	0,8
1. Centrifugering: Σ	4020,1	5,9	10,0	100,9	100,4
centrifugeproduct I	3141,0	4,4	6,9	58,8	54,1
precipitaat I	805,0	-	-	-	-
Herextractie:					
precipitaat I	805,0	-	-	-	-
water	3195,0	0	0	0	0
2. Centrifugering:					
centrifugeproduct II	3104,0	0,5	0,9	6,6	7,0
precipitaat II	820,0	9,1	17,2	31,7	35,2
Mengen en aanzuren:					
centrifugeproducten I + II	6245,0	-	-	-	-
6 N HCl	45,0	0	21,3	0	2,4

Tabel 3.1 (vervolg)

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
3. Centrifugering: Σ centrifugeprodukt III precipitaat III	6290,0 5650,0 308,0	0,3 - -	1,9 - -	7,2 - -	26,8 - -
Wassen: precipitaat III water	308,0 3141,0	- 0	- 0	- 0	- 0
4. Centrifugering: Σ centrifugeprodukt IV precipitaat IV	3449,0 3113,0 291,0	0,04 - -	0,15 - -	0,5 - -	1,2 - -
Neutralisatie: precipitaat IV water 4 N NaOH	291,0 1550,0 17,0	- 0 0	- 0 16,0	- 0 0	- 0 0,7
Droging: poeder	128,0	93,8	96,3	51,1	30,8

8204924

B. De isoelektrische wasbehandeling voor de bereiding
van sojaproteïneconcentraat.

425,6 g sojameel (Sojamel 13 bereid door Aarhus Oliefabrik A/S) werden in 3574 g water bij 50°C gewassen. De pH werd met 44,8 g 6 N HCl op 4,5 ingesteld. De wasbehandeling werd gedurende 4 uren door roeren uitgevoerd. De suspensie werd vervolgens gedurende 15 min. bij 3000 x g gecentrifugeerd onder toepassing van 4 bekers van 1 l in een laboratoriumcentrifuge (Beckman Model J-6B). Het centrifugeprodukt I werd gewogen en geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof. De vaste fase I werd gewogen en opnieuw gewassen met water tot een totaalgewicht van 4000 g. De pH werd met 1,7 g 6 N HCl opnieuw op 4,5 ingesteld en de suspensie werd gedurende 30 min. bij 50°C geroerd. Een centrifugering en weging van centrifugeprodukt II en vaste stoffen II werd zoals hiervoor uitgevoerd. De vaste fase II werd opnieuw gesuspenseerd in 1575 g water bij 50°C en de pH werd met 34,5 g 4 N NaOH op 6,5 ingesteld. Het mengsel werd gedurende 1 uur bij 50°C geroerd en indien noodzakelijk opnieuw op pH 6,5 ingesteld. Tenslotte werd het proteïneprodukt aan een vriesdroogbehandeling onderworpen, gewogen en geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof. De massabalans is in tabel 3.2 vermeld.

Tabel 3.2 Massabalansberekening van de isoelektrische wasbehandeling voor de bereiding van geconcentreerd sojaproteïne.

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Wassen: sojameel water 6 N HCL	425,8 3574,2 44,8	55,2 0 0	94,0 0 21,3	100,0 0 0	100,0 0 2,4
1. Centrifugering: Σ centrifugeprodukt I vaste stoffen I	4044,6 3150,0 846,0	- 0,6 -	- 3,2 -	- 8,0 -	- 25,2 -
Opnieuw wassen: vaste stoffen I water 6 N HCL	846,0 3154,0 1,7	- 0 0	- 0 21,3	- 0 0	- 0 0,1
2. Centrifugering: Σ centrifugeprodukt II vaste stoffen II	4001,7 3130,0 863,0	0,1 - -	0,4 - -	1,3 - -	3,2 - -

Tabel 3.2 (vervolg)

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Neutralisatie: vaste stoffen II	863,0	-	-	-	-
water	1575,0	0	0	0	0
4 N NaOH	34,5	0	16,0	0	1,4
Droging: poeder	281,0	72,5	98,4	86,7	69,1

8204924

C. De isoelektrische wasbehandeling met inbegrip van een remanentie
oplosbaar makend enzym voor de bereiding van p.v.p.

425,8 g sojameel (Sojamel 13 bereid door Aarhus Oliefabrik A/S)
werd in 3524,2 g water bij 50°C gewassen. De pH werd onder toepassing
5 van 43,7 g 6 N HCl op 4,5 ingesteld. 24 g van het SPS-ase preparaat KRF
68 B III (voorbeeld I) werden in 26 g water opgelost en aan het was-
mengsel toegevoegd. De wasbehandeling werd vervolgens gedurende 4 uren
onder roeren uitgevoerd. Vervolgens werd de zuivering uitgevoerd zoals
beschreven voor B, waarbij de hoeveelheden van 6 N HCl, 4 N NaOH en wa-
10 ter voor het opnieuw suspenderen de enige parameters waren met afwijk-
kende waarden. De massabalans is in tabel 3.3 gegeven.

Tabel 3.3 Massabalansberekening van de isoelektrische wasbehandeling met inbegrip van een remanentie oplosbaar makend enzym voor de bereiding van p.v.p.

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Wassen: sojameel	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
water	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. Centrifugering: Σ	4043,7	-	-	-	-
centrifugeprodukt I	3420,0	1,7	5,2	24,7	44,4
vaste stoffen I	620,0	-	-	-	-
Opnieuw wassen:					
vaste stoffen I	620,0	-	-	-	-
water	3380,0	0	0	0	0
6 N HCL	1,3	0	21,3	0	0,1
2. Centrifugering: Σ	4001,3				
centrifugeprodukt II	3400,0	0,2	0,6	2,9	5,1
vaste stoffen II	577,0	-	-	-	-

8204924

Tabel 3.3 (vervolg)

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Neutralisatie:					
vaste stoffen II	577,0	-	-	-	-
water	1700,0	0	0	0	0
4 N NaOH	25,3	0	16,0	0	1,0
Droging: poeder	211,0	87,3 ¹⁾ 86,9 ²⁾	96,7 ¹⁾ 97,0 ²⁾	78,2	51,1

- 1) Geanalyseerd bij Biotechnisch Instituut, Holbergsvej 10, DK-6000 Kolding, Denmark
 2) Geanalyseerd bij Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000, Aarhus C, Denmark

8204924

Voedingseigenschappen

De aminozuursamenstellingen van de drie proteïneprodukten werden bepaald, zie tabel 3.4. Het totale gehalte van essentiële aminozuren, de chemische stand en de essentiële aminozuurindex (EAAI) wordt berekend onder toepassing van het FAO referentiepatroon uit 1957.

Het gehalte trypsineregger van de drie produkten werd bepaald door middel van de methode beschreven in A.O.C.S. Tentative Method Ba 12-75 (A.O.C.S. is een afkorting voor American Oil Chemists' Society). De resultaten zijn in tabel 3.5 opgenomen, welke tabel tevens de rendementen en de verhouding proteïne/droge stof van de drie produkten bevat.

Tabel 3.4 Aminozuursamenstelling en voedingswaardering van de drie proteïneproducten A, B en C.

Aminozuur	A. geïsoleerd soja- proteïneproduct		B. soja-proteïne- concentraat		C. geïsoleerd soja- proteïneproduct (p.v.p.)	
	g/16 g N	aas*	g/16 g N	aas*	g/16 g N	aas*
<u>Niet-essentieel:</u>						
asparaginezuur	12,4	-	11,3	-	11,9	-
serine	4,62	-	4,69	-	4,81	-
glutaminezuur	21,3	-	18,2	-	17,7	-
proline	6,07	-	5,19	-	4,76	-
glycine	4,13	-	4,26	-	4,33	-
alanine	3,54	-	4,27	-	4,55	-
histidine	2,83	-	2,78	-	2,50	-
arginine	8,09	-	7,57	-	7,04	-

8204924

Tabel 3.4 (vervolg)

Aminozuur	A. geïsoleerd soja- proteïneprodukt		B. soja-proteïne- concentraat		C. geïsoleerd soja- proteïneprodukt (p.v.p.)	
	g/16 g N	aas*	g/16 g N	aas*	g/16 g N	aas*
<u>Essentieel:</u>						
isoleucine	4,87	> 100	4,97	> 100	5,19	> 100
leucine	7,80	> 100	7,98	> 100	8,09	> 100
lysine	6,24	> 100	6,09	> 100	5,57	> 100
fenylalanine	5,47	> 100	5,35	> 100	5,17	> 100
tyrosine	3,38	> 100	3,88	> 100	4,44	> 100
cystine	1,29	64,5	1,32	66,0	1,44	72,0
methionine	1,08	49,1	1,21	55,0	1,31	59,5
threonine	3,10	> 100	3,60	> 100	3,97	> 100
tryptofan	1,06	75,7	1,37	97,9	1,32	94,3
valine	4,90	> 100	5,23	> 100	5,57	> 100
% totaal gehalte						
essentieële aminozuren	38,36		41,31		42,21	
chemische stand		56,4%		60,2%		65,5%
EAAI		86,7%		90,2%		91,3%

* aas = aminozuurstand op basis van het FAO referentiepatroon (1957)

8204924

Tabel 3.5 Proceskenmerken en gehalte trypsineremmer
van de drie proteïneproducten A, B en C.

		A. geïsoleerd soja- proteïneproduct	B. sojaproteïne- concentraat	C. geïsoleerd soja- proteïneproduct (p.v.p.)
Proces- ken- mer- ken	proteïne droge stof	97,4%	73,7%	90,0%
	proteïne rendement	51,1%	86,7%	78,2%
trypsineremmers TUI/g produkt		34.000	21.000	19.000
TUI/g proteïne		36.250	28.970	21.810

Funtionele eigenschappen

De stikstof oplosbaarheidsindex (NSI) werd bepaald in een 1%'s proteïnedispersie bij pH 7,0 in 0,2 M NaCl resp. in gedestilleerd water. Na 45 min. roeren met een magnetische roerder werd de suspensie gedurende 30 min. bij 4000 x g gecentrifugeerd en de bovenstaande laag werd op stikstof geanalyseerd. De stikstofoplosbaarheid werd berekend als (oplosbaar N%/totaal N%). De resultaten van deze waardering bij de drie produkten zijn in tabel 3.6 vermeld.

Het emulgerend vermogen werd driemaal bepaald bij elk produkt volgens een enigszins gemodificeerde Swift titratie. 4,0 g (N x 6,25) van het produkt werden in 250 ml 0,5 M NaCl gemengd met een Sorval Omni-mixer bij lage snelheid. 50 ml van de suspensie werden overgebracht naar een glazen mengbeker en 40 ml sojaboonolie werden toegevoegd. Hierna werd het totale mengsel gewogen. Het olie-watermengsel werd volgens bij 10.000 omw./min. met de beker in een ijsbad gehomogeniseerd. Een aanvullende hoeveelheid sojaboonolie werd toegevoegd met een snelheid van 0,3 ml per sec. tot de emulsie inzakte. De totale hoeveelheid toegevoegde olie voor het "eindpunt" werd gevonden door wegen.

Het emulgerend vermogen werd berekend als ml olie per g proteïne (N x 6,25). De dichtheid van de olie werd als 0,5 g/ml genomen.

De gemiddelde resultaten van de bepaling van het emulgerend vermogen bij de drie produkten zijn in tabel 3.6 vermeld.

De geslagen uitzetting werd bepaald in een 3%'s proteïneoplossing bij pH 6,5. 250 ml van de waterige dispersie van de proteïnemonsters werden geslagen bij snelheid III gedurende 4 min. in een Hobart menger (model N-50) voorzien van een draadklopinrichting. De geslagen uitzetting werd berekend volgens de formule

$$\text{geslagen uitzetting} = \frac{V-250}{250} \times 100\%,$$

waarin V = het geslagen eindvolume in ml.

V werd gemeten door de mengbeker opnieuw met water te vullen. Duplo's werden voor elk van de drie monsters uitgevoerd. De gemiddelde resultaten zijn in tabel 3.6 opgenomen.

De schuïmstabiliteit werd bepaald als de verhouding tussen de hoeveelheid schuïm die achterblijft na 30 min. uitlopen en de oorspronkelijke hoeveelheid schuïm. 1 g schuïm verkregen volgens de voorafgaande methode werd in een kunststofcilinder gebracht (diameter 7 cm, hoogte 9 cm) met een draadnet met een maaswijdte van 1 mm x 1 mm. De cilinder werd op een trechter bovenop een glazen cilinder geplaatst en het ge-

wicht (B) van uitgelopen vloeistof in de glazen cilinder wordt bepaald.
De schuimstabiliteit FS wordt gedefinieerd door de vergelijking

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

5

De resultaten van de bepaling zijn in tabel 3.6 vermeld.

De gelsterkte wordt in deze beschrijving gedefinieerd als de Brookfield viscositeit gemeten door middel van T-assen op een Brookfield Helipath statief. De gelen werden bereid door warmtebehandeling van 12%'s proteïnesuspensies in 0,5 M NaCl. De warmtebehandeling werd uitgevoerd in gesloten kannen met een diameter van 7,3 cm en een hoogte van 5,0 cm geplaatst in een waterbad, op 80°C en 100°C elk gedurende 30 min. gehandhaafd. De kannen werden gekoeld en met een thermostaat geregeld op 20°C voordat zij geopend en gemeten werden. De resultaten van de metingen zijn in tabel 3.6 vermeld.

Tabel 3.6 Functionele eigenschappen van de drie proteïneproducten A, B en C.

Functionaliteit	A. geïsoleerd soja- proteïneproduct	B. sojaproteïne- concentraat	C. geïsoleerd soja- proteïneproduct (p.v.p.)
% NSI in 0.2 M NaCl	39,5	20,3	25,6
% NSI in water	53,9	25,1	28,6
emulgerend vermogen: ml olie/g (N x 6,25)	218	182	354
geklopte uitzetting %	120	120	340
schuimstabiliteit %	50	50	20
gelsterkte; [poise] 80°C (0,5 M NaCl) 100°C (0,5 M NaCl)	1,7 x 10 ³ 2,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴ 4,0 x 10 ⁴	3,3 x 10 ² 1,3 x 10 ⁴

8204924

Voorbeeld IV (toepassingsvoorbeeld)

Een p.v.p. werd bereid volgens de in voorbeeld III C beschreven methode, behalve dat de cellulaseactiviteit partieel afkomstig was van Trichoderma reseei. Het in de handel verkrijgbare cellulasepreparaat

5 CELLUCLAST bereid door Novo Industrie A/S werd met een base bij lage temperatuur op de volgende wijze behandeld. De pH-waarde van een 10%'s CELLUCLAST oplossing in water werd met NaOH op 9,2 ingesteld en de aldus verkregen oplossing werd op 5°C gekoeld. Na 1 uur bij deze pH en deze temperatuur werd de pH opnieuw op 4,7 ingesteld met 20%'s azijn-

10 zuur. Deze oplossing werd een nacht op 5°C gehouden en daarna steriel gefiltreerd. Het filtraat werd aan een vriesdroogbehandeling onderworpen. 4 g van het door vriesdrogen verkregen produkt werden tezamen met het SPS-ase preparaat KRF 68 B III (voorbeeld I) toegevoegd. De twee enzymen werden oplosbaar gemaakt in 172 g water voordat toevoeging aan

15 het wasmengsel plaats vond. De massabalansbepalingen van dit voorbeeld worden in tabel 4.1 gegeven.

Het experiment laat zien, dat dit bijzondere SPS-ase preparaat reeds een doelmatig cellulase bevat aangezien toevoeging van CELLUCLAST de verhouding proteïne/droge stof niet schijnt te beïnvloeden. Echter

20 kunnen andere SPS-ase preparaten minder cellulase bevatten, bijvoorbeeld KRF 92, zie de onmiddellijk aan voorbeeld II voorafgaande tabel.

Tabel 4.1 Massabalansbepalingen van de isoelektrische wasbehandeling met inbegrip van een SPS-ase preparaat en CELLUCLAST R voor de bereiding van p.v.p.

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Wassen: sojameel	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
water	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
1. Centrifugering: Σ	4043,1	-	-	-	-
centrifugeprodukt I	3382,0	1,9	5,5	27,3	46,5
vaste stoffen I	661,0	-	-	-	-
Opnieuw wassen:					
vaste stoffen I	661,0	-	-	-	-
water	3339,0	0	0	0	0
6 N HCL	0	0	0	0	0
2. Centrifugering: Σ	4000,0				
centrifugeprodukt II	3414,0	0,2	0,7	2,9	6,0
vaste stoffen II	582,0	-	-	-	-

8204924

Tabel 4.1 (vervolg)

Bewerkingen en fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
Neutralisatie:					
vaste stoffen II	582,0	-	-	-	-
water	1691,0	0	0	0	0
4 N NaOH	25,3	0	16,0	0	1,0
Droging: poeder	206,0	88,8	98,9	77,8	50,9

8204924

Voorbeeld V (toepassingsvoorbeeld)

Volgens de in voorbeeld III C beschreven werkwijze werd een p.v.p. voortgebracht, behalve dat alle gewichten met een factor 5 werden verminderd en dat het reactiemengsel voorafgaande aan de centrifugering op 5 ongeveer 5°C werd gekoeld. Op basis van de analyseresultaten in verband met de centrifugeprodukten wordt een theoretisch rendement van neergeslagen proteïne verkregen, zoals vermeld in tabel 5.1.

Tabel 5.1 Theoretische proteïne rendementen verkregen bij de bereiding van p.v.p.

Fracties	Gewicht g	Proteïne (N x 6,25) %	Proteïne rendement %	Voorbeeld III C	
				Proteïne (N x 6,25) %	Proteïne rendement %
sojameel SPS-ase KRF-68 B-III	85,2 4,8	55,2 75,3	100 7,7	55,2 75,3	100 7,7
1e centrifugeproduct 2e centrifugeproduct p.v.p.	639 595 -	0,99 0,13 87,2 ^a	13,5 1,6 92,6 ^b	1,7 0,2 87,1	24,7 2,9 80,1 ^b

^a Gemiddelde van 87,5 (Biotechnisk Institut) en 86,9 (Qvist's Laboratorium);

droge stof resp. 97,6 en 98,0%.

^b Berekend als totaalgewicht van proteïne - proteïneverlies in centrifugeproducten.

Voorbeeld VI (toepassingsvoorbeeld)Aantoning van de proteïnebinding van SPS

40 g ($N \times 6,25$) van een geïsoleerd sojaproteïneprodukt uit de handel (Purina 500 E van Ralston Purina) werden in 680 g water opgelost.

5 Het mengsel werd in een waterbad op 50°C verwarmd en de pH werd met 6 N HCl op 4,50 ingesteld. 90 g van dit mengsel werden overgebracht naar vijf Erlenmeyerkolven van 250 ml en 10 g waterige oplossingen, die resp. 0 g, 0,2 g, 0,4 g, 0,8 g en 1,6 g van het SPS, bereid zoals eerder in de beschrijving beschreven, werden toegevoegd. De kolven werden

10 vervolgens met een magneet in een waterbad bij 50°C gedurende 240 min. geroerd.

Hierna werden de suspensies bij 3000 x g gedurende 15 min. gecentrifugeerd en de centrifugeprodukten I werden geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof. De vaste fasen werden in water bij kamertemperatuur

15 gewassen en opnieuw gecentrifugeerd. Deze methode werd herhaald. Vervolgens werden de vaste stoffen in 50 ml water gedispergeerd en de pH werd door de druppelsgewijze toevoeging van 6 N NaOH op 6,50 ingesteld. De geneutraliseerde produkten werden aan een vriesdroogbehandeling onderworpen en geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof. Op basis van de

20 in tabel 6.1 vermelde analyses worden de proteïne-winning en het percentage SPS, dat aan het proteïne is gebonden, berekend door middel van de in verband met tabel 6.2 vermelde formules.

Dit voorbeeld laat zien, dat het SPS stevig aan het proteïne is gebonden, zodat de proteïne/droge stof verhouding afneemt met toenemend

25 gehalte SPS. Een SPS gehalte vergelijkbaar met ongeveer 0,4 g in 10 g water toegevoegd aan 50 g geïsoleerd proteïneprodukt is de proteïne/SPS verhouding aanwezig in het sojameel.

Het % binding van SPS is een berekende waarde. Het % binding van SPS neemt af ten gevolge van verzadiging van het proteïne met betrek-

30 king tot SPS bij de lage proteïne/SPS verhoudingen.

Tabel 6.1 Metingen volgens voorbeeld VI

Verhouding proteïne/SPS	Centrifugeprodukten I		gedroogd precipitaat			
	% N	% DM	% N	N x 6,25	% DM	% $\frac{N \times 6,25}{DM}$
∞	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

Tabel 6.2 Proteïnewinning en % binding van SPS

Verhouding proteïne/SPS	% winning proteïne 1)	% binding van SPS 2)
∞	91,5	0
25	94,4	77
12,5	95,3	90
6,25	96,1	70
3,125	96,8	60

1) % winning van proteïne = $\left[1 - \frac{NC\ 1 \times 6,25}{5} \right] \times 100$, waarin NC 1 = % N in centrifugeprodukt I

2) % binding van SPS =
$$\frac{5 \times (\% \text{ winning van proteïne}) - 5 \times (\% \text{ winning van proteïne})}{(\% P/H)} \times 100,$$

[5/verhoudingen van SPS]

waarin
(% P/H) de proteïne/droge stof verhouding in het gedroogde precipitaat is, en
(% P/H)∞ voor het precipitaat zonder toevoeging van SPS is.

Voorbeeld VII (toepassingsvoorbeeld)

Dit voorbeeld beschrijft de bereiding van een p.v.p. onder toepassing van het SPS-ase preparaat KRF 92 B I in een dosering van 5% van de droge stof. De wijze van bereiding was exact zoals in voorbeeld III C, 5 behalve dat alle gewichten met een factor 5 waren verminderd. Het p.v.p. werd geanalyseerd zoals beschreven in voorbeeld II. De bij het experiment verkregen resultaten zijn in tabel 7.1 opgenomen.

Tabel 7.1 Resultaten verkregen bij voorbeeld VII

Component	Massa g	N x 6,25 %	Droge stof %	Proteïne rendement %	Droge stof rendement %
sojameel	85,2	55,2	94,0	100	100
enzympreparaat	4,00	71,2	-	6,1	-
1e centrifugeprodukt	632	1,88	5,44	25,3	43,0
2e centrifugeprodukt	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 Geanalyseerd bij Biotechnisk Institut. Holbergsvej 10, DK-6000 Kolding

^b Geanalyseerd bij Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000, Aarhus C.

Voorbeeld VIII (toepassingsvoorbeeld)

Dit voorbeeld licht het effect toe van de voorbehandeling van sojameel door koken met een straal voorafgaande aan de bereiding van p.v.p.

5 Voorbehandeling

Een suspensie van sojameel in water bestaande uit 10 kg sojameel (Sojamel 13 bereid door Aarhus Oliefabrik A/S) per 100 kg werd door een stoominjecteur (type Hydroheater B-300) gepompt en met stoom van 8 bar in een zodanige hoeveelheid en met een zodanige stroom gemengd, dat een
 10 eindtemperatuur van 150°C gedurende 25 sec. kon worden gehandhaafd in een buisvormige, onder druk gebrachte reactor. Hierna werd de druk in een ontspanningsruimte (een cycloon) opgeheven en vandaar werd de suspensie door een platenwarmteuitwisselaar gestuurd en op ongeveer 50°C gekoeld. De gekoelde suspensie kon direct gebruikt worden voor de be-
 15 reiding van p.v.p. volgens de uitvinding, maar in dit geval werd de suspensie door sproeien gedroogd bij een inlaattemperatuur van 200°C en een uitlaattemperatuur van 90°C. Het voorbehandelde produkt bleek een droge stof gehalte van 96,5% en een proteïnegehalte van 56,9% (N x 6,25) te bezitten.

20 Bereiding van p.v.p.

Deze bereiding werd op de volgende wijze uitgevoerd:

70 g droge stof van het met een straal gekookte en gedroogde sojameel werd gesuspenderd en bij 50°C in 560 g water geroerd en de pH werd door middel van 6,5 ml 6 N HCl op 4,50 ingesteld. 6 x 90 g van de-
 25 ze suspensie werden overgebracht naar zes Erlenmeyerkolven van 250 ml en op een waterbad bij 50°C geroerd door middel van magnetische roerders. Aan elke kolf werden 10 g van een oplossing toegevoegd, die resp. 0 g, 0,025 g, 0,050 g, 0,10 g, 0,20 g en 0,40 g van het SPS-ase preparaat KRF 68 B III bevatte. De reactiemengsels werden vervolgens gedu-
 30 rende 240 min. bij 50°C geroerd. Daarna werd een centrifugering bij 3000 x g gedurende 15 min. uitgevoerd.

De bovenstaande laag werd vervolgens geanalyseerd op Kjeldahl N en de vaste fase werd met water met gelijke volumina gewassen en gecentrifugeerd. Deze methode werd twee maal uitgevoerd. De vaste fase werd
 35 vervolgens aan een vriesdroogbehandeling onderworpen en geanalyseerd op Kjeldahl M en droge stof.

Een soortgelijk experiment werd uitgevoerd met een onbehandeld sojameel (Sojamel 13 van Aarhus Oliefabrik A/S) als uitgangsprодукt. In dit geval waren de enzymsubstraatverhoudingen 0%, 1%, 2%, 3%, 4% en 8%.

40 Op basis van het proteïnegehalte van de bovenstaande lagen kan het

8204924

percentage gewonnen proteïne berekend worden. Het rendement van de proteïne is gebaseerd op de aanname, dat het enzymprodukt 100% oplosbaar is gemaakt na de reactie. De tabel hierna laat de door beide experimenten verkregen resultaten zien.

5

Tabel 8.1 Proteïnerendement en proteïne droge stof verhouding
voor p.v.p. bereid uit gekookt en onbehandeld sojameel.

10	E/S %	gekookt sojameel		onbehandeld sojameel	
		Proteïne rendement %	Proteïne van droge stof %	Proteïne rendement %	Proteïne van droge stof %
15	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
20	8,0	-	-	76,2	91,1

In verband met hetzij de extractie (isolatie)processen voor materialen anders dan proteïnen hetzij de processen voor het vloeibaar maken en daarmee verwante processen wordt verwezen naar het algemene processchema voor toepassingen zoals aangegeven in stromingsdiagram nr. 3.

- 5 Het substraat kan een of meer koolhydraten aanwezig in een grondstof of het kan de totale grondstof zijn.

Dit substraat kan aan een voorbehandeling van chemische of fysische aard, zoals later zal worden toegelicht, bijvoorbeeld behandeling met zuur of alkali, drenken of weken en/of koken met of zonder stoom
10 worden onderworpen.

De grondstof kan geweekt, gehakt, nat gemalen en/of gehomogeniseerd (al deze behandelingen worden in stromingsdiagram nr. 3 aangeduid als gehomogeniseerd) met of zonder water toevoegingen worden en andere toevoegsels kunnen gedurende deze trap worden toegevoegd. De homogeni-
15 sering kan met verschillende doelmatigheid worden uitgevoerd, waarbij bijvoorbeeld verschillende drukken slechts een fractie zijn van de maximale druk die voor de gebruikte specifieke homogeniseringsinrichting gegeven wordt. Verschillende toevoegsels kunnen voor of tijdens de homogenisering worden toegevoegd, als voorgesteld door b_1 , b_2 , ...

- 20 b_n in stromingsdiagram nr. 3.

Het reactieproces, dat de SPS-ase bereiding omvat, wordt onder gespecificeerde omstandigheden uitgevoerd, bijvoorbeeld temperatuur, druk, tijd, pH en enzymdosering; alle aanbevelingen met betrekking tot de gebruikte reactor (bijvoorbeeld discontinu, propstroom) en indien
25 noodzakelijk roeren zijn relevant. Een stel toevoegsels kan voor verschillende grondstoffen gegeven worden, aangegeven als c_1 , c_2 , ...
 c_n in stromingsdiagram nr. 3.

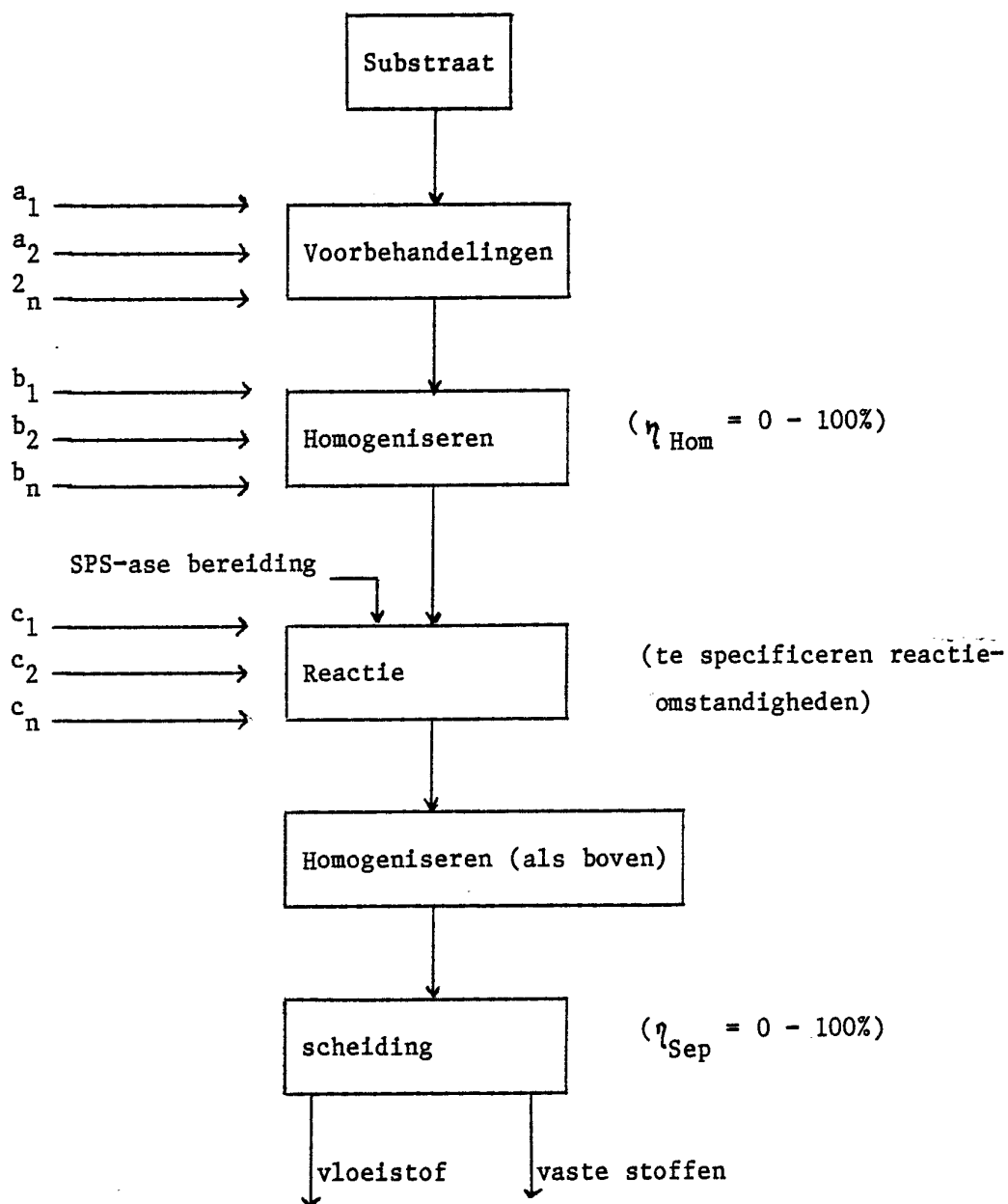
Ook kunnen de scheidingsprocessen met een verschillende doelmatigheid worden uitgevoerd. Gedurende vele processen wordt de scheiding
30 weggelaten of vergemakkelijkt, bijvoorbeeld wanneer de grondstof totaal vloeibaar is gemaakt. Verschillende scheidingsapparatuur kan gebruikt worden (bijvoorbeeld centrifuges, filters, ultrafiltratie-apparatuur, hydrocyclonen, verdikkingsinrichtingen, zeven of eenvoudige decanteer-
inrichtingen).

- 35 De scheidingsdoelmatigheid wordt gedefinieerd als de verhouding tussen het absolute slibgehalte in de vaste stoffenfase en het absolute slibgehalte van het reactiemengsel.

De verkregen vloeibare of vaste fasen kunnen verder worden behandeld, bijvoorbeeld geconcentreerd, gedroogd of met oplosmiddel geëxtra-
40 heerd, om bepaalde componenten zoals vet of olie, te verwijderen, ge-

fermenteerd voor de bereiding van biomassa's, alcohol of andere producten (enzymen, antibiotica of andere waardevolle componenten).

Ook kunnen de verkregen produkten teruggeleid worden voor een herhaalde behandeling door het processchema.

Stromingsdiagram nr. 3

Verdere behandelingen (zie tekst) en
hernieuwd gebruik als substraat

In het volgende worden enkele voorbeelden van toepassingen van SPS-ase preparaten gegeven en een overzicht van deze toepassingen blijkt uit de volgende lijst.

Eveneens zijn in de vergezellende tabel A bepaalde kenmerken in 5 verband met stromingsdiagram nr. 3 vermeld.

Lijst van voorbeelden van toepassingen van SPS-ase preparaten.

Type SPS-ase preparaat	Refereentie nr.	
5 SPS-ase preparaat in het bijzonder vrij van een of meer	A 1	Extractie van zetmeel uit mais, tarwe en aardappelen
	A 2	Extractie van lipiden uit plantenmateriaal
	A 3	Extractie van etherische oliën uit plantenmateriaal
	A 4	Extractie van natuurlijke kleurstoffen uit plantenmateriaal
10 ongewenste enzym activiteit	A 5	Extractie van rubber uit de guayul aanplanting
15 totale vloeibaarmaking niet of ge- soort- mo- gelijke	Ba 1	Productie van een melksubstituut voor huisdieren
	Ba 2	Productie van versuikerde zetmeel bevattende grondstoffen
	Ba 3	Totale vloeibaarmaking van peren en andere vruchten
	Ba 4	Productie van sap door behandeling van vruchten en groenten
20 di- behan- fi- deling	Ba 5	Behandeling in verband met extractie of persen van suikerriet of suikerbiet
	Ba 6	Productie van sojamelk
ceer- de	Ba 7	Behandeling om de winbare hoeveelheid oplosbare koffiebestanddelen te vergroten
25 SPS-ase pre- pa- ra- ten	Bb 1	Voorkoming en/of ontleding van appeltroebeling
	Bb 2	Gebruik als klaarmiddel voor witte wijn
	Bb 3	Productie van ISSPH of andere plantaardige gehydrolyseerde proteïneprodukten
	Bb 4	Aanmengingsenzym in de brouwerij
30	Bb 5	Enzymatisch toevoegsel voor gebruik tijdens bierfermentatie en/of opslag
	Bb 6	Losmiddel van amandelvlies
35 andere toe- pas- singen	Bc 1	Ontleding van verschillende afvalmaterialen
	Bc 2	Versuikering en gelijktijdige fermentatie
	Bc 3	Ontleding van cellulose
	Bc 4	Toepassing als bakhulpmiddel
	Bc 5	Verbetering van alcoholrendement en rendement van biomassa gedurende de fermentatie van sulfietafvalloog van de papierfabricage
40	Bc 6	Ontwatering van biologische slibprodukten
	Bc 7	Kuilvoederhulpmiddel

8204924

TABEL A

Ref.	Substraat	toevoegsels			1e homo- genisering % η Hom	2e homo- genisering % η Hom	schei- ding % η Sep	vloeistof fase	verdere behandelingen	
		a ₁	b ₁	c ₁					vaste fase	gecombineerde fase (geen scheiding)
A 1	mais	water SO ₂	water	NaOH of HCl	20-50	10-30	30-50	(bevat kiem) wassen, olie- winning	wasbe hande- lingen	-
A 2	mais kiem	-	-	NaOH of HCl	0	0	100	(olie + water) zuivering	(afval)	-
Ba 1	sojameel (ontvet)	water	-	HCl	0	0	0	-	-	pasteurisatie, concentratie, sproeidrogen
Ba 2	bataten	water	terma- myl	NaOH of HCl	-	-	0	-	-	gist voor alco- holfermentatie, destillatie

8204924

TABEL A (vervolg)

Ref.	Substraat	toevoegsels			1e homo- genisering % η Hom	2e homo- genisering % η Hom	schei- ding % η Sep	vloeistof fase	verdere behandelingen	
		a ₁	b ₁	c ₁					vaste fase	gecombineerde fase (geen scheiding)
Ba 5	suiker- bieten	water	-	NaOH of HCl	10%	-	100	kristal- lisatie	(afval)	-
Bc 1	tofu of sojamelk residu	water	-	HCl	10%	-	0	-	-	gist voor alco- holfermentatie, destillatie

A. 1 Extractie van zetmeel uit mais, tarwe en aardappelen.

Extractie van zetmeel uit mais, tarwe, aardappelen en andere zetmeel bevattende planten wordt uitgevoerd met een of meer van de trappen: weken, nat malen en scheiden. Toepassing van een SPS-ase pre-
 5 paraat met in hoofdzaak geen amylolytische activiteit zal de volgende voordelen verschaffen, waarbij mais als voorbeeld wordt gebruikt:

1. De vrijmaking van zetmeel zal gedurende een korte inweekperiode vergemakkelijkt worden,
2. Het waterverbruik kan verminderd worden,
- 10 3. De vrijmaking van maiskiemen zal vergemakkelijkt worden zonder vrijmaking van maiskiemolie,
4. De proteïne kan met grotere zuiverheid verkregen worden.
5. De terugwinning van maisinweekwater zal vergemakkelijkt worden.

15 A. 2 Extractie van lipiden uit plantenmateriaal.

Aangezien de lipiden in plantenmaterialen in de cellen zijn ingesloten en gewoonlijk aan proteïnen zijn gebonden, kunnen lipiden geëxtraheerd worden in een waterige fase voor behandeling met een SPS-ase preparaat, dat in hoofdzaak vrij is van lipasen. Derhalve wordt
 20 maiskiemolie gewoonlijk geïsoleerd door hexaanextractie van gedroogde maiskiemen. Echter wordt de droogbehandeling overbodig, wanneer de natte maiskiemen behandeld worden met een SPS-ase preparaat van het hiervoor aangegeven type. Eveneens kan de extractie van olijfolie in een waterige fase verbeterd worden, wanneer het gebruikte enzym voor de en-
 25 zymatische behandeling een SPS-ase preparaat van het hiervoor aangegeven type is, zie bijvoorbeeld Food, Pharmaceutical and Bioengineering, Nr. 172, 74, 93-94. Eveneens kan de waterige extractie van bijvoorbeeld sojaolie, raapzaadolie en zonnebloemolie op soortgelijke wijze verbeterd worden.

30 A. 3 Extractie van etherische oliën uit plantenmaterialen.

Wanneer plantaardige materialen, die etherische oliën bevatten, geëxtraheerd worden met een waterige oplossing van een SPS-ase preparaat, dat in hoofdzaak vrij is van enzymatische activiteit, die in staat is de etherische oliën te ontleden of anderszins te veranderen,
 35 zullen de etherische oliën in hoge rendementen bij zeer weinig kosten gewonnen worden.

A. 4 Extractie van natuurlijke kleurstoffen uit plantenmateriaal.

Wanneer plantaardige materialen, die kleurstoffen bevatten, bijvoorbeeld wortels van krotten, die de rode kleurstof betanine bevatten
 40 of de kleurstof in veenbessen behandeld worden met een SPS-ase prepa-

raat, dat in hoofdzaak vrij is van enzymactiviteiten, die in staat zijn de kleurstoffen te ontleden of anderzins te veranderen, zullen de kleurstoffen met hoge rendementen bij zeer weinig kosten gewonnen worden.

A.5 Extractie van rubber uit de guayul aanplanting.

- 5 Een ander voorbeeld van een substraat voor een SPS-ase preparaat, dat in hoofdzaak vrij is van enzymatische activiteit, die in staat is natuurlijke rubber te ontleden, is het celwandmateriaal in wortels en takken van de guayul beplanting.

- 10 Ba 1 Produktie van een melksubstituut voor huisdieren, bij voorkeur een kalfmelksubstituut.

- Door een totale vloeibaarmaking in een waterig milieu van sojabonen, zonnebloemzaden, katoenzaden, faba bonen of erwten kan een kalfmelksubstituut, dat in koud water bij een pH-waarde van ongeveer 4,5 oplosbaar is, voortgebracht worden. Onder toepassing van de zetmeel
15 bevattende grondstoffen zoals faba bonen of erwten dient een vloeibaarmaken van zetmeel door middel van een α -amylase te worden uitgevoerd voor, na of gelijktijdig met een behandeling met een SPS-ase, dat ten slotte de niet zetmeelpolysacchariden aanwezig als het structuurmateriaal in de celwanden oplosbaar maakt. Een gedetailleerd voorbeeld
20 wordt hierna gegeven onder toepassing van faba bonen en met betrekking tot sojabonen wordt verwezen naar tabel A. De voorbehandeling van deze sojabonen kan bij voorkeur een straalkookbehandeling zijn, die het oplosbaarmaken van de remanentie verbetert.

Voorbeeld Ba 1.1

- 25 15 kg faba bonenmeel (Farine de Feves van GRANDES MINOTERIES A FEVES DE FRANCE, Parijs) werden in 35 l water gesuspenseerd. 75 g Termamyl 60 L en 18 g CaCl_2 werden toegevoegd. De suspensie werd onder toepassing van een ketel met stoommantel onder roeren op 95°C verwarmd. De suspensie werd vervolgens bij deze temperatuur gedurende 60 min. be-
30 handeld. Hierna werd de pH op 4,5 ingesteld en werd het produkt op 50°C gekoeld. 300 g van het SPS-ase preparaat KRF 68 werden in 1 l water oplosbaar gemaakt en toegevoegd. De reactie werd gedurende 440 min. uitgevoerd. Wanneer 10 g Fungamyl 800 L is opgenomen zal de zetmeelfractie in hoofdzaak tot disaccharide (maltose) zijn omgezet. Hierna werd het
35 reactiemengsel gedurende 2 min. bij 90°C gepasteuriseerd. Een fractie deel van het produkt werd vervolgens aan een vriesdroogbehandeling onderworpen en voor stabiliteitsproeven gebruikt. Vervolgens werd het monster bij 10% droge stof oplosbaar gemaakt en kon de oplossing van het produkt gedurende dagen zonder sedimentatie stabiel worden gehou-
40 den.

8204924

Gesmolten vet of olie kan gemakkelijk in het produkt geëmulgeerd worden, waarbij een eindsamenstelling kan worden verkregen, die zeer soortgelijk is aan koemelk. Een emulsie, die 3,5% olie (sojaboonolie) bevatte, kon eveneens gedurende dagen zonder sedimentatie stabiel worden gehouden.

Voorbeeld Ba 1.2

Sojameel (Soja 13) werd gedurende 25 sec. bij 150°C met een straal gekookt zoals beschreven in voorbeeld VIII. Het met een straal gekookte sojameel werd aan een sproeidroogbehandeling onderworpen en voor verdere onderzoeken, zoals hierna beschreven, gebruikt.

A:

50 g van het met de straal gekookte sojameel werden gemengd met 450 g water en de pH werd met 4,1 ml 6 N HCl op 4,5 ingesteld. Vervolgens werd het mengsel in een waterbad op 45°C verwarmd en 0,250 g van het SPS-ase preparaat KRF 68 werd aan het verwarmde mengsel toegevoegd, dat vervolgens gedurende 5 uren onder roeren werd omgezet. Daarna werd het mengsel gedurende 2 min. bij 80°C met warmte behandeld om het enzym te inactiveren. Een monster van 100 ml werd gecentrifugeerd bij omgevingstemperatuur gedurende 15 min. bij 3000 x g (g = zwaartekracht). De bovenstaande laag werd aan een ionenuitwisselingsbehandeling onderworpen en op koolhydraatsamenstelling door hoge druk vloeistofchromatografie geanalyseerd. Ook werd de bovenstaande laag geanalyseerd op Kjeldahl N en droge stof en de stikstofoplosbaarheidsindex (NSI) en de droge stof oplosbaarheidsindex (DSI) werden berekend; zie de resultaten in tabel Ba I. 100 ml van het op 20°C gekoelde reactiemengsel werd in een geijkt glas van 100 ml gegoten en twee dagen op 4°C gehouden. De dispersiestabiliteit (%) werd gemeten door het volume van de verkregen dispersies (tabel Ba II) na één en twee dagen af te lezen.

Aan 100 ml van het reactiemengsel (bij 20°C) werden 8 g sojaboonolie toegevoegd. Een emulsie werd bereid door 2 min. in een Waring menginrichting te mengen. De emulsiestabiliteit (%) werd zoals hiervoor na één en twee dagen gemeten.

B:

Een reactie werd uitgevoerd zoals hiervoor, echter werd in dit geval 1,00 g van het SPS-ase preparaat gebruikt. Dezelfde typen analyses en stabiliteitsmetingen als beschreven in paragraaf A werden uitgevoerd. De resultaten zijn vermeld in de tabellen Ba I en Ba II.

Het blijkt uit de chemische analyse van de bovenstaande lagen, dat de waarden voor NSI (%) en DSI (%) verkregen bij het B experiment hoger zijn dan voor het A experiment. Echter vertonen de stabiliteitsproeven

uitgevoerd bij de reactiemengsels een betere waarde voor de A monsters. Dit is waarschijnlijk toe te schrijven aan de grotere lengte van de peptideketen van de proteïnen in het reactiemengsel met de lage enzymdoserings.

- 5 Uit de koolhydraatsamenstelling gemeten door hoge druk vloeistofchromatografie blijkt dat in hoofdzaak mono- en disacchariden worden voortgebracht. Derhalve zijn oligosacchariden, die zoals bekend verantwoordelijk zijn voor diarree en winderigheid bij toediening aan kalveren in te grote hoeveelheden, slechts in kleine hoeveelheden aanwezig.

Tabel Ba I Chemische eigenschappen van de bovenstaande laag

Experi- menten	Enzymdosering in verband met substraat gew.%	NSI, % * (bij pH = 4,5)	DSI, % ** (bij pH = 4,5)	HPLC resultaten (neutrale suiker- samenstelling)
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 = stikstofoplosbaarheidsindex

** DSI = droge stof oplosbaarheidsindex

8204924

Tabel Ba II Stabiliteitsproeven van de reactiemengsels

Experi- menten	Enzymdosering in verband met substraat gew. %	Stabiliteitsproeven			
		zonder olie		met olie	
		dispersie 1e dag	dispersie 1e dag	emulsie 1e dag	emulsie 1e dag
A	E/S = 0,5%	80%	63%	100%	87%
B	E/S = 2,0%	66%	35%	85%	71%

Ba 2 Bereiding van versuikerd zetmeel bevattende grondstoffen.

In verband met de versuikering van cassave en bataten en andere zetmeel bevattende plantenmaterialen is de toevoeging van een SPS-ase preparaat in staat viscositeitsproblemen op te lossen. Door toepassing van een SPS-ase preparaat is het mogelijk zetmeelsuspensies voort te brengen met een droge stofgehalte van 25-30% en na versuikering kan het beslag gefermenteerd worden, waarbij een goedkope ethanol verkregen kan worden.

Voorbeeld Ba 2.1

Op basis van verse en geraspte bataten (Japans) werd een beslag met een droge stofgehalte van 24% voortgebracht. Het zetmeelgehalte van bataten bleek ongeveer 70% van het droge stofgehalte ervan te zijn. Een voorafgaande vloeibaarmaking door middel van het bacteriële amylase van Termamyl® 60 L in een dosering van 0,5 kg/ton zetmeel werd uitgevoerd door het beslag op 90°C te verwarmen. Het beslag werd vervolgens gedurende 30 min. op 90°C gehouden. De viscositeit μ_1 van het reactiemengsel werd vervolgens gemeten door middel van een HAAKE as bij 90°C.

Hierna werd het reactiemengsel op 55°C gekoeld en werd de pH met 2 N H_2SO_4 op 5,0 ingesteld. Vervolgens werd een versuikering getiend door toevoeging van het gluco-amylase SAN 150 (handelsmerk van NOVO INDUSTRI A/S) in een dosering van 1,75 l/ton zetmeel. Het versuikeringsemengsel werd vervolgens in drie delen verdeeld, A, B en C, die met enzym werden behandeld gedurende 15 min. zoals hierna aangegeven voordat meting van de viscositeit plaats vond:

- A: Dit deel is het controledeel. De viscositeit μ_2 werd gemeten, zie tabel Ba III
- B: Het Trichoderma viride cellulase van Celluclast® 200 N werd toegevoegd in een dosering van 1 kg/ton droge stof van bataten. De viscositeit μ_3 werd gemeten, zie tabel Ba III
- C: Het SPS-ase preparaat van KRF 68 werd toegevoegd in een dosering van 0,25 kg/ton droge stof van bataten. De viscositeit μ_4 werd gemeten, zie tabel Ba III

Tabel Ba III Viscositeiten

Reactiemengsel	Viscositeit bij 90°C	Viscositeit bij 55°C
vooraf vloeibaar gemaakte bataten	$\mu_1 = 770 \text{ cp}$	$\mu_2 = 2190 \text{ cp}$
A	-	$\mu_2 = 2190 \text{ cp}$
B	-	$\mu_3 = 1970 \text{ cp}$
C	-	$\mu_4 = 950 \text{ cp}$

Derhalve kan gezien worden, dat de viscositeit van het reactiemengsel effectief verminderd kan worden met het SPS-ase in een lage dosering in vergelijking met Celluclast® en SAN 150.

Ba 3 Totale vloeibaarmaking van peren en andere vruchten.

- 5 Wanneer gehele peren, die mechanisch zijn geperst, vervolgens worden behandeld met een SPS-ase preparaat, heeft een totale vloeibaarmaking plaats en wordt een doorzichtig peresap voortgebracht na verwijdering van ondergeschikte hoeveelheden vaste stof. Een soortgelijke methode kan gebruikt worden in verband met andere soortgelijke vruchten,
10 bijvoorbeeld appels.

Voorbeeld Ba 3.1

- Verse appels werden grof gemalen door middel van een Bucher Central molen. Het appelbeslag werd vervolgens in een tank met een mantel voor verwarming bij 90°C gedurende 5 min. gepasteuriseerd en vervolgens op
15 omgevingstemperatuur gekoeld. De vooraf fijngemaakte appels werden vervolgens gemalen op een Fryma molen met een korund-stenen uitvoering tot het beslag bij aanraken glad was. Het beslag werd vervolgens gedurende 10 min. bij 80°C opnieuw gepasteuriseerd en op 50°C gekoeld.

- Enzymreacties werden nu bij 50°C gedurende 30 min. uitgevoerd met
20 de Contraves Rheomat 15, waarbij het roeren en de viscositeitsmeting (in relatie met een percentage aflezing op de rheometer bij snelheid 13) gelijktijdig werden uitgevoerd. Na voltooiing van de enzymreacties werden monsters van 100 g onttrokken en in een geijkte buis gedurende 15 min. bij 3000 x g gecentrifugeerd. Hierbij worden het percentage sap
25 en het percentage afzetting gemeten. De pH en het percentage van refractometer droge stof als °Brix werden eveneens gemeten. Tabel Ba IV laat een vergelijking zien tussen het effect van SPS-ase, de combinatie van Celluclast en SPS-ase en de combinatie van Celluclast en Pectinex. Het SPS-ase preparaat KRF 68 werd gebruikt.

Tabel Ba IV Resultaten van experimenten voor het totaal vloeibaarmaken met appelbeslag gedurende 30 minuten bij 50°C.

SPS-ase g/hl beslag	Celluclast R 200 l g/hl beslag	Pectinex R 3x g/hl beslag	eind- viscositeit %	centrifugering		
				% sap	% afzetting	sap
0	0	0	100	59	41	3,8 9,7
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 3,8	83 83	17 17	3,5 3,1 10,8 12,5
0	50	200	9,5	83	17	3,2 12,9
0	50	2000	4,0	82	18	3,1 13,2

Ba 4 Bereiding van sap door behandeling van vruchten en groenten.

Gevonden werd, dat SPS-ase preparaten goed geschikt zijn voor de bereiding van sap door behandeling van verschillende vruchten, bessen en groenten, bijvoorbeeld wortelen, erwten, tomaten, appels, peren, 5 zwarte bessen, bonen en kool. Hierbij worden een verbeterd saprendement en een betere extractie van kleur- en smaakcomponenten bereikt in vergelijking met in de handel verkrijgbare pectinase- en cellulasepreparaten.

Voorbeeld Ba 4.1

10 Verwezen wordt naar voorbeeld Ba 3.1, waarin het SPS-ase preparaat is vergeleken met de in de handel verkrijgbare gebruikelijke cellulase- en pectinaseprodukten Celluclast® 200 L en Pectinex® 3x. Uit de tabel blijkt, dat het saprendement enigszins kan worden verbeterd met slechts 50 g/hl SPS-ase in vergelijking met 2000 g/hl Pectinex®, 15 beide in combinatie met 50 g/hl Celluclast®. Ook was de viscositeit enigszins lager. Het blijkt dus, dat het SPS-ase ongeveer 40 maal effectiever is dan Pectinex.

Ba 5 Behandeling in verband met extractie of persen van suikerriet of suikerbiet.

20 Gevonden werd, dat het mogelijk is het rendement in verband met eenvoudige extractieprocessen te verbeteren, wanneer het SPS-ase preparaat gebruikt wordt voor de behandeling van suikerriet of suikerbiet voorafgaande aan en/of tijdens de extractie of het uitpersen ervan. Ook kan de remanentie (de ampas) behandeld worden met het SPS-ase 25 preparaat, waarbij dit ten dele wordt omgezet tot fermenteerbare suikers, die gebruikt kunnen worden als grondstof voor ethanolfermentatie.

Voorbeeld Ba 5.1

10 kg suikerbietremanentie (pulp) verkregen uit continue tegenstroomextractie in een DDS-diffusieinrichting bij Nakskov Sugar Factory 30 werd tweemaal in een Fryma molen (type MZ-110) gemalen. Proceswater werd gedurende de maalbewerking toegevoegd.

Gedeelten van 300 g van de pulp werden nu met enzym behandeld bij 45°C gedurende 18 uren door middel van de enzymdoseringen, die in tabel Ba V zijn gegeven. Het droge enzymprodukt (KRF 68) werd aan de pulp 35 toegevoegd, die met een staaf gedurende het eerste uur werd geroerd. Daarna werd de pulp tot een zodanige mate vloeibaar gemaakt, dat magnetroering geleidelijk kan worden uitgevoerd gedurende de resterende tijd. Aan het einde van de reactie werd de pH gemeten (geen pH correcties werden gedurende de start van de reactie uitgevoerd) en het reactiemengsel werd gecentrifugeerd tot een heldere bovenstaande laag werd 40

(geen pH correcties werden gedurende de start van de reactie uitgevoerd) en het reactiemengsel werd gecentrifugeerd tot een heldere bovenstaande laag werd verkregen. Droge stofbepalingen werden bij de reactiemengsels en bij de bovenstaande lagen uitgevoerd. Op basis van
5 deze resultaten werden de percentages oplosbaar gemaakte droge stof berekend. Correcties voor de oplosbare droge stof van het enzymprodukt werden bij alle berekeningen uitgevoerd.

De bovenstaande lagen 2, 3 en 4 werden met een ionenuitwisselaar behandeld en geanalyseerd door hoge druk vloeistofchromatografie op de
10 koolhydraatsamenstelling.

Tabel Ba V

Resultaten verkregen voor het vloeibaar maken van bietenpulp met enzymen.

Experi- ment nr.	Enzymdosering in verband met droge stof E/S %	Eindmetingen			
		reactiemengsel		bovenstaande lagen	
		pH (eind)	% droge stof	% droge stof	% oplosbaar gemaakte droge stof
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

Reactie-omstandigheden : M = 300 g

S = 4,18% droge stof

E/S als boven

pH niet ingesteld

T = 45°C

t = 18 uren

Tabel Ba VI Hoge druk vloeistofchromatografiegegevens.

5	suikertype (neutraal)	Experiment nr.		
		2	3	4
		% van neutrale suikers		
10	grootmoleculig (DP4+)	43,6	31,9	25,3
	disacchariden	4,6	4,8	-
	glucose	20,4	23,7	27,8
15	galactose	5,0	5,9	7,3
	fructose/arabinose	26,4	32,2	33,2
	galacturonzuur	niet gemeten		
20				

Alle volgens de voorafgaande tabel Ba VI gevormde suikers konden tot alcohol gefermenteerd worden of voor andere doeleinden worden gebruikt.

25 Ba 6 Bereiding van sojamelk.

Sojamelk kan gemakkelijk worden voortgebracht door totale vloeibaarmaking van gemalen sojabonen en daarop volgende homogenisering van het verkregen mengsel. Sojamelk wordt vaak voortgebracht door sojabonen in kokend water te drenken, de gedrenkte bonen te malen en met water te extraheren gevolgd door een scheiding van onoplosbare residuën, bijvoorbeeld proteïnen en polysacchariden. Om het rendement van de sojamelk te verbeteren kunnen deze onoplosbare residuën door reactie met het SPS-ase vloeibaar worden gemaakt.

Voorbeeld Ba 6.1

35 Het sojamelkproces wordt toegelicht door de volgende reeks enzymreacties, waarbij berekeningen van de proteïneoplosbaarheidsindex (PSI, %) en de droge stof oplosbaarheidsindex (DSI, %) de rendementen toelichten, die verkregen worden na afscheiding bij pH 7 (zie tabel Ba VII). De enzymreacties werden onder de volgende omstandigheden uitgevoerd:

40

8204924

Substraat	: compleet vet sojameel (Dansk Sojakagefabrik A/S)
Gewicht van het reactiemengsel:	220 g
5 Gewicht van het substraat	: 20 g
Temperatuur	: 50°C
pH	: 4,5 (6 N HCl)
Reactietijd	: serie A: 1 uur
Reactietijd	: serie B: 0,5-6 uren
10 Enzym	: SPS-ase (KRF 68)
Enzymdosering	: serie A: E/S-verhouding (gew./gew.): 0-8,0% serie B: E/S-verhouding (gew./gew.): 1,0%

15

Na de reactie werd de pH door middel van 4 N NaOH op 7 ingesteld en een scheiding uitgevoerd door 15 min. te centrifugeren bij 3000 x g.

Tabel Ba VII Gewicht balansberekeningen in verband met het enzymatische sojamelkproces.

Serie	Reactie- tijd uren	Enzym- dosering E/S %	Reactiemengsel		Bovenstaande laag		Oplosbaarheidsindices	
			% proteïne	% droge stof	% proteïne	% droge stof	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	73,7	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

Ba 7 Behandeling teneinde de winbare hoeveelheid oplosbare koffiebestanddelen te vergroten.

Gevonden werd, dat de behandeling van koffiebonen bij verschillende stadia gedurende de produktie van instantkoffie resulteert in een vergroot rendement van oplosbare koffiebestanddelen. Derhalve kunnen bijvoorbeeld verbruikte gemalen koffieprodukten of groene bonen met enzym met gunstige resultaten worden behandeld.

Bb 1 Voorkoming en/of ontleding van appel- of perentroebling.

Na de produktie van appel- of peresap en andere vruchtensappen, die doorzichtig moeten zijn, en die vooraf zijn behandeld met gebruikelijke pectinase en cellulasepreparaten teneinde de vorming van troebeling te voorkomen, kunnen een appeltroebling of soortgelijke vruchtentroeblingen verschijnen. Gevonden werd, dat de SPS-ase preparaten zeer geschikt zijn voor ontleding van dergelijke troebelingen, die in hoofdzaak bestaan uit aan proteïnen gebonden araban.

Voorbeeld Bb 1

Geconcentreerd peresap bereid door enzymatische vloeibaarmaking van conservenafval van peren onder toepassing van Celluclast[®] en Pectinex[®] bleek bij bewaren troebel te zijn. De troebeling werd geïsoleerd en gehydrolyseerd met 0,01 N H₂SO₄ gedurende 24 uren en door hoge druk vloeistofchromatografie geanalyseerd. Het chromatogram vertoonde arabinose en kleine hoeveelheden oligosacchariden.

Door incubatie van 0,5 gew./vol.% van dit koolhydraat in 1 mmol acetaabuffer bij pH 4,5 gedurende 3 uren bij 40°C met SPS-ase (KRF 68 + KRF 92 1:1) met een enzymconcentratie van 0,05 gew./vol.%, bleek dat 84% van het oorspronkelijke troebelingskoolhydraat (droge stof) was omgezet tot arabinose.

Eveneens werd verdund pereconcentraat (20 °Brix) gedurende 2 uren bij 40°C behandeld met een enzymdosering van het hiervoor vermelde SPS-ase van 0,15 gew./vol.% of met een handelsprodukt Clarex[®] in een dosering van 1 gew./vol.%. Gevonden werd, dat het SPS-ase in staat was het relatieve HPLC-piekgebied van een arabanachtige troebeling met 86% te verminderen, terwijl de overeenkomstige reductie met Clarex[®] (in een veel hogere dosering gebruikt dan het SPS-ase preparaat) slechts 78% was.

Bb 2 Gebruik als klaarmiddel voor witte wijn.

Gevonden werd, dat witte wijnen, die een sterk ongewenste troebeling vertoonden, effectief geklaard kunnen worden door middel van SPS-ase. Aangetoond wordt, dat het troebelachtige materiaal in hoofdzaak bestaat uit arabinogalactanen, die aan hydroprolineresiduën gebon-

den zijn in een structureel proteïne van de celwand.

Bb 3 Produktie van ISSPH of andere plantaardige proteïnehydrolysaten.

5 Voorafgaande aan de afscheiding van ISSPH (isoelektrisch oplosbaar sojaproteïnehydrolysaat) of andere plantaardige proteïnehydrolysaten uit de slib, zoals beschreven in het Amerikaanse octrooischrift 4.100.024 of in Process Biochemistry, 14 nr. 7 (1979), 6-8 en 10-11, kan het reactiemengsel met een SPS-ase preparaat behandeld worden. Hierbij wordt een gemakkelijkere afscheiding verkregen.

10 Bb 4 Beslagenzym in de brouwerij-industrie.

Bij de bereiding van bier beïnvloeden koolhydraten van de grondstoffen, bijvoorbeeld de β -glucanen van mout en gerst, de viscositeit en de filtreerbaarheid van de wort. Toevoeging van SPS-ase tijdens het beslag maken zal de viscositeit van de wort verminderen en de fil-
15 treerbaarheid en het extractrendement verbeteren. Voorts zal toevoeging van SPS-ase tijdens het beslag maken de fermenteerbaarheid van de wort en het stikstofgehalte in de wort vergroten.

Voorbeeld Bb 4.1

In het laboratorium werden 50 g gemalen korrels, bestaande uit 50%
20 mout en 50% gerst, tezamen met 275 g water tot een beslag verwerkt (15% droge stof) volgens het volgende beslagdiagram: 52°C (60 min.)/63°C (60 min.)/76°C (30 min.).

Teneinde het effect van het SPS-ase toe te lichten werden vier proeven uitgevoerd, zie de hierna aangegeven tabel, waarbij de enzymen
25 tijdens het beslag maken werden toegevoegd (pH van het beslag 5,5-6,0).

Enzym		geen	Cereflo	SPS-ase (KRF 68)	
5	Activiteit van beta-glucanase/g	0	200 BGU	1630 FBG	1630 FBG
	Dosering van enzym per kg korrels	0	1,5 kg	0,05 g	0,18 g
10	Totale dosering van enzymactiviteitseen- heden per kg korrels	0	300 BGU	80 FBG	300 FBG
15	Filtratiesnelheid van wort na 10 minuten	120 ml	135 ml	160 ml	170 ml
20	Viscositeit van wort 10° Balling (25°C)	1,52 cP	1,36 cP	1,36 cP	1,30 cP

BGU is β -glucanase-eenheden bepaald volgens de analytische methode AF 70/4-GB verkrijgbaar bij NOVO INDUSTRI A/S.

25 FBG is fungus β -glucanase-eenheden bepaald volgens de analytische methode AF 70.1/2-GB verkrijgbaar bij NOVO INDUSTRI A/S.

Het enige verschil tussen BGU en FBG is de pH, waarbij de enzymbe-
paling wordt uitgevoerd: pH 7,5 voor BGU en pH 5,0 voor FBG.

30 Cereflo is een bacterieel β -glucanasepreparaat beschreven in het informatiebulletin B 214b-GB 1500, juli 1981 verkrijgbaar bij NOVO IN-
DUSTRI A/S.

Voorbeeld Bb 4.2

35 In het laboratorium werden 50 g gemalen korrels, bestaande uit 40% mout en 60% gerst, tezamen met 150 g water tot een beslag verwerkt (25% droge stof) volgens het volgende beslagdiagram: 45°C (60 min.)/63°C (90 min.)/75°C(15 min.).

Teneinde het effect van het SPS-ase te demonstreren werden drie proeven uitgevoerd, zie de hierna vermelde tabel, waarbij de enzymen tijdens het beslagmaken werden toegevoegd (pH van het beslag 5,5-6,0).

	Enzym	geen	Ceremix	SPS-ase (KRF 68) + Ceremix toegevoegd als bij vorige proef
5	Activiteit van beta-glucanase/g	-	200 BGU	1630 FBG
10	Dosering van enzym per kg korrels	-	1,65 kg	0,033 g
15	Totale dosering van enzymactiviteitseen- heden per kg korrels	0	330 BGU	50 FBG
	Filtratiesnelheid van wort na 30 minuten	48 ml	98 ml	111 ml
20	Extract, °Balling Viscositeit van wort 10° Balling (25°C)	18,6 1,72 cP	19,0 1,37 cP	19,5 1,27 cP

De definitie van BGU en FBG is zoals aangegeven in voorbeeld Bb
 25 4.1. In de laatste kolom in de voorafgaande tabel is slechts de activi-
 teit en de dosering afkomstig van SPS-ase aangegeven.

Ceremix is een bacterieel β -glucanasepreparaat beschreven in het
 informatiebulletin B 216d-GB 1000, februari 1982, verkrijgbaar bij NOVO
 INDUSTRI A/S.

30 Bb 5 Enzymatisch toevoegsel voor toepassing tijdens bierfermen-
 tatie en/of opslag.

SPS-ase kan tijdens de fermentatie van wort of de opslag van
 bier worden toegevoegd om het gehalte β -glucanen te verminderen en
 daarbij de bierfiltratie en de bierstabiliteit met betrekking tot troe-
 35 beling te verbeteren. SPS-ase zal eveneens een invloed uitoefenen op
 proteïnen, die verantwoordelijk zijn voor troebeling in de koude.

Bb 6 Losmiddel voor amandelschillen.

Tijdens de mechanische verwijderingstrap van amandelschillen
 na het pellen van amandelen wordt een bepaald percentage van de aman-
 40 delschillen niet losgemaakt. Gevonden werd, dat behandeling van de

amandelen met enzym resulteert in een afname van het hiervoor aangegeven percentage.

Bc 1 Ontleding van verschillende afvalmaterialen.

In verband met bepaalde fabricageprocessen worden grote hoeveelheden koolhydraat bevattende afvalmaterialen gevormd. Bijvoorbeeld is dit het geval in verband met de produktie van geïsoleerd sojaproduct door extractie met water en precipitatie met zuur, sojamelk en tofu (een speciale soort Japanse kaas). Ook kan in dit verband afvalpulp van bijvoorbeeld appels, peren of citrusvruchten vermeld worden. Gevonden werd, dat een SPS-ase preparaat in staat is dit koolhydraat bevattende afvalmateriaal volledig vloeibaar te maken en fermenteerbare suikers voort te brengen, die gebruikt kunnen worden als een uitgangsproduct voor ethanolfermentatie.

Voorbeeld Bc 1.1

Bij de gebruikelijke produktie van sojamelk of tofu worden sojabonen veelal in kokend water gedompeld, gemalen en met warm water geëxtraheerd, waarna een scheiding wordt uitgevoerd. Het residu van deze scheiding is het materiaal dat voor het experiment wordt gebruikt. De vloeibare fase is de sojamelk, die verder kan worden behandeld om tofu voort te brengen.

10 kg gehele sojabonen, verkregen van Aarhus Oliefabrik A/S werden gelijktijdig met 70 l kokend water in een Fryma molen type MZ 110 gemalen. De gemalen suspensie werd vervolgens gedurende 15 min. boven 85°C gehouden om de natuurlijke boonenzymen te inactiveren, die de bekende onaangenomen sojaboongeur ontwikkelen. 5 l van deze sojaboonsuspensie werden vervolgens gedurende 15 min. bij 3000 x g (g = zwaartekracht) in het laboratorium gecentrifugeerd. Door analyse werd gevonden dat de remanentie 20,45% en 20,06% droge stof bevatte (duplobepalingen, berekend gemiddelde 20,26%). 6 N HCl werd langzaam toegevoegd en met een spatel in de remanentie verwerkt tot een pH meter de waarde 4,50 liet zien, wanneer de elektrode direct in de massa werd ingevoerd.

Enzymreacties op 2 x 200 g van de massa met de twee doseringen van het SPS-ase (KRF 68), E/S = 0,5% in verhouding tot droge stof en E/S = 3,0% in verhouding tot droge stof, werden uitgevoerd in een beker van 500 ml bij 50°C. Het droge enzym werd aan de massa toegevoegd. Tijdens de eerste 1-2 uren werd de roerbehandeling uitgevoerd met een spatel en hierna was de massa tot een zodanige mate vloeibaar gemaakt, dat roeren met een magneet met succes kon worden uitgevoerd. De totale reactietijd bedroeg 21 uren. Tijdens de reactie werd de osmolaliteit met een osmometer gemeten (Advances Digimatic 3DII van Advanced Instruments Inc.).

De resultaten in tabel Bc I laten het verloop van de reactie zien. Aan het einde van het experiment werden de mengsels bij 3000 x g gedurende 15 min. gecentrifugeerd. Een laag olie verscheen bovenop de bovenstaande lagen en het volume ervan werd bepaald. De bovenstaande laag werd met inbegrip van de olie met een pipet verwijderd. De olie werd gecombineerd met de doorzichtige waterfase door homogenisering en een monster werd onttrokken voor bepalingen van droge stof. De resultaten, die in tabel Bc I zijn vermeld, laten duidelijk zien, dat dit afvalprodukt door een enzymatische reactie vloeibaar kan worden gemaakt en dat onzuivere olie voortgebracht kan worden zoals vermeld in sectie A 4. Na winning van de olie kan de oplosbaar gemaakte remanentie op verschillende wijzen gebruikt worden, bijvoorbeeld voor het fermenteren tot waardevolle verbindingen of voor het concentreren en drogen en daarop volgend gebruik als voeder of voedselprodukt of na verdere zuivering voor het voortbrengen van waardevolle produkten.

Tabel Bc I Resultaten verkregen tijdens het vloeibaar maken van sojamelk en tofuslib.

Reactie-omstandigheden en resultaten	Experiment A				Experiment B			
	t min.	osmo- laliteit mOsm	Δ osmo- laliteit mOsm	t min.	osmo- laliteit mOsm	Δ osmo- laliteit mOsm		
gewicht residu		200 g			200 g			
gewicht SPS-ase (KRF-68)		0,20 g			1,20 g			
temperatuur		50°C			50°C			
pH		4,50			4,50			
reactietijd		21 uren			21 uren			
resultaten gemeten met de osmometer tijdens het verloop van de reactie Δ osmolaliteit is de waarde gecorrigeerd voor de osmo- laliteit van het mengsel bij t = 0	0	287	0	0	282	0		
	10	313	26	10	368	86		
	-	-	-	25	497	215		
	40	391	104	45	601	319		
	95	501	214	95	718	436		
	250	634	347	250	875	593		
	1260	907	620	1260	1145	863		
reactiemengsel: droge stof		20,3%			20,7%			
bovenstaande laag: droge stof		18,0%			19,4%			
bovenstaande laag: oliegehalte		8-10%			8-10%			
berekening % oplosbaar gemaakte droge stof		88,6%			93,5%			

8204924

Bc 2 Versuikering en gelijktijdige fermentatie.

Koolhydraat bevattende plantenmaterialen, bijvoorbeeld knollen zoals Jeruzalem artisjokken, aardappelen, bataten, cassave of pulp van dergelijke knollen, d.w.z. het materiaal dat achterblijft na verwijdering van de geëxtraheerde componenten, kan versuikerd worden door behandeling met een SPS-ase preparaat en gelijktijdig kunnen de gevormde fermenteerbare sacchariden tot ethanol gefermenteerd worden.

Voorbeeld Bc 2.1

De bereiding van ethanol door fermentatie van de ontlede inuline bevattende Jeruzalem artisjokken werd op laboratoriumschaal onderzocht door gelijktijdige versuikering met SPS-ase en inulinase en door vier verschillende voorbehandelingen van de Jeruzalem artisjokken.

SPS-ase:

Het SPS-ase preparaat KRF 68 werd gebruikt.

15 Inulinase:

De inulinase werd voortgebracht door fermentatie van Asp. ficuum (CBS 55.565). De inulinaseactiviteit wordt bepaald zoals beschreven in Research Disclosure No. 21234 (december 1981), blz. 456-458.

Laboratoriumfermentatie:

Hoeveelheden van 150 g van het voorbehandelde beslag (later beschreven) werden gefermenteerd na toevoeging van 4,5 g bakkersgist en 1 ml van een 4%'s oplossing van Pluronic als antischuimmiddel. De fermentatiekolven worden voorzien van CO₂ vallen, die 98%'s zwavelzuur bevatten en de fermentatie wordt gevolgd door meting van het gewichtsverlies tengevolge van vrijgemaakt CO₂. De inhoud van de kolven wordt tijdens de bij 30°C uitgevoerde fermentatie geroerd. Drie kolven werden voor elke onderzochte parameter gebruikt.

In tabel Bc II wordt het gewichtsverlies tengevolge van vrijmaking van CO₂ omgezet tot ethanol onder aanname dat 1 mol vrijgemaakt CO₂ equivalent is aan 1 mol C₂H₅OH, d.w.z.

$$1 \text{ g CO}_2 \sim \frac{46}{44} \text{ g C}_2\text{H}_5\text{OH}.$$

Voorbehandelingen van de artisjokken:

Behandeling A : 14 kg artisjokken (22,8% droge stof) werden volgens Henze gekookt bij 140°C en 400-500 kPa gedurende 20 min. Het gewicht na het koken was 19,0 kg (~16,9% droge stof). Fermentaties werden direct op het beslag uitgevoerd.

Behandeling B : Gewassen en gesneden artisjokken werden met water (1:1) gemengd en in een Waring menger gemengd. Het beslag werd vervolgens gedurende 1 uur bij 85°C bij

een pH van 4,5 behandeld.

Behandeling C : Zoals B, maar de pH werd niet ingesteld.

Behandeling D : Zoals B, maar geen warmtebehandeling en geen pH-regeling.

5 Resultaten:

In tabel Bc II laten de resultaten het effect zien van toevoeging van SPS-ase aan het voorbehandelde beslag op het ethanolrendement. Een aanzienlijke verbetering van het ethanol- rendement werd verkregen bij alle voorbehandelde beslagen, wanneer SPS-ase was toegevoegd.

Tabel Bc II Fermentatieresultaten in verband met de gelijktijdige fermentatie en enzymversuikering van Jeruzalem artijsjokken.

Voorbehandeling	Inulinase-eenheden toegevoegd aan 1 g droge stof	SPS-ase E/S %	CO ₂ verlies (g) na 42-44 uren fermentatie	% voortgebrachte ethanol in verband met droge stof
A	1,5	0	7,65 ± 0,05	31,5
	1,5	0,27	8,07 ± 0,08	33,2
B	1,5	0	4,85 ± 0,03	29,7
	1,5	0,40	5,41 ± 0,03	33,1
C	1,5	0	5,70 ± 0,05	34,8
	1,5	0,10	5,97 ± 0,01	36,5
	1,5	0,20	6,13 ± 0,06	37,5
	1,5	0,30	6,13 ± 0,00	37,5
	1,5	0,40	6,18 ± 0,05	37,8
D	1,5	0	5,77 ± 0,02	35,3
	1,5	0,10	5,89 ± 0,00	36,0
	1,5	0,20	6,04 ± 0,11	36,9
	1,5	0,30	6,01 ± 0,01	36,7
	1,5	0,40	6,02 ± 0,03	36,8
	0	0,40	5,48 ± 0,02	33,5

Bc 3 Ontleding van cellulose.

Gevonden werd, dat cellulose bevattende materialen zoals stro, bijvoorbeeld tarwestro, zaagsel, papier en lignocellulose, tot een grotere mate gehydrolyseerd kunnen worden met een SPS-ase preparaat dan met gebruikelijke cellulasen. Dit wordt door het volgende voorbeeld toegelicht, waarbij een kristallijn cellulosemateriaal (AVICEL) wordt behandeld door middel van een gebruikelijk cellulose Celluclast[®] 200 voortgebracht door Trichoderma reesei en het SPS-ase preparaat KRF 68.

Voorbeeld Bc 3.1

Avicel werd in water gesuspendeerd (20% droge stof); de pH werd op 5 ingesteld en de temperatuur werd op 50°C gehandhaafd. Na een reactietijd van 24 uren werd de suspensie gefiltreerd en werd het gehalte reducerende suiker (mg glucose/g AVICEL) gemeten. Onder toepassing van enzymdoseringen van 5% en 20% van het cellulosegehalte werden de volgende waarden gevonden:

Tabel 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 Toepassing als bakhulpmiddel.

Gevonden werd, dat SPS-ase preparaten uitstekend geschikt zijn als bakhulpmiddelen. Dus is het, wanneer een SPS-ase preparaat aan de droge meel voorafgaande aan het maken van het deeg, wordt toegevoegd, mogelijk een brood te verkrijgen met een betere kwaliteit met betrekking tot volume, kruim en smaak. Het is dus mogelijk een brood van hoge kwaliteit te verkrijgen met een lage kwaliteit tarwemeel, wanneer een SPS-ase preparaat als toevoegsel wordt gebruikt.

Bc 5 Verbetering van het alcoholrendement en het biomassarendement gedurende de fermentatie van sulfietafvalloog van de papierfabricage.

Eveneens werd gevonden, dat het ethanolrendement verbeterd kan worden, wanneer papiersulfietafvalloog behandeld wordt met een

SPS-ase preparaat voordat het gebruikt wordt als een koolhydraatbron voor fermentatie van ethanol. Ppaiersulfietafvalloog kan eveneens gebruikt worden voor de fabricage van biomassa, bijvoorbeeld enkelvoudige celproteïne, door fermentatie en ook in dit geval wordt het biomassa-
 5 rendement verbeterd, wanneer de sulfietafvalloog vooraf is behandeld met een SPS-ase preparaat. Ook kan gelijktijdig ontleding ten gevolge van de aanwezigheid van het SPS-ase preparaat en fermentatie worden uitgevoerd.

Bc 6 Ontwatering van biologische slibprodukten.

10 Gedurende de gebruikelijke extractie met water van vele biologische materialen uit plantengrondstoffen, worden grote volumina onoplosbaar residu, bestaande uit grote hoeveelheden gezwollen polysacchariden, gevormd. Dit is bijvoorbeeld het geval wanneer sojamelk, tofu of geïsoleerd sojaproduct wordt voortgebracht door extractie met water
 15 van sojabonen, ontvet sojameel of witte schilfers. Het structurele, gezwollen polysaccharidemateriaal kan vervolgens in een geringe mate met SPS-ase worden behandeld, waarbij de netwerkstructuur van het materiaal wordt geopend en slechts geringe hoeveelheden koolhydraten worden opgelost. Daarbij wordt het materiaal ontwaterd en dientengevolge wordt een
 20 groter gehalte droge stof in de slib verkregen in vergelijking met een product zonder de enzymatische behandeling. Derhalve vertoont het enzymproces het voordeel van een aanzienlijk lager energieverbruik voor verwijdering van water door drogen en opent eveneens de mogelijkheid voor de produktie van een goedkoper droog dierlijk voedermateriaal of
 25 massamiddel voor voedingstoepassingen.

Bc 7 Inkuilingshulpmiddel.

Het is bekend enzymatische inkuilingshulpmiddelen toe te voegen aan kuilvoeder teneinde de snelheid van het inkuilingsproces en de verteerbaarheid van het kuilvoeder te vergroten. Gevonden werd dat SPS-
 30 ase preparaten beter zijn in vergelijking tot de bekende enzymatische inkuilingshulpmiddelen.

Een overzicht van de figuren waarnaar reeds is verwezen, wordt hierna gegeven met het doel een beter bondig overzicht te verschaffen.

Fig. nr.	Behoort tot	Beschrijft
5	1	het algemene deel van de beschrijving
		het aantonen van het bindingseffect tussen SPS en sojaproteïne
10	2	het algemene deel van de beschrijving
		het stromingsdiagram, dat de bereiding van SPS beschrijft
15	3	sectie 2
		de ijkcurve voor HPLC gelfiltratiechromatografie
	4	sectie 2
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van SPS
20	5	sectie 2
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van SPS ontleed door SPS-ase
	6	secties 2 en 3
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van de bovenstaande laag uit SPS geïncubeerd met sojaproteïne
25	7	sectie 2
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van de bovenstaande laag uit ontleed SPS geïncubeerd met sojaproteïne
30	8	sectie 3
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van APS ontleed door pectolyase
	9	sectie 3
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van APS ontleed door SPS-ase
35	10	sectie 3
		het HPLC gelfiltratiechromatogram van SPS behandeld met pectolyase
40	11	sectie 7
		de immunoëlektroforetische pieken met inbegrip van een SPS-ase piek geïdentificeerd door een bedekkingstechniek

(vervolg)

5	12	sectie 8	het ionenuitwisselingschromatogram van een SPS-ase
	13	sectie 9	de pH-activiteit afhankelijkheid van een SPS-ase
10	14	sectie 9	de temperatuuractiviteit afhankelijkheid van een SPS-ase
	15	sectie 9	de temperatuurstabiliteit van een SPS-ase
15	16	sectie 10	de pH-stabiliteit van protease in een SPS-ase preparaat

C O N C L U S I E S

1. SPS-ase, een carbohydrase in een bruikbare vorm en in staat so-
ja SPS onder geschikte omstandigheden te ontleden tot ontledingsproduk-
5 ten, die zelf in een waterig milieu tot een mindere mate aan proteïne
hechten dan het soja SPS vòòr ontleding zelf aan hetzelfde proteïne on-
der overeenkomstige omstandigheden zou hechten.

2. SPS-ase volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het SPS-ase
in staat is soja SPS in een waterig milieu tot ontledingsprodukten te
10 ontleden, die zelf in het waterige milieu tot een mindere mate aan
plantaardige proteïne hechten dan het soja SPS vòòr ontleding zelf aan
hetzelfde plantaardige proteïne in het waterige milieu zou hechten.

3. SPS-ase volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het SPS-
ase in staat is soja SPS in een waterig milieu met een pH-waarde die
15 niet meer dan 1,5 van 4,5 afwijkt te ontleden tot ontledingsprodukten,
die zelf in het waterige milieu tot een mindere mate aan sojaproteïne
hechten dan het soja SPS vòòr ontleding zelf aan het sojaproteïne in
het waterige milieu zou hechten.

4. SPS-ase volgens conclusies 1 tot 3, met het kenmerk, dat de
20 ontledingsprodukten van soja SPS na volledige afbraak zelf aan het
plantaardige proteïne tot een mate van minder dan 50% hechten, in het
bijzonder minder dan 20%, dan het soja SPS vòòr de ontleding zelf aan
het plantaardige proteïne in het waterige milieu zou hechten.

5. SPS-ase volgens conclusies 1 tot 4, met het kenmerk, dat het
25 SPS-ase een positieve SPS-aseproef laat zien bij onderzoek volgens de
kwalitatieve en kwantitatieve SPS-ase bepalingsmethode.

6. SPS-ase volgens conclusies 1 tot 5, met het kenmerk, dat het
SPS-ase werd voortgebracht door middel van een microorganisme behorende
tot het genus Aspergillus, bij voorkeur behorende tot de Aspergillus
30 niger groep.

7. SPS-ase volgens conclusies 1 tot 6, met het kenmerk, dat het
SPS-ase afkomstig is van de enzymen, die produceerbaar zijn door middel
van Asp. aculeatus CBS 101.43.

8. SPS-ase volgens conclusies 1 tot 7, met het kenmerk, dat het
35 SPS-ase immunoelektroforetisch identiek is aan het SPS-ase dat produ-
ceerbaar is door middel Asp. aculeatus CBS 101.43 en identificeerbaar
door middel van de immunoelektroforetische bedekkingstechniek.

9. Geïsoleerd SPS, met het kenmerk, dat het geïsoleerde SPS is
voortgebracht op basis van plantaardig onzuiver proteïne als grondstof.

40 10. Geïsoleerd SPS volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat het

plantaardige onzuivere proteïne onvet sojameel is.

11. Werkwijze voor het selecteren van een SPS-ase producerend microorganisme voor de bereiding van het SPS-ase volgens conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat men het te onderzoeken microorganisme kweekt op een fermentatiemilieu, waarvan de voornaamste koolstofbron SPS volgens conclusie 9 of 10 is, waarna men een monster van het fermentatiemilieu analyseert op SPS-ase en het betreffende microorganisme selecteert als een SPS-ase producerend microorganisme, wanneer de analyse op SPS-ase positief is.

12. Werkwijze ter bereiding van SPS-ase volgens conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat men een stam, die volgens de selectiemethode van conclusie 11 selecteerbaar is, in een voedingsmilieu kweekt.

13. Werkwijze volgens conclusie 12, met het kenmerk, dat men de stam Asp. aculeatus CBS 101.43 of Asp. japonicus IFO 4408 in een voedingsmilieu kweekt.

14. Werkwijze volgens conclusie 12 of 13, met het kenmerk, dat men de kweekbehandeling uitvoert als een onderdompelingskweekbehandeling bij een pH in het traject van 3 tot 7, bij voorkeur van 4 tot 6, bij een temperatuur in het traject van 20 tot 40°C, bij voorkeur van 25 tot 35°C, waarbij het voedingsmilieu koolstof- en stikstofbronnen en anorganische zouten bevat.

15. Werkwijze volgens conclusies 12 tot 14, met het kenmerk, dat men een voedingsmilieu toepast, dat sojameel bevat.

16. Werkwijze volgens conclusie 15, met het kenmerk, dat men het sojameel met een proteolytisch enzym behandelt voorafgaande aan het gebruik ervan als een component van het substraat, bij voorkeur het proteolytische enzym, dat microbieel door Bacillus licheniformis wordt voortgebracht.

17. Werkwijze volgens conclusies 12 tot 16, met het kenmerk, dat men een steriele pectineoplossing aseptisch aan de fermentatievloei stof gedurende de kweekbehandeling toevoegt.

18. Werkwijze voor het ontleden van polysacchariden, bij voorkeur polysacchariden van celwanden van planten door middel van een carbohydraze, met het kenmerk, dat men een SPS-ase preparaat volgens conclusies 1 tot 8 in contact brengt met een substraat voor het SPS-ase preparaat, behalve voor de ontledingen die reeds in de Deense octrooiaanvraag 5691/81 zijn beschreven.

19. Werkwijze voor het ontleden van polysacchariden volgens conclusie 18, met het kenmerk, dat men de ontleding vergezeld doet gaan van het isoleren of de extractie van een biologisch materiaal anders dan

sojaproteïne en verwante plantaardige proteïnen met een onzuiver biologisch materiaal, waarbij het SPS-ase preparaat in hoofdzaak vrij is van enig enzym, dat in staat is het biologische materiaal af te doen breken.

5 20. Werkwijze voor het ontleden van polysacchariden volgens conclusie 18 of 19, met het kenmerk, dat men voorts een of meer van de reactieprodukten (waarbij het er niet toe doet of dit gewenste eindprodukten of afvalprodukten zijn) verder gelijktijdig met of na de enzymatische behandeling behandelt.

10 21. Werkwijze voor het ontleden van polysacchariden volgens conclusie 20, met het kenmerk, dat men als verdere behandeling een alcoholische fermentatie toepast in het geval dat een van de reactieprodukten een fermenteerbare suiker is.

fig. 1

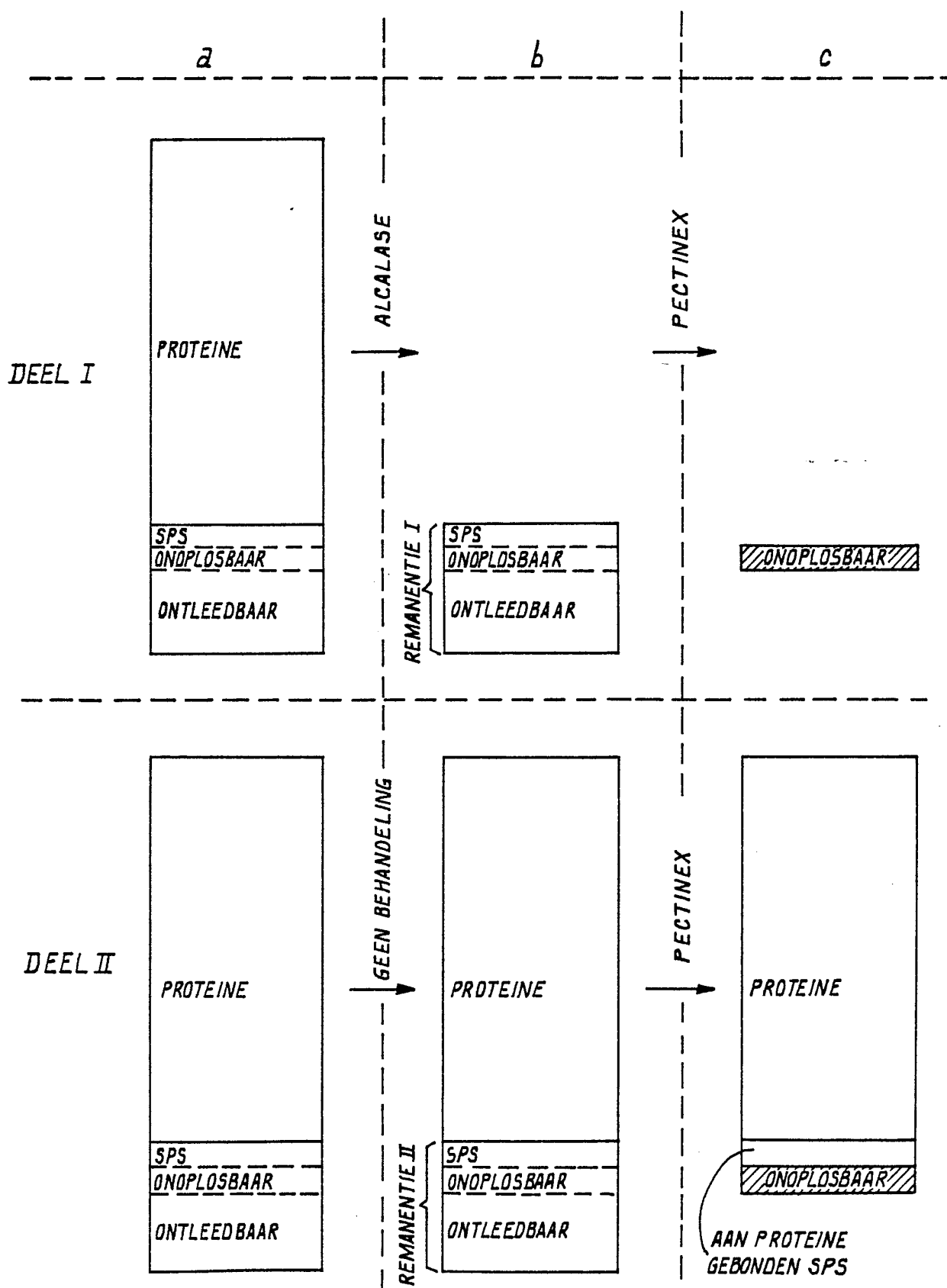


fig. 2

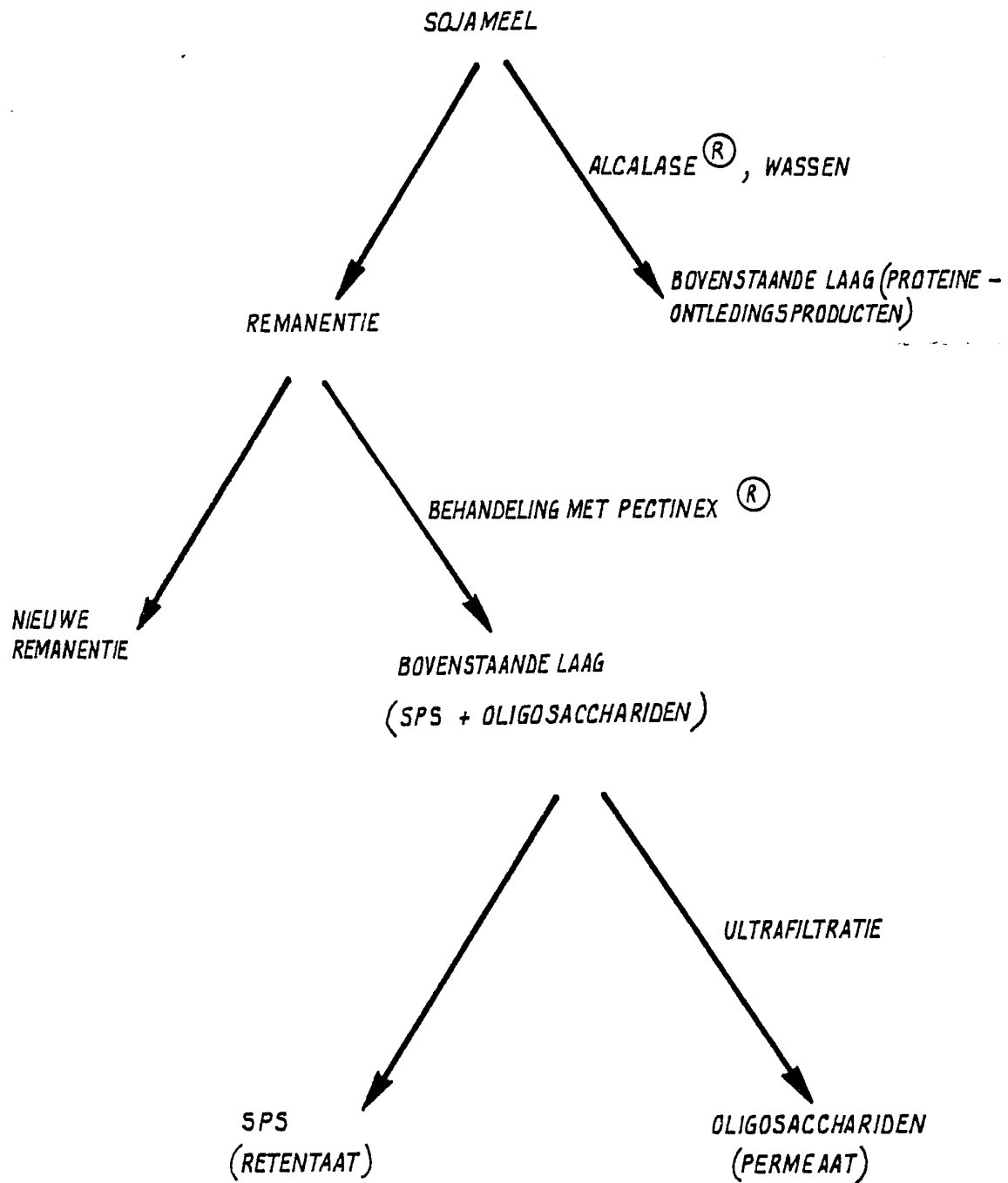
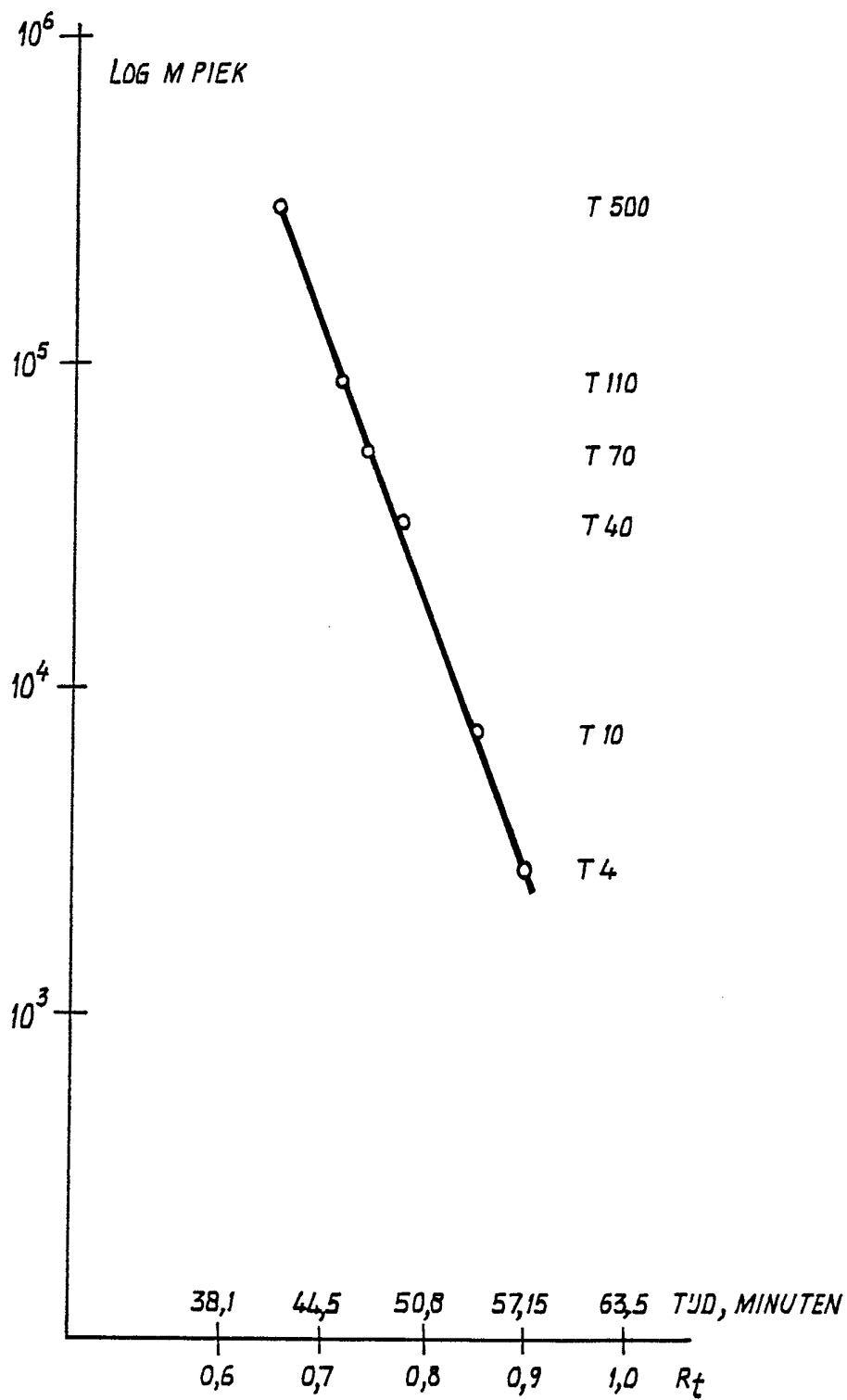


fig. 3



8204924

fig. 4



fig. 5

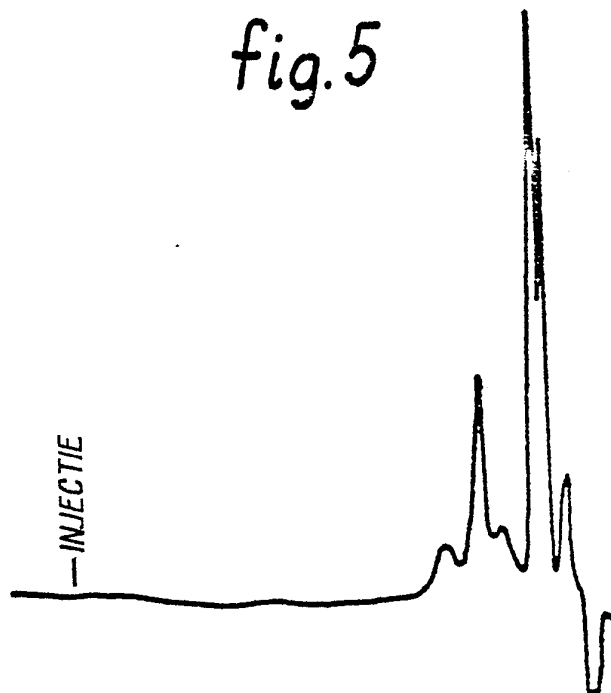


fig. 6

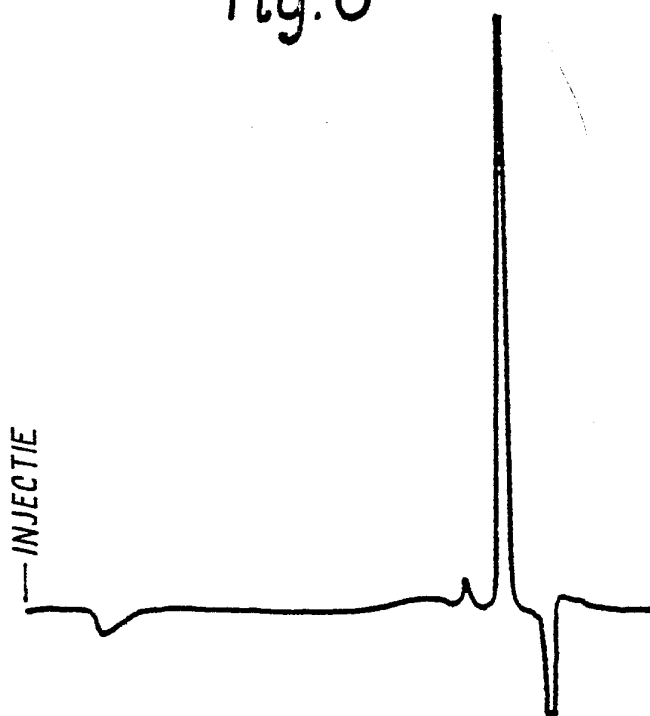


fig. 7

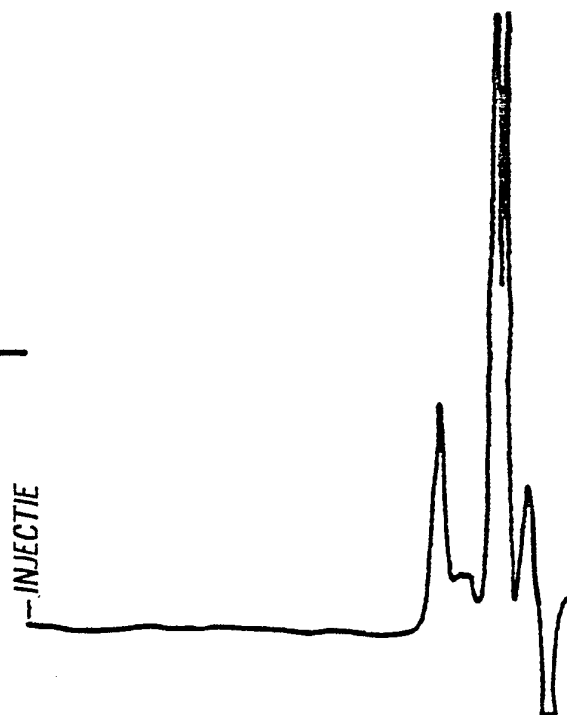


fig. 8

INJECTIE

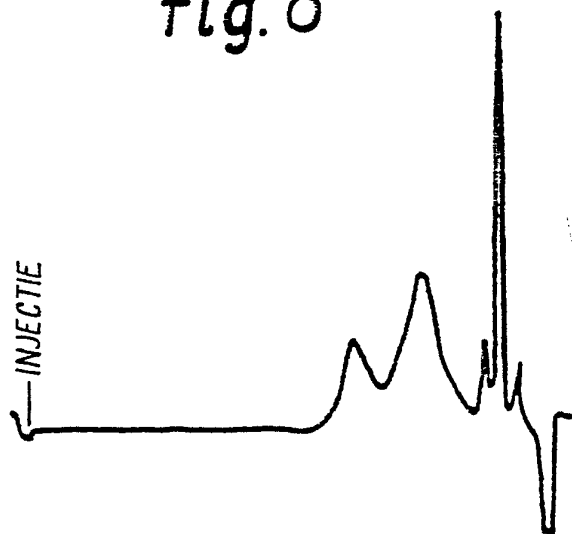


fig. 9

INJECTIE

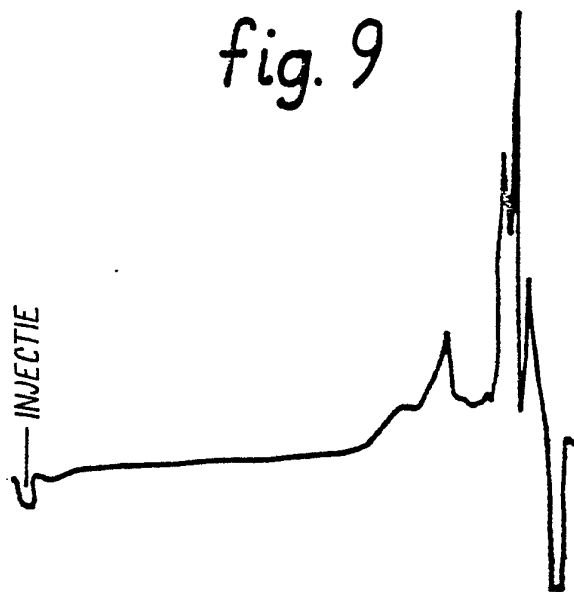


fig. 10

INJECTIE

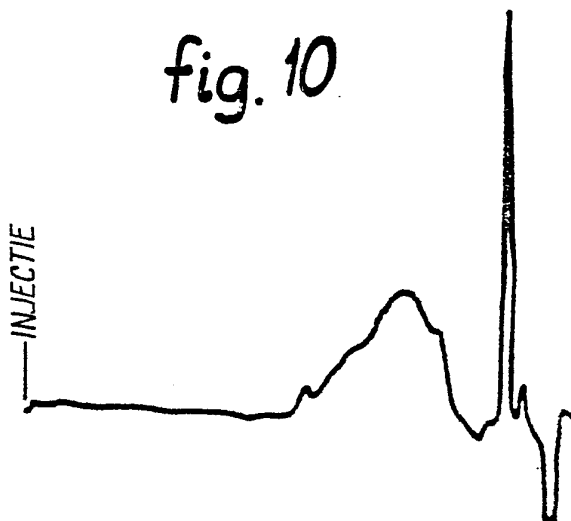
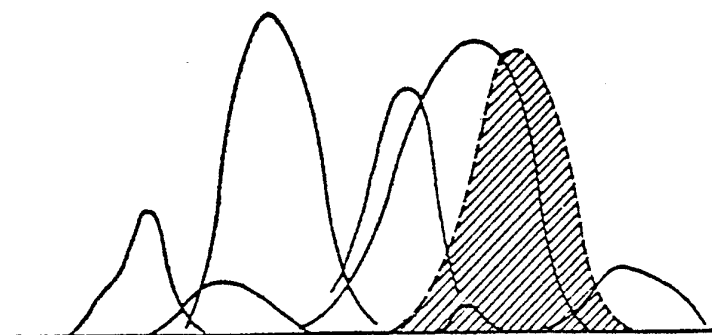


fig. 11



○

fig. 12

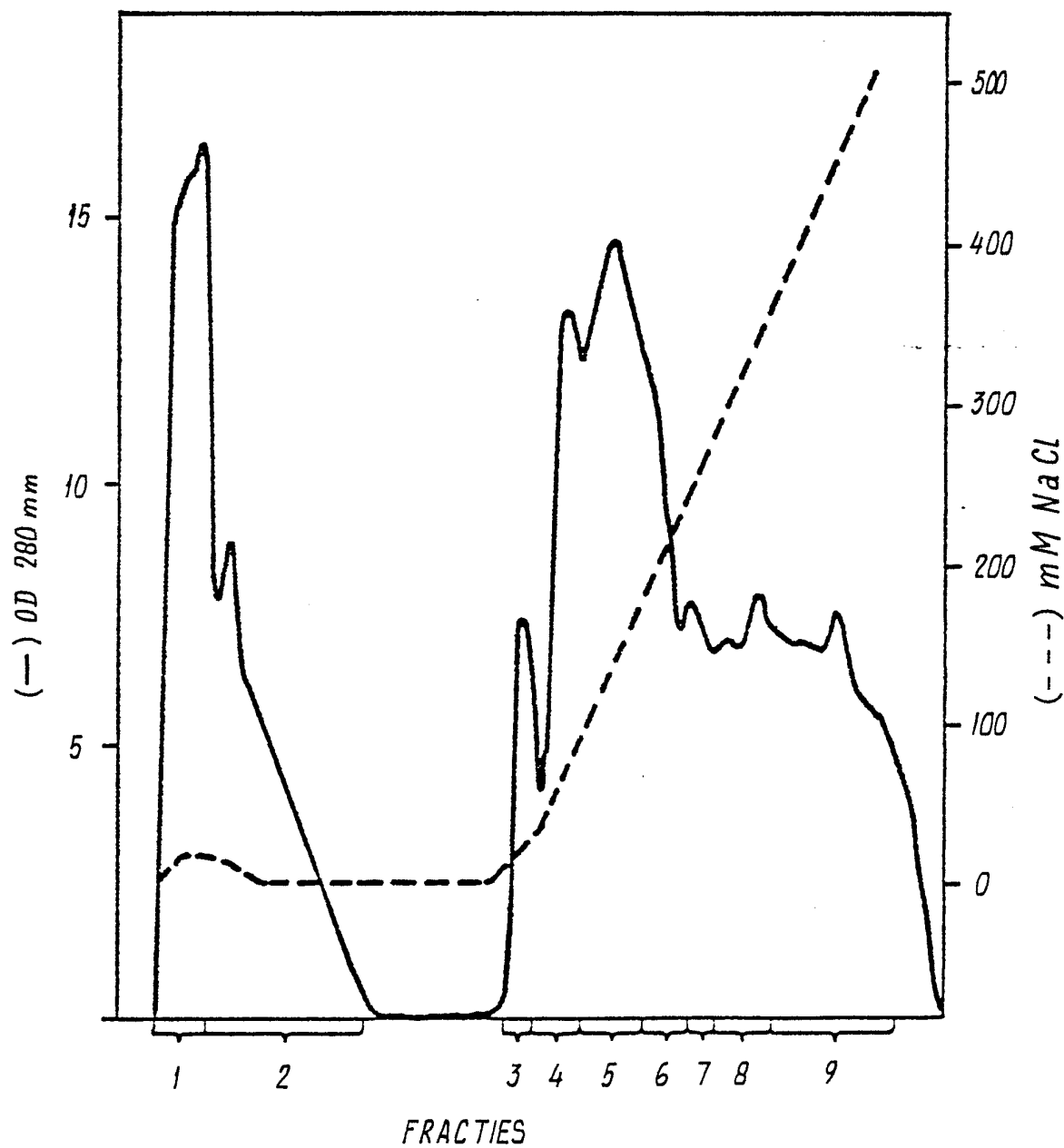


fig. 13

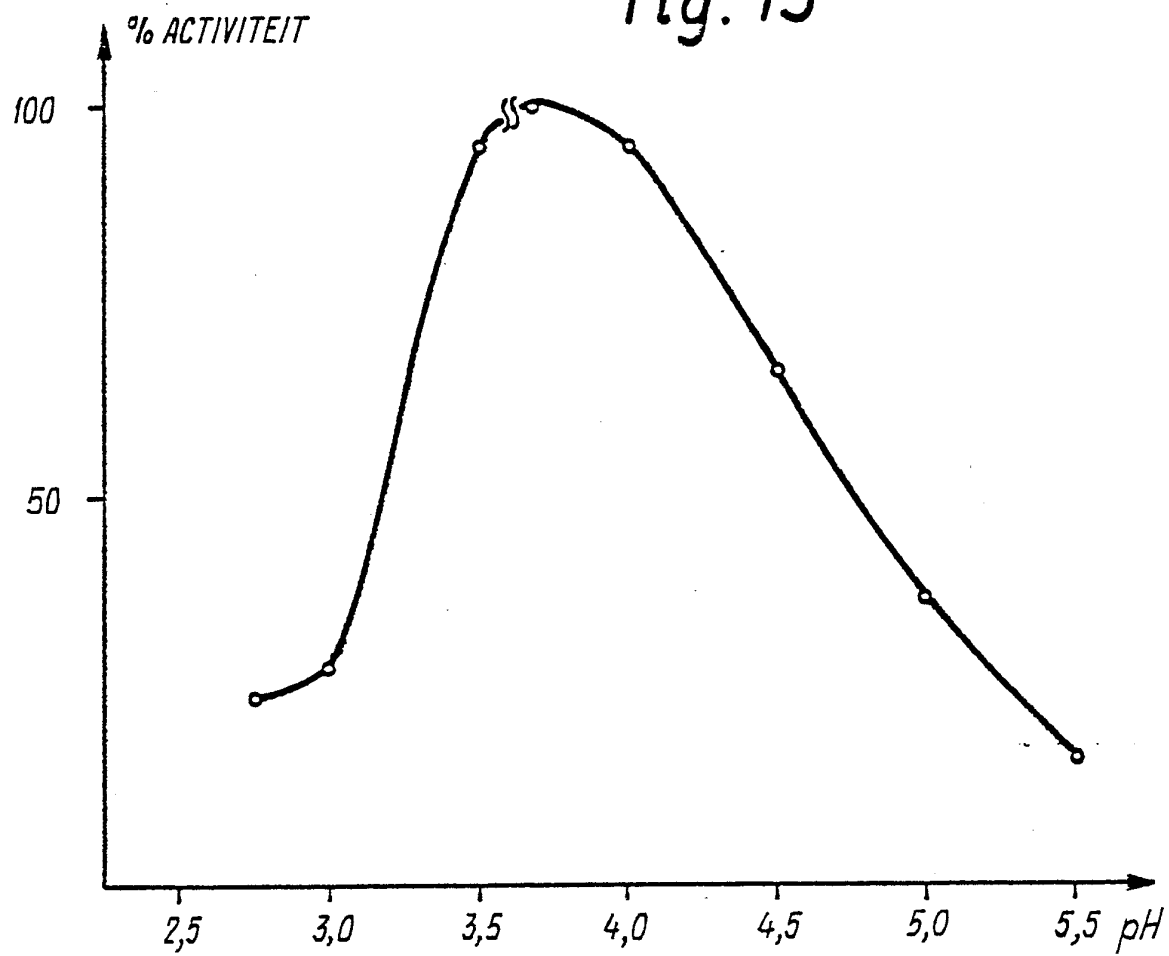


fig. 14

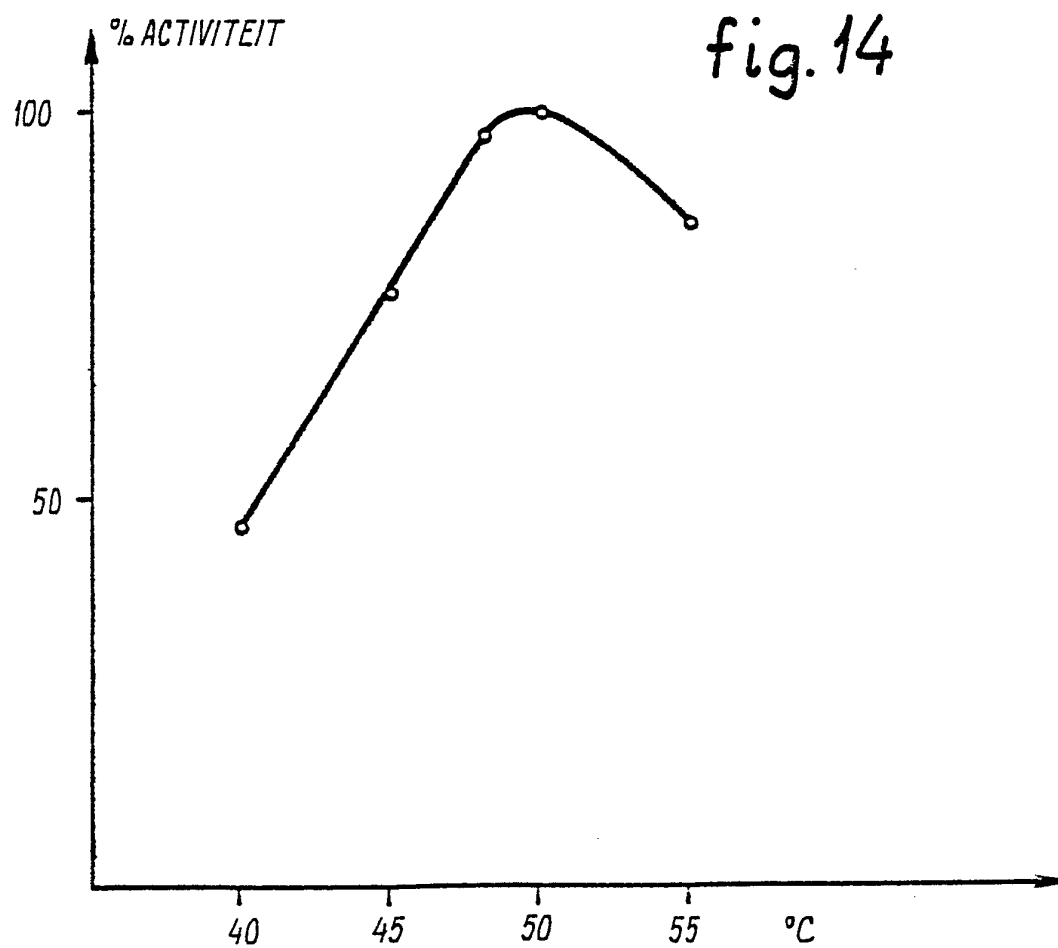


fig. 15

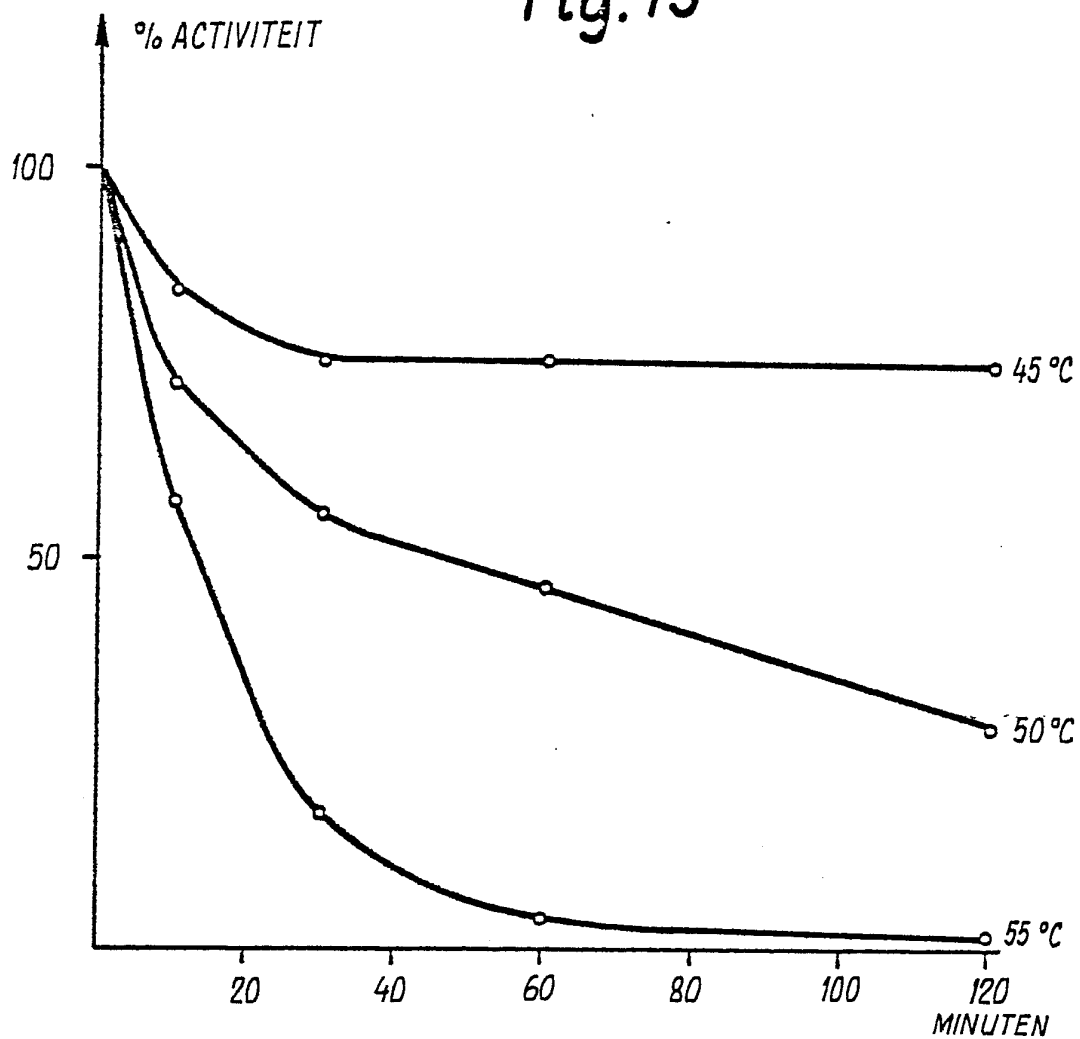
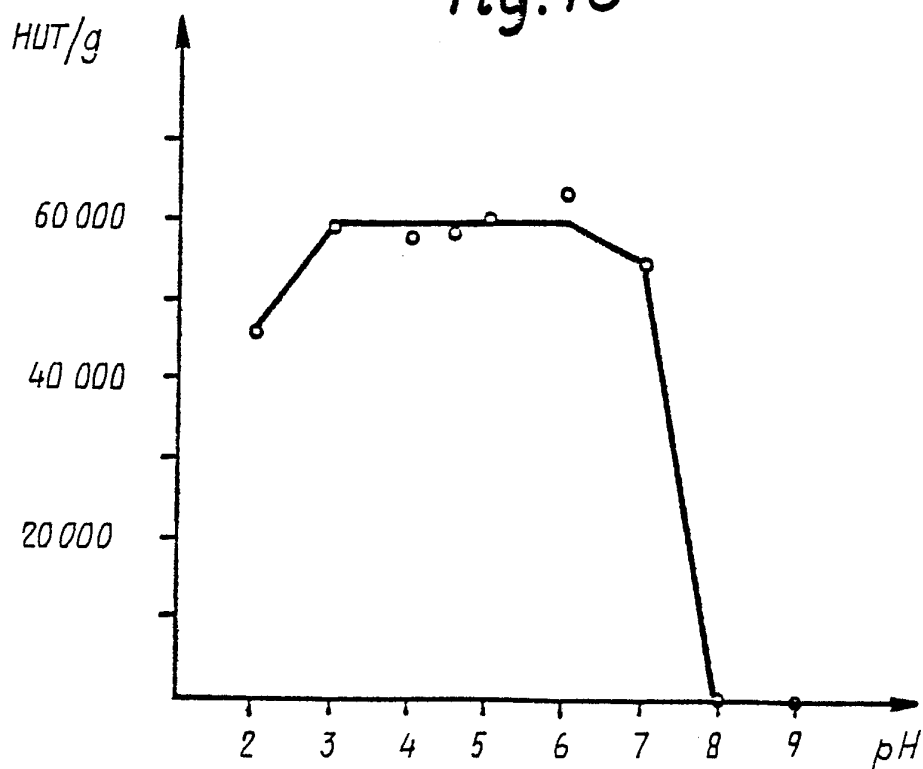


fig. 16



8204924