



F1000093859B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

93859

C (11) Patentti myönnetty
Patent meddelat 12 06 1995

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12P 19/14, 19/20, C 13K 1/08, C 08B 30/04

(21) Patentihakemus - Patentansökning	864898
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	01.12.86
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	01.12.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	04.06.87
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.02.95
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
03.12.85 EP 85202017 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Gist-Brocades S.A., Rue de Liège, 59121 Prouvy, France, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Ducroo, Paul, Rue Mermoz 6, 59133 Phalempin, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä glukoosisiirappien ja puhdistettujen tärkkelysten tuottamiseksi vehnän ja muiden viljakasvien pentosaaneja sisältävistä tärkkelyksistä
Förfarande för framställning av glukossiraper och renade stärkelser ur pentosaner innehållande stärkelser av vete och andra sädesväxter

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 24562 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB A 2150933 (C 12N 9/24), US A 2821501 (195-7),
Carbohydrate Research 118 (1983) 215-231, Glucose Syrups: Science and Technology
toim. Dziedzic, S. ja/och Kearsley, M. Lontoo, 1984, p. 211-212,
Technical Research Centre of Finland, Publications 47, Poutanen, K., Espoo 1988, p. 24

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Epäpuhtaasta vehnän tai muiden viljakasvien tärkkelyksestä saatujen glukoosisiirappien suodatettavuus paranee, kun niitä käsitellään Disporotrichum-ksylanaasilla. Myös tärkkelyksen erottuminen epäpuhtaan viljatärkkelyksen muista aineosista paranee lisättäessä ksylanaasia ennen tärkkelyksen erottamista.

Filtrerbarheten hos glukossiraper erhållna från oraffinerad stärkelse ur vete eller andra sädesväxter förbättras genom att behandla dessa med Disporotrichum-xylanase. Också avskiljningen av stärkelse från andra konstituenten i oraffinerad stärkelse ur sädesväxter förbättras vid tillsats av xylanase före stärcelsens avskiljning.

Menetelmä glukoosisiirappien ja puhdistettujen tärkkelysten tuottamiseksi vehnän ja muiden viljakasvien pentosaaneja sisältävistä tärkkelyksistä -

Förfarande för framställning av glukossiraper och renade stärkelser ur pentosaner innehållande stärkelser av vete och andra sädesväxter

Keksinnön kohteena on glukoosisiirappien valmistaminen puhdistamattomista vehnän ja muiden viljakasvien pentosaaneja sisältävistä tärkkelyksistä ja sellainten tärkkelysten erottaminen muista viljakasvien sisältämistä aineosista, kuten esimerkiksi gluteenista.

Selluloosa ja tärkkelys ovat tärkeimmät hiilihydraattien lähteet. Koska tärkkelys imeytyy ihmisen ruuansulatuskanavasta paljon helpommin kuin selluloosa, on sitä jo pitkään käytetty elintarvikkeena. Se on myös tärkeä teollisuuden raaka-aine.

Periaatteessa tärkkelys voidaan depolymeroida katalyyttisesti hapoilla, mutta tällöin depolymeraatio on melko epätäydellinen ja sivutuotteita muodostuu melko runsaasti. Siksi tärkkelyksen entsymaattinen hydrolysointi on ollut kasvavan mielenkiinnon kohteena.

Luonnon tärkkelys sisältää kahdenlaisia glukoosiyksiköistä koostuneita makromolekyylejä. Toinen molekyyli, nimeltään amyloosi, on suoraketjuinen ja sisältää yksinomaan alfa-1-4-sidoksella toisiinsa kiinnittyneitä glukoosiyksiköitä. Tärkkelys sisältää noin 25% amyloosia. Toinen molekyyli, amylopektiini, on runsaasti haaroittunut ja koostuu sekä alfa-1-4- että alfa-1-6-sidoksin toisiinsa kiinnittyneistä glukoosiyksiköistä.

Alfa-1-6-sidosten kokonaismäärä on tavallisesti alle 5 %.

Tärkkelyksen nykyaikaisessa hajottamisessa käytetään yleisesti kahta eri entsyymiä. Alfa-amylaasientsyymiä käytetään

tärkkelyksen nesteyttämiseen (tai ohentamiseen) dekstriineiksi, joilla keskimääräinen polymeroitumisaste on noin 7-10, ja amyloglukosidaasientsyymiä käytetään lopulliseen sokeroimiseen, jolloin aikaansaadaan korkean glukoosipitoisuuden (92-96 %) omaavaa siirappia.

Viljakasvit kuten vehnä ja ohra sisältävät liimamaisia yhdisteitä (kumeja), jotka lisäävät viskositeettia ja alentavat nestemäisten viljauutteiden, kuten juuri kuvatulla tavalla valmistetun glukoosisiirapin ja puhdistettujen tärkkelysten suodatettavuutta. Tällaiset kumit muodostuvat pääosin glukaaneista, mutta sisältävät myös joitakin pentosaaneja. Pentosaanien rakenne on huomattavasti monimutkaisempi kuin tavallisesti esitetty rakenne, joka koostuu pitkistä 1,4-beta-D-ksylopyranoosiketjuista, joissa on yksittäisiä 1,2- tai 1,3-alfa-L-arabinofuranoosi-sivuryhmiä (suhde: yksi arabinooosi kahta ksyloosiryhmää kohti); katso kuva 1. (H. Neukom, L. Providoli, H. Gremler ja P.A. Jui, *Cereal Chem.*, **44**, 238 (1967)).

Pentosaanien ominaisuudet vaihtelevat sen mukaan, onko peptidejä, feryylihappoa ja arabinogalaktaania läsnä vai ei. Noin 2/3 kokonaispentosaaneista on liukenemattomia korkean molekyylipainonsa ja proteiineihin ja muihin yhdisteisiin sitoutumisensa takia. Niillä on korkea vedensitomiskyky ja niistä jää kuohkeita (suuren tilavuuden omaavia) suodatusjäännöksiä. Kun liukenevien pentosaanien arabinofuranoosisivuryhmät hydrolysoidaan, niin havaitaan substituomattomien ksyloaanien yhteenkeräytyminen ja saostuminen.

Eri viljakasvien keskimääräinen pentosaanipitoisuus on seuraava (katso "Handbuch der Lebensmittelchemie", Vol. 5, s. 32, 1967, Springer Verlag):

<u>Viljakasvin jyvä</u>	<u>Pentosaaneja</u> (% kuivapainosta)
Ohra (kuoret mukaanlukien)	10,3
Vehnä	7,4
Ruis	10,6
Kaura (kuoret mukaanlukien)	7,5
Maissi	6,2
Riisi	2,0
Hirssi	2,0

Haluttaessa parantaa puhdistamattomasta vehnätärkkelyksestä saatujen glukoosisiirappien suodatettavuutta on kokeiltu siirapin käsittelyä ksylanaasilla. Ksylanaasi on entsyymi, joka hydrolysoi pentosaaneissa esiintyviä ksylaaneja.

Artikkelissa Starch 36, 135 (1984), on kuvattu sieniperäinen beta-glukanaasituote, jolla on pentosanaasiaktiivisuutta. Tätä entsyymiä on suositeltu käytettäväksi vehnätärkkelyso-
ollisuuden jätevesien käsittelyssä.

GB-patenttijulkaisussa n:o 2,150,933 kuvataan pentosanaasi, jota saadaan Talaromyces (s.o. Penicillium) emersonii'n fermentaatiossa. Tämän entsyymien on kuvattu kykenevän katalysoimaan ksylaanin degradaatiota ja olemaan hyödyksi mm. alennettaessa tärkkelyslietteiden viskositeettia, jotta tärkkelyksen talteenotto paranisi.

Tämän keksinnön mukaisesti tuotetaan epäpuhtaista, pentosaaneja sisältävistä viljatärkkelyksistä parannetun suodatettavuuden ja/tai alemman viskositeetin omaavia glukoosisiirappeja menetelmällä, jossa sanottu epäpuhtaus tärkkelys saataan alttiiksi Sporotrichum dimorphosporum- kannan ATCC 24562 tuottaman endoksylanaasin vaikutukselle pentosaanien hydrolysoimiseksi, ja hydrolysoidaan tärkkelyksen muuttamiseksi glukoosiksi.

Niin ollen glukoosisiirapin valmistamista puhdistamattomasta vehnätärkkelyksestä voidaan parantaa hydrolysoimalla tärkkelys entsyymiseoksella, joka sisältää alfa-amylaasin ja amyloglukosidaasin lisäksi myös Sporotrichum dimorphosporum-kannasta ATCC 24562 saatua endoksylyanaasia.

Ksylyanaasia voidaan siis myös käyttää eristettäessä tärkkelystä vehnä- ja muista jauhoista, jotka on saatu pentosaane- ja sisältävistä viljakasveista. Vehnän märkäjauhatuksessa erotetaan gluteeni muista aineosista (tärkkelysliete) mekaanisesti. Tärkkelysliete erottuu tiiviisti pakkautuneeksi alemmaksi kerrokseksi, joka sisältää puhdistetun tärkkelyksen, ja supernatantiksi, joka sisältää liimamaisia (mucilaginous) aineita. Tätä liimamaista fraktiota, joka sisältää pieniä tärkkelysjyväsiä, hemiselluloosaa ja proteiinia, kutsutaan kumivälikerrokseksi, jäännökseksi tai jätteeksi (squeegee, tailings, sludge). Hemiselluloosaosa sisältää ksyloosia (noin 60 %), arabinoosia (noin 38 %) ja glukoosia (noin 2 %).

Jatkuvatoimisen sentrifugin avulla voidaan tärkkelysliete jakaa puhtaammaksi konsentraatiksi eli "A"-tärkkelykseksi ja pienten jyvästen sekä paisuneiden jyvästen ja pentosaanikompleksien muodostamaksi epäpuhtaaksi eli "B"-tärkkelykseksi. Kun vehnätärkkelysliete käsitellään Sporotrichum dimorphosporum endoksylyanaasilla ennen jatkuvatoimista sentrifugoimista, lisääntyy "A"-laatuisen tärkkelyksen saanto pentosaanien hydrolyysin ja kumivälikerroksen alentuneen viskositeetin ansiosta.

Keksintö koskee siten myös menetelmää viljatärkkelyksen erottamiseksi viljan muista aineosista. Menetelmässä raaka viljatärkkelys saatetaan alttiiksi Sporotrichum dimorphosporum -kannan ATCC 24562 tuottaman endoksylyanaasin vaikutukselle ennen kuin tärkkelys erotetaan mekaaniseksi lietteen muista aineosista.

Tässä keksinnössä käytetty ksylanaasi on endoksylanaasi, joka on eristetty Basidiomycete Sporotrichumista ja erityisesti Sporotrichum dimorphosporumista, kuvattu Sporotrichum-suvun "systematiikan tarkistuksessa", J.A. Stalpers, *Studies in Mycology*, 24, 1 (1984).

Tässä keksinnössä ksylanaasivalmistetta, joka on saatu Sporotrichum dimorphosporumista, kanta ATCC 24562, saatavissa American Type Culture Collection'ista, kanta on identtinen kannan CBS 484.76 kanssa, joka on saatavissa Centraal Bureau voor Schimmelcultures-talletuslaitoksesta, Baarn, Alankomaat.

Kasvatettaessa alustalla, joka sisältää selluloosaa, pektiiniä, hiivauutteita ja erilaisia suoloja, tuottaa Sporotrichum dimorphosporum endoksylanaasia. Endoksylanaasi hydrolysoi pentosaaniketjujen 1,4-beta-ksyloosisidoksia. Tekniseltä kannalta katsottuna endo-tyyppinen entsyymi on yleisesti suositeltavampi, koska se hydrolysoi suurimolekyyliset polysakkaridit erittäin nopeasti. Ekso-tyyppinen entsyymi vaatii enemmän aikaa ja suuremman entsyymikonsentraation, jotta saavutettaisiin teknisesti sama tulos.

Rinnakkaisessa patenttihakemuksessamme n:o 864897, joka perustuu EPhakemukseen 85202016.3, kolmas joulukuuta 1985, on kuvattu menetelmä endoksylanaasiaktiivisuuden määrittämiseksi. Tämä hakemus liitetään tähän viitteeksi.

Sporotrichum-ksylanaasikonsentraatti, joka on sopiva tämän keksinnön mukaiseen käyttöön, saadaan seuraavalla tavalla. Fermentointi suoritetaan steriilissä tankissa ja kasvuliuksessa tunnetulla tavalla. Kasvuliuos sisältää selluloosaa, pektiiniä, hiivauutetta ja sopivia suoloja. Se ympätään Sporotrichum dimorphosporumin puhdasviljelmällä. Fermentointi suoritetaan vakiolämpötilassa välillä 20°C - 37°C, mieluiten 32°C:ssa, ja pH pidetään välillä 3,0 - 6,0, mieluiten

välillä 4,0 - 4,5. Fermentointi voi olla joko panos- tai jatkuvatoiminen fermentointi. Ksylaasiaktiivisuutta seurataan prosessin aikana. Entsyymien tuottoa ei tarvitse välttämättä indusoida lisäämällä ksylaaneja sisältäviä aineita (esim. maissinjyviä tai maissijauhoja), ja sellaisten aineiden lisääminen yleensä aiheuttaa eksoksylanaasin tuottoa, mikä on keksinnön kannalta vähemmän hyödyllistä. Kun tarvittava entsyymiaktiivisuus on saavutettu, massa kerätään ja konsentroidaan vakuuissa tai ultrasuodatuksella. Konsentraatti voidaan myydä joko nestepreparaattina tai spraykuivattuna jauheena. Endoksylanaasi hydrolysoi pentosaaniketjujen 1,4-beta-ksyloosisidoksia.

Puhdistamattoman entsyymituotteen ominaisuuksia on tutkittu viskosimetrisesti substraatilla, joka sisältää \pm 1% ksylaaneja (katso liitteenä olevia kuvia 2 ja 3). Optimi-pH on 4,7, mutta pH-välillä 3,0 - 6,0 on suhteellinen aktiivisuus yli 50%. Optimilämpötila on 55°C, mutta vielä 65°C:ssa yli puolet suhteellisesta aktiivisuudesta on jäljellä. Tämän Sporotrichum-ksylaasin puhdistamista ovat tutkineet Comtat et al. (J. Comtat, K. Ruel, J.-P. Joseleau ja F. Barnoud, Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, SITRA, Helsinki, Suomi, 351 (1975); J. Comtat ja J.-P. Joseleau, Carbohydr. Res., 95 101 (1981)):

Kun tutkittiin endo- ja eksoksylanaasiaktiivisuutta omaavien entsyymien vaikutusta puhdistamattomasta vehnätärkkelyksestä saatujen glukoosisiirappien suodatettavuuteen, havaittiin, että Sumizym AC (Aspergillus niger-selluloosa, Shin Nihon), Drum pektinaasi (Aspergillus niger-drum pektinaasi, Gist-Brocades) ja Sporotrichum-ksylaasi olivat erittäin aktiivisia. Tulokset, jotka saatiin Sumizym AC:llä, ovat suuresti riippuvaisia entsyymien konsentraatiosta, mutta tulokset, jotka saatiin Sporotrichum-ksylaasilla, eivät ole. Näyttää siltä, että Sumizym AC vaikuttaa ekso-entsyymaattisesti ja Sporotrichum vaikuttaa vain endo-entsyymaattisesti.

Sporotrichum-ksylanaasin kokonaisvaikutus saavutetaan ilmeisesti alhaisella pitoisuudella. Drum-pektinaasilla ja Sumizym AC:llä on lähes sama teho, mutta Drum-pektinaasi antaa suuremman glukoosisaannon.

Sporotrichum-endoksyylanaasi ja Penicillium emersonii-endoksyylanaasia verrattiin lisäämällä samat määrät eksoksyylanaasia Aspergillus niger-valmisteista. P. emersonii-ksylanaasi - eksoksyylanaasi-seoksilla oli pienempi teho kuin Sporotrichumksylanaasi - eksoksyylanaasi-seoksilla.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä.

Esimerkki I

Vakiomenetelmä B-tyyppin vehnätärkkelyksen nesteyttämiseen, sokeroimiseen ja suodattamiseen.

Substraattina käytettiin B-tyyppin tärkkelystä, Roquette Freres, viite LAB 833, jonka proteiinipitoisuus oli 1,2 - 1,5 % ja pentosaanipitoisuus 3 - 4 %.

A. Nesteyttämismenetelmä

Vehnätärkkelys nesteytettiin, 30 % k.a. (kuiva-ainetta), lähdevedessä (160 ppm Ca⁺⁺) nesteyttämislaitteessa (pilot plant) seuraavan menetelmän mukaisesti:

6 minuuttia 105-106°C:ssa

2 tuntia 95°C:ssa

Maxamyl'iä, lämpökestävää Bacillus licheniformis-alfa-amylaasia, Gist-Brocades, käytettiin 6 yksikköä k.a.-grammaa kohti. pH säädettiin 6,4:ksi NaOH:lla. Nesteyttämistä ei ollut mahdollista suorittaa korkeammassa kuiva-ainepitoisuudessa, koska liete oli erittäin viskoosia.

B. Sokerointimenetelmä

Nesteytetyn tärkkelyksen pH säädettiin 4,2:ksi. Ensimmäisissä kokeissa käytettiin 25000 AGI Amigase GM (Aspergillus niger amyloglukosidaasi, Gist-Brocades) k.a.-kiloa kohti. Tätä ylimääräistä annosta käytettiin, koska haluttiin estää tärkkelyksen uudelleengranuloitumisen (retrogradation) vaikutus suodatustesteihin. Tätä seuranneet kokeet suoritettiin normaalilla 17500 AGI/kg k.a.

Suodatusentsyymit on lisätty Amigase:n kanssa sokeroimisen alussa.

Reaktiota jatkettiin kolmen päivän ajan 60°C:ssa, jonka jälkeen suodatettavuus testattiin.

C. Suodatettavuustestit ja analyysit

Testeissä käytettiin Seitz-laboratoriosuodatinta 60°C:ssa vesikierrolla. Suodatin oli varustettu kangassuotimella ja lisäksi käytettiin Dicalite 4258 S2 (Kieselguhr). Esipäälylystys suoritettiin 15 g:lla Dicalite S2:ta dispergoituna 150 ml:aan glukoosisiirappia, 30 %:n k.a.:ssa. Sokeroitu tärkkelys suodatettiin 1 barin paineessa ja suodoksen tilavuus/aikayksikkö mitattiin. Suodatettavuuskerroin saatiin kaavasta:

$$\frac{\text{suodoksen til. 15 min kul.} - \text{suodoksen til. 1 min kul.}}$$

14

= suodoksen tilavuus/min.

Suodatuksen jälkeen mitattiin viskositeetti kapillaariviskosimetrillä 20°C:ssa ja sokerit määritettiin nestekromatografisesti.

Esimerkki IINesteytetyn vehnätärkkelyksen suodatettavuuden parantaminen
Sporotrichum-ksylanaasin avulla

2 - 3 % pentosaaneja sisältävän B-tyypin vehnätärkkelyksen nesteyttämiseen käytettiin maissitärkkelyssiirapille käytettyä tavanomaista menetelmää ensiksi nesteyttämällä kiinteä tärkkelys alfa-amylaasilla ja toiseksi sokeroimalla saatu nesteytetty tärkkelys amyloglukosidaasilla. Näin saatiin korkean glukoosipitoisuuden omaava siirappi. Sporotrichum-ksylanaasia käytettiin sokeroimisvaiheessa amyloglukosidaasin lisäksi.

Kolmen päivän ajan 60°C:ssa ja pH 4,2 - 4,5:ssä tapahtuneen inkuboinnin jälkeen suoritettiin suodatettavuustestit normaalilla menetelmällä. Tulokset, jotka ovat taulukossa 4, osoittavat, että Sporotrichum-ksylanaasin lisäys alentaa siirapin viskositeettia ja siten parantaa suodatettavuutta.

Esimerkki IIISporotrichum-ksylanaasin ja Sumizym AC:n vaikutus nesteytetyn B-tyypin vehnätärkkelyksen suodatettavuuteen

Olosuhteet samat kuin Esimerkissä I, 25000 AGI/kg k.a.

entsyymi	annostus %:ina k.a.:sta	suodoksen tilavuus/ min.
Nollakoe (vain AG)	-	7,8 ml
<u>Sporotrichum- ksylanaasi</u>		
laimennettu 500 µ/g	0,05	15,6 ml
" "	0,1	15,2 ml
" "	0,2	16,3 ml
Sumizym AC	0,005	15,3 ml
" "	0,01	18,3 ml
" "	0,02	21,8 ml
" "	0,05	24,5 ml

Tulokset, jotka on saatu Sumizym AC:llä, riippuvat entsyymin konsentraatiosta, mutta tulokset, jotka on saatu Sporotrichum-ksylanaasilla, eivät ole riippuvaisia entsyymin konsentraatiosta.

Esimerkki IV:

Sporotrichum-ksylanaasin ja Sumizym AC:n tai Drum-pektinaasin seosten vaikutus nesteytetyn B-tyypin vehnätärkkelyksen suodatettavuuteen

Olosuhteet kuten esimerkissä I, 25000 AGI/kg k.a.

ensimmäinen entsyymi	annostus % :ina k.a.:sta	toinen entsyymi	annostus %:ina k.a.:sta	suodoksen tilavuus / min
nollakoe	-	-	-	7,5 ml
<u>Sporotrichum-ksylanaasi</u> laimennettu				
500 µ/g	0,005	-	-	12,9 ml
	0,01	-	-	14,0 ml
	0,02	-	-	14,8 ml
	0,05	-	-	15,5 ml
	0,05	Sumizym AC	0,005	18,5 ml
	"	"	0,01	21,0 ml
	"	"	0,02	20,8 ml
	"	Drum-pekti-naasi	0,005	17,8 ml
	"	"	0,01	20,5 ml
	"	"	0,02	21,4 ml

Sporotrichum-ksylanaasin kokonaisteho saadaan matalalla pitoisuudella. Kun tämän endoksylanaasin kanssa käytetään eksoksylanaaseja, Drum-pektinaasia ja Sumizym AC:tä, on niillä suunnilleen sama teho, mutta Drum-pektinaasi antaa suuremman glukoosin reversion.

Esimerkki VSporotrichum-ksylanaasin ja Sumizym AC:n tai Drum-pektinaasin seosten vaikutus nesteytetyn B-tyyppin vehnätärkkelyksen suodatettavuuteen ja glukoosin saantoon

Olosuhteet kuten esimerkissä I, 25000 AGI/kg k.a.

ensimmäinen entsyymi	annostus %:ina k.a.:sta	toinen entsyymi	annostus %:ina k.a.:sta	suodoksen tilavuus/min (ml)	viskositeetti (mPa/s)	glukoosisaanto (%)
nollakoe (+ AG)	-	-	-	6,40	6,8	-
Sporotrichum-ksylanaasi laimennettu						
500 µ/g	0,01	-	-	11,20	4,45	-
"	"	Drum-p.	0,005	14,80	3,71	91,49
"	"	"	0,0075	15,20	3,72	90,67
"	"	"	0,01	16,4	3,71	90,40
"	"	"	0,0125	16,8	3,69	90,02
"	"	Sumizym AC	0,01	17,5	3,59	91,96

Tämä koe vahvistaa Drum-pektinaasin korkean reversiovaikutuksen glukoosisaantoon. Koe Sumizym AC:n kanssa on tehty vertailun vuoksi.

Esimerkki VI

Sporotrichum-ksylanaasin ja Penicillium emersonii-beta-glukanaasin aktiivisuudet käytettäessä samaa eksoksylanaasin aktiivisuuden lisäystä

Olosuhteet kuten esimerkissä I, 17500 AGI/kg k.a.

ensimmäinen entsyymi	annostus %:ina k.a.:sta	toinen entsyymi	annostus %:ina k.a.:sta	suodoksen tilavuus/min (ml)	viskositeetti (mPa/s)	glukoosisaanto (%)
nollakoe (+ AG)	-	-	-	3,5	6,83	93,13
<u>Sporotrichum-ksylanaasi</u> laimennettu 500 µ/g	0.01	-	-	9,9	4,40	92,17
	"	Drum p.	0,005	15,2	4,22	90,97
	"	Sumizym AC	0,0035	15,4	4,12	91,58
<u>P.emersonii</u> beta-glukanaasi	0,02	-	-	9,0	4,67	92,28
	"	Drum p.	0,005	11,7	4,35	90,96
	"	Sumizym AC	0,0035	11,8	4,22	91,74

Nämä kokeet osoittavat, että P. emersonii-beta-glukanaasi endo-ksylanaasi - ekso-ksylanaasi-seoksilla on pienempi yhteisvaikutus kuin Sporotrichum-ksylanaasi - eksoksylanaasi-seoksilla.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä parantuneen suodatettavuuden ja/tai alentuneen viskositeetin omaavan glukoosisiirapin valmistamiseksi viljakasvien epäpuhtaasta pentosaaneja sisältävästä tärkkelyksestä, tunnettu siitä, että mainittu epäpuhdas tärkkelys saatetaan alttiiksi *Sporotrichum dimorphosporum* -kannan ATCC 24562 tuottaman endoksyylanaasin vaikutukselle pentoosaanien hydrolysoimiseksi, ja hydrolysoidaan tärkkelyksen muuttamiseksi glukoosiksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että glukoosisiirappi valmistetaan saattamalla epäpuhdas vehnätärkkelys alttiiksi alfa-amylaasin ja amyloglucosidaasin, ja mainitun endoksyylanaasin vaikutukselle.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että endoksyylanaasia käytetään seoksena *Aspergillus niger* -eksoksyylanaasin kanssa.

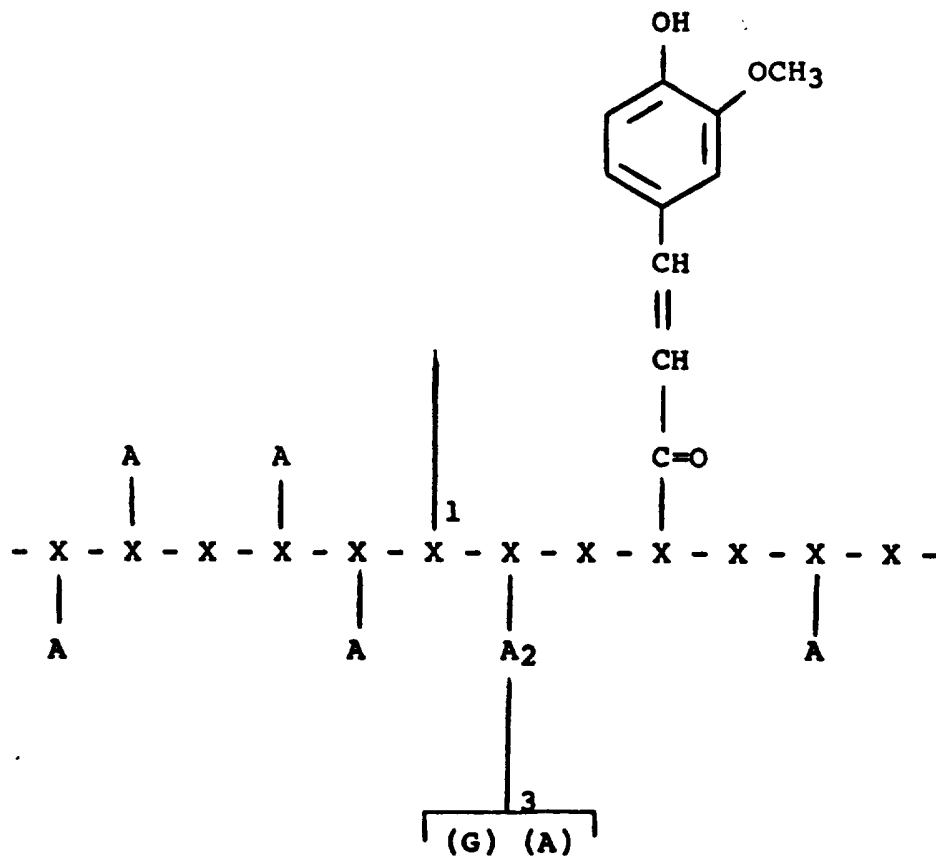
4. Menetelmä viljatärkkelyksen erottamiseksi viljan muista aineosista, tunnettu siitä, että raaka viljatärkkelys saatetaan alttiiksi *Sporotrichum dimorphosporum* -kannan ATCC 24562 tuottaman endoksyylanaasin vaikutukselle ennen kuin tärkkelys erotetaan mekaanisesti lietteen muista aineosista.

:.

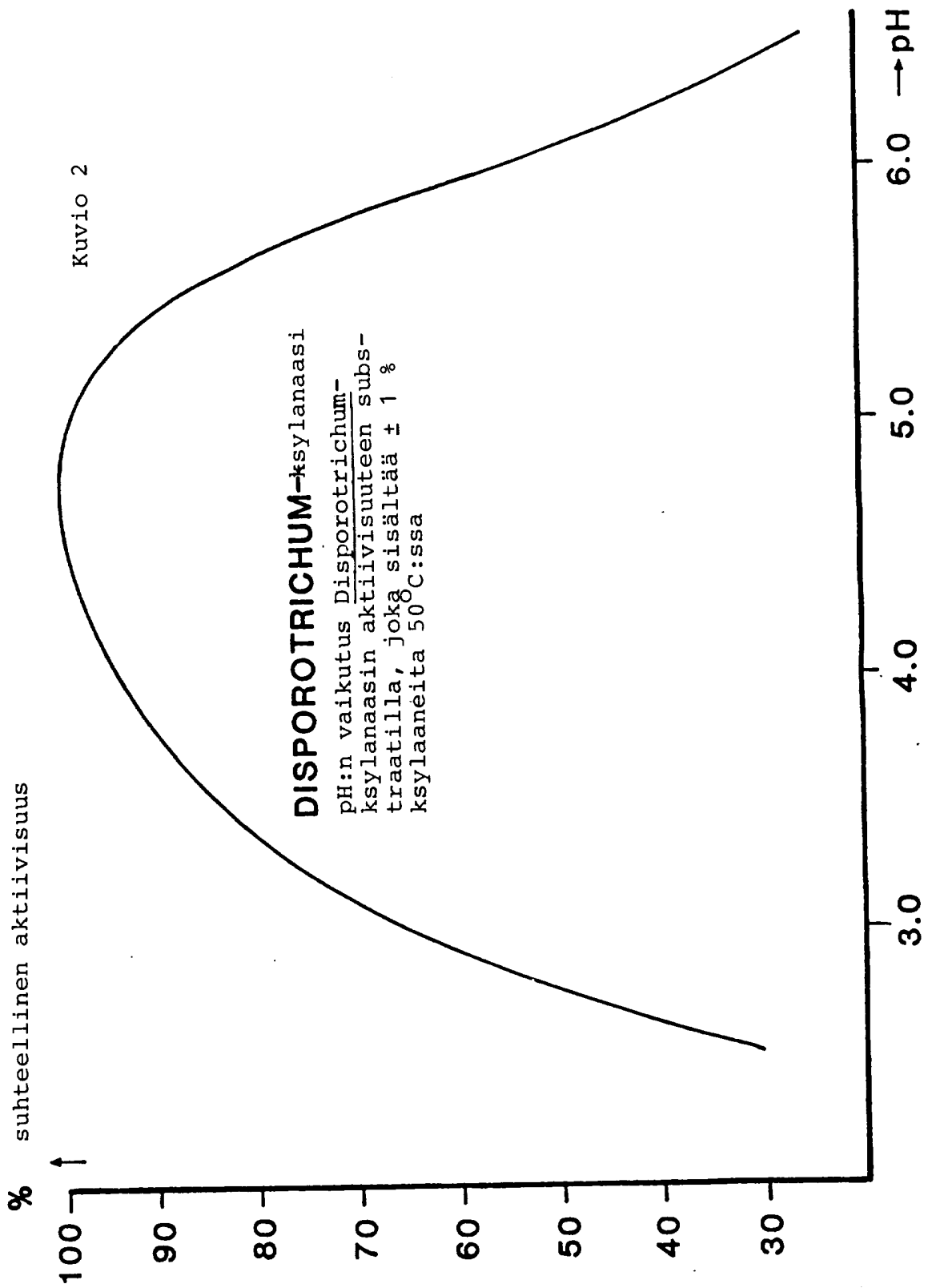
.

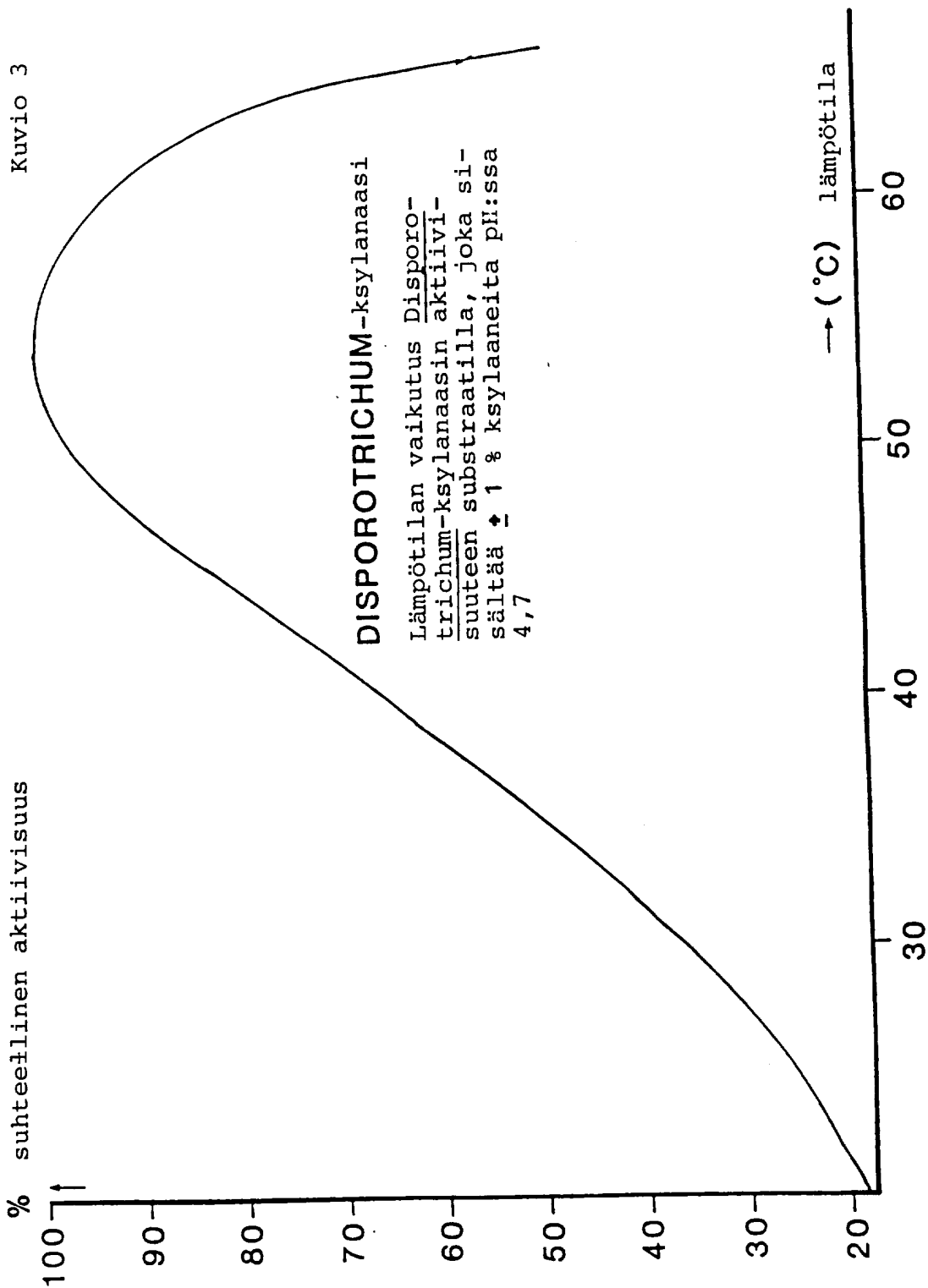
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av glukossirap, som har bättre filtrerbarhet och/eller nedsatt viskositet, ur pentosaner innehållande oren stärkelse av sädesväxter, **kännetecknat** därav, att den nämnda orena stärkelsen utsättes för endoxylanas producerad av *Sporotrichum dimorphosporum* -stammen ATCC 24562 för att hydrolysera pentosanerna, och hydrolyseras för att omvandla stärkelsen till glukos.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att glukossirapen framställs genom att utsätta oren vete-stärkelse för alfa-amylas och amyloglukosidas, och för det nämnda endoxylanaset.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknat** därav, att endoxylanas används som blandning med *Aspergillus niger* exoxylanas.
4. Förfarande för separering av sädesstärkelse från andra beståndsdelar av spannmål, **kännetecknat** därav, att rå sädesstärkelse utsättes för endoxylanas producerad av *Sporotrichum dimorphosporum* -stammen ATCC 24562 före separering av stärkelsen mekaniskt från andra beståndsdelar av slammet.

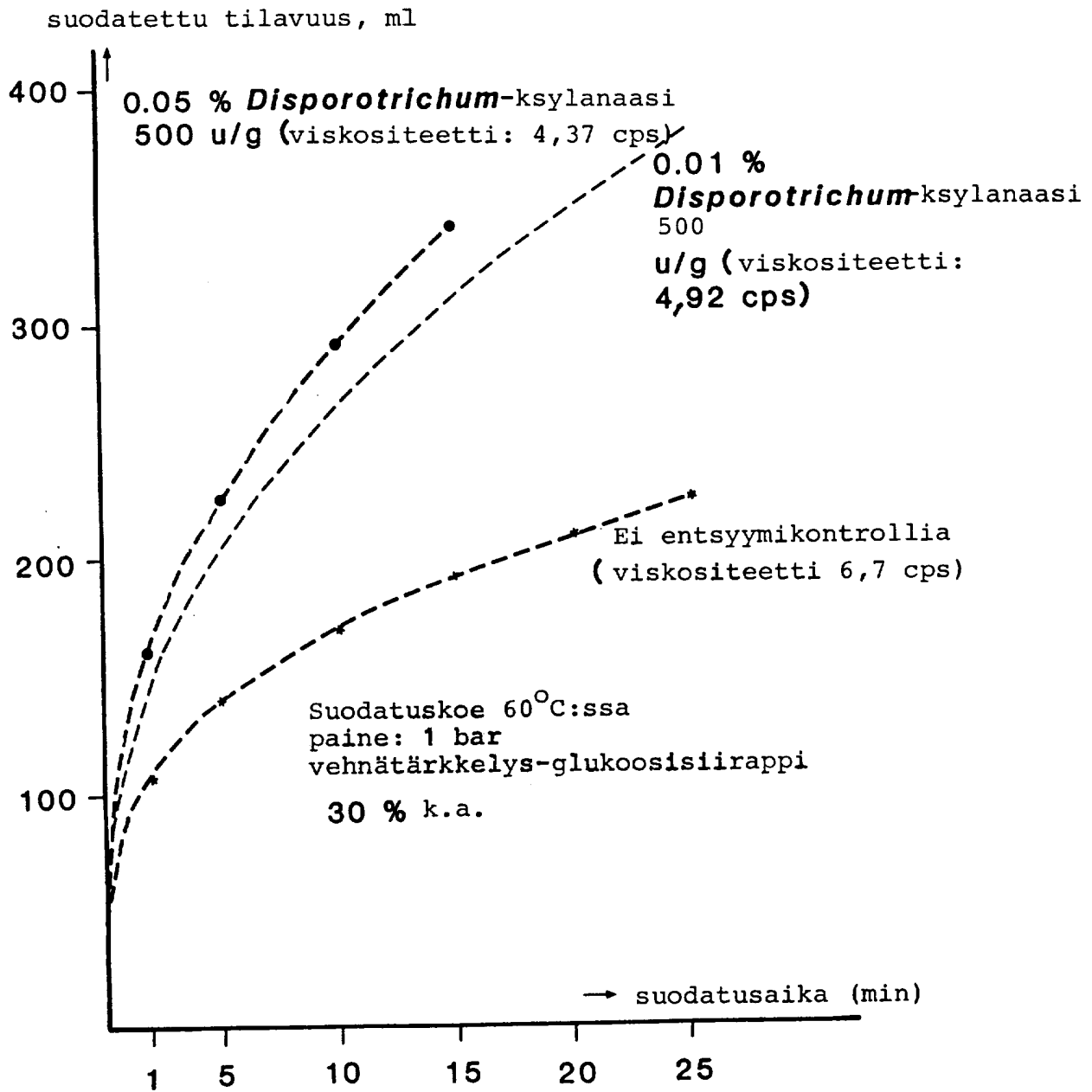


Vehnäjauhoista peräisin olevan "glykoproteiini 2:n" hypoteettinen rakenne, ehdottanut H. Neukom et al., *Cereal Chem.* **44**, 238 (1967). Pystysuora viiva numeron 1 vieressä tarkoittaa polypeptidiketjua; X = beta-D-ksylopyranoosiyksiköitä; A = alfa-L-arabinofuranoosiyksiköitä; G = galaktoosiyksiköitä; 1, 2, 3 = mahdollisia sidoksia hiilihydraattien ja proteiinin välillä. 3-asemassa olevan sidoksen osoitettiin myöhemmin esiintyvän galaktoosin ja hydroksiproliin välillä, G.B. Fincher, W.H. Sawyer ja B.A. Stone, *Biochem J.*, **139**, 535 (1974).





Kuvio 4



4/4