

NORGE

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 128818



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

(51) Int. Cl. C 07 c 49/18

(52) Kl. 12 o-5/04

(21) Patentsøknad nr. 2903/70

(22) Inngitt 24.7.1970

(23) Løpedag 24.7.1970

(41) Søknaden alment tilgjengelig fra 28.1.1971

(44) Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 14.1.1974

(30) Prioritet begjært fra: 27.7.1969 Japan,
nr. 59262/69 og
59263/69

(71)(73) HAYASHIBARA COMPANY,
2-3, 1-chome, Shimoishii,
Okayama-shi, Okayama, Japan.

(72) Shuzo Sakai, 305, Suzaki,
Toshio Miyake, 1-16, 3-chome, Hokan-cho og
Yoshinori Sato, 16-1, 2-chome, Sumiyoshi,
alle: Okayama-shi, Okayama, Japan.

(74) Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll.

(54) Fremgangsmåte for fremstilling av
ketose.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et ketosemateriale som i det vesentlige er sammensatt av maltulose og eventuelt maltotriulose, ved hvilken et materiale som inneholder maltose og eventuelt maltotriose, isomeriseres under alkaliske betingelser for dannelse av ketosen maltulose og eventuelt maltotriulose. Fremgangsmåten er karakterisert ved at isomeriseringsproduktet underkastes oksydasjon med en laktose-dehydrogenase for omdannelse av ikke-omdannet aldose til aldonsyrer, hvorefter de dannede aldonsyrer fraskilles.

Oppfinnelsen skal beskrives mer fullstendig i det følgende. Syntesene av maltulose og maltotriulose ble først beskrevet i 1953 da L. Hough m.fl. syntetiserte sakkarider ved isomerisering av aldose. Senere er det fremkommet lite litteratur på

dette område. Da dessuten isomeriseringen åpenbart ikke overskri-
der 50% i likevektstilstand, er det ikke blitt utviklet noen indust-
riell prosess for fraskilling av ikke omsatte bestanddeler og sekun-
dære reaksjonsprodukter. Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse
har allerede utviklet en industriell prosess for oksydasjon av
oligosakkarider som maltose og maltotriose til tobasiske og treba-
siske syrer med godt utbytte ved en enzymatisk laktosedehydrogena-
se som er beskrevet i norsk patentsøknad nr. 2190/70. Følgelig stu-
derte oppfinnerne også muligheten av å anvende denne oksydasjonspro-
sess på maltulose-maltoseblandinger for bare å oksydere aldosen til
tobasiske og trebasiske syrer uten tap av ketosene og derpå skille
fra syrene enten ved ioneveksling eller i form av basiske kalsium-
salter, hvorved de til slutt kom frem til en gjennomførlig indust-
riell prosess.

Med hensyn til fremstilling av utgangsmaterialet, malto-
se, har oppfinnerne også utviklet en prosess for spaltning av
stivelse med α -1,6-glykosidase og som er langt mer fordelaktig
enn vanlige prosesser. Ved en kombinasjon av således allerede ut-
viklet teknikk er det tilveiebragt en fremgangsmåte for fremstill-
ing av ketose fra stivelse i industriell målestokk. Den rene mal-
tulose som hittil bare har vært fremstilt i små mengder som labora-
toriereagens, og blandingen av maltulose og maltotriulose er nu
gjort til gjenstand for masseproduksjon. Foreliggende oppfinnelse
har derfor stor betydning ved at det er fremkommet nye anvendelses-
muligheter for slike sakkarider som søtningsmidler i drikkevarer,
farmasøytiske produkter og utgangsmaterialer for industrielle syn-
teseprosesser.

Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen vil nu bli be-
skrevet trinn for trinn. Først fremstilles utgangsmaterialet mal-
tose enten ved å flytendegjøre korn-, potet- eller lignende stivel-
se ved høye temperaturer på fra 160°C og oppover eller kontinuerlig
å flytendegjøre stivelsen ved tilsetning av et flytendegjørende
enzym eller α -amylase ved høye temperaturer på mellom 85°C og 90°C
for derved å danne en lav D.E.-flytendegjort stivelse som har en
spaltningshastighet D.E. på ca. 1 til 5 %, og derpå hurtig å kjøle
den flytendegjorte stivelse ned til 50-60°C og samtidig tilsette
 β -amylase og α -1,6-glukosidase, eller reversere rekkefølgen og
modifisere tidsinnstillingen for tilsetningen. I et hvert tilfelle
vil det lett kunne fremstilles maltose av høy renhet og med et
maltoseinnhold på over 60 %. α -1,6-glukosidasen som anvendes for

denne forsukring, hydrolyserer α -1,6-glukosidbindingen i amylopektinmolekylet som avbryter β -amylolysen, hvilket muliggjør full gjennomføring av β -amylolysen. Glukosidasen som kan anvendes for utførelse av oppfinnelsen, kan være hvilket som helst av enzymene produsert av stammene av *Escherichia intermedia* (ATCC 71073) eller *Pseudomonas amyloclavata* (ATCC 21262), enzymene produsert av noen av stammene av *Nocardia*-slekten og andre *Actinomycetes*, og enzymer produsert av over et dusin stammer tilhørende slektene *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Mycobacterium*, *Pediococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus* og *Erwinia* beskrevet i britisk patentskrift nr. 1 260 418. β -amylasen som kan anvendes, er β -amylase ekstrahert fra hvetekli, β -amylase ekstrahert fra soyabønner, eller hvilken som helst annen amylase av vegetabilsk opprinnelse, eller et enzym produsert av mikroorganismer som *Polymyxa* (ATCC 8523), som beskrevet i britisk patent nr. 1 130 398. Reaksjonsbetingelsene er pH 5,5 - 6,0, temperatur 45-60°C og reaksjonstiden 30-45 timer. Stivelsekonsentrasjonen er fortrinnsvis mellom 10 og 25 %. Skjønt avhengig av den anvendte mengde enzym og reaksjonstid inneholder den oppnådde maltose som er et meget rent produkt, ca. 95 % maltose og ca. 4 % maltotriose. Jo mindre maltoseinnhold, desto større blir andelen av maltotriose.

Isomeriseringen fra maltose til maltulose foregår generelt i nærvær av en basisk katalysator, hvilket lenge har vært kjent som Lobry de Bruyn's reaksjon. Det er den letteste måte for isomerisering av aldose til ketose, og for dette formål anvendes sterk alkali eller en sterkt basisk ionevekslerharpiks. Ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen brukes kalsiumhydroksyd, ammoniumhydroksyd, natriumhydroksyd eller ionevekslerharpiks. Med hensyn til reaksjonsbetingelsene, enten det brukes en kombinasjon av lav temperatur og lang tid eller den omvendte kombinasjon, nemlig en forhøyet temperatur og kort tid, så er dette i høy grad avhengig av det anvendte utstyr. Ved lav temperatur, under 40°C, er spaltningen av sukker ved oksydasjon relativt liten, men ved økning av temperaturen øker tapet på grunn av oksydasjonen og spaltningen av sukkeret. Med dette for øye ble det foretatt forsøk med et utstyr som kontinuerlig var i stand til hurtig å oppvarme, hurtig å kjøle og nøytralisere reaktantene og produktet. Resultatene vist i den følgende tabell indikerer at sukkertapet øker med stigende temperatur og utstrekningen av reaksjonstiden.

Temp.	OPPVARMNINGSTID			
	Isomeriseringsgrad i % av forsøksprøver			
	Tap angitt i parenteser (%)			
	5 min.	10 min.	15 min.	3 dager
35°C				45 % (1 %)
80°C		37 % (1%)		
100°C	30 % (1%)		45 % (5%)	

Ca(OH)₂-konsentrasjon 1,5% av sukker.
Sukkerkonsentrasjon 40 %.

Reaksjonen skred passende frem ved en sukkerkonsentrasjon på 20 til 40 %, og hvor kalsiumhydroksyd ble brukt, fikk en 0,13 % løsning henstå i 3 til 4 dager, og reaksjonen ble utført inntil det ikke lenger kunne iakttas noen forandring i den optiske dreining. Tilnærmet samme resultater ble oppnådd med natriumhydroksyd og ammoniumhydroksyd.

Når forhøyet temperatur ble brukt, ble reaksjonen utført med en 1 til 2 % alkaliløsning og i pH-området 9 til 10. I dette tilfelle resulterte en korttids-reaksjon i et sukkertap på bare 1 til 2 % og en god isomeriseringsgrad skjønt en viss mørkfarvning kunne iakttas. Isomeriseringsgraden ble bestemt ved beregningen av ketose ved bruk av cystein-H₂SO₄-karbazolmetoden. Det isomeriserte sukker ble hurtig kjølt og nøytralisert ved innsprøyting i et flash-kammer med en lik mengde saltsyre eller fortennet svovelsyre, idet flash-kammeret ble holdt under redusert trykk. Dannet kalsiumsulfat ble fjernet ved filtrering og natriumklorid og ammoniumsulfat ble direkte brukt for etterfølgende kultur eller enzymatisk omsetning. Farvede bestanddeler gikk opp i en ganske høy konsentrasjon og avfarvning ble utført ved å føre det resulterende produkt gjennom et lag av granulert trekull.

Papirkromatografi av den rensede løsning viste at maltose, maltotriose og en liten mengde tetrose var igjen i en samlet restmengde på minst ca. 50 %. Som ketoser ble observert maltulose, maltotriulose og tetrulose. Etter rensning med aktivt trekull og ionevekslerharpiks var løsningen en meget søt sirup som var anvendbar som søtningsmiddel.

I metoden for anvendelse av en sterkt basisk ionevekslerharpiks for epimerisering av aldose ble brukt en ioneveksler av typen "Amberlite IRA-400" og sukkerløsningen ble kokt for å

fjerne oksygen og så cyclisert ved 70°C inntil isomeriseringen var forløpet. En isomeriseringsgrad på ca. 30 % var mulig å gjennomføre i løpet av 5 timer. Løsningen ble så rensset på samme måte som beskrevet ovenfor.

Fraskilling av aldose og ketose fra den blandede løsning kunne tilfredsstillende utføres ved enzymatisk oksydasjon av aldosen. For dette formål ble den blandede sukkerløsning oksydert enzymatisk enten ved å kultivere en stamme av arten *Pseudomonas* på sakkarider oppnådd ovenfor som karbonkilde eller ved å bruke bakterieceller oppnådd ved kultivering som enzymatisk kilde. Når en *Pseudomonas*-stamme kultiveres under luftning på en 5-10 % sukkerløsning inneholdende en nitrogenkilde, f.eks. kornstøp, og noen uorganiske salter, blir ketoser lite oksydert mens aldoser som disakkarider og trisakkarider oksyderes til aldonsyrer, dvs. henholdsvis maltobionsyre og maltotrionsyre.

Det har ikke tidligere vært kjent at det er mulig å oksydere aldoser til aldonsyrer selektivt ved hjelp av en laktosedehydrogenase, uten at det skjer noe vesentlig angrep på tilstedeværende maltulose og maltotriulose.

Med hensyn til enzymproduserende stammer som kan brukes for ovennevnte formål, er *Pseudomonas graveolens* NRRL 14 og *Pseudomonas fragi* NRRL 25, begge beskrevet av Frank H. Stodola m.fl. i "J. Biological Chemistry", Vol. 171 (1947), ss. 213-221, de mest foretrukne. Andre *Pseudomonas*-stammer som ikke involverer hydrolyse av disakkarider, kan også brukes, skjønt de forlenger reaksjonstiden.

Alternativt tilsettes bakterieceller oppnådd ved den ovenfor beskrevne kultivering til den 20-30% blandede sukkerløsning, og blandingen oksyderes ved lufting og omrøring mens fall i pH-verdien hindres ved nærvær av kalsiumkarbonat og andre tilsetninger. På denne måte kan det resterende disakkarid og trisakkarid oksyderes til aldonsyrer uten tap av sukkeret. Reaksjonstiden varierer fra 10 til 20 timer, og oksydasjonsgraden i henhold til oppfinnelsen ble bestemt ved å måle mengden av dannet kalsiumsalt av aldonsyren.

Reaksjonsproduktet eller aldonsyre-ketoseblandingen kan skilles i komponentene ved adsorpsjon på en svakt basisk ionevekslerharpiks ved å dra nytte av aldonsyrens aciditet, eller aldonsyren kan krystalliseres og skilles ut som et kalsiumsalt eller et basisk kalsiumsalt. For å illustrere fremgangsmåten mer detaljert

renses den blandede løsning og konsentreres, og den således oppnådde konsentrerte sirup løses i kalsiumhydroksyd til dens pH viser svakt alkalisk verdi slik at et basisk kalsiumsalt felles. De dannede krystaller oppsamles, vaskes og spaltes med svovelsyre, og det resulterende kalsiumsulfat fjernes. Gjenværende sulfatradikal elimineres med en liten mengde bariumsulfat. Produktet avsaltes og renses med en kationvekslerharpiks.

Aldonsyren som er adsorbent på en ionevekslerharpiks, desorberes av med kalsiumhydroksyd eller natriumhydroksyd, og aldonatet som danner seg, renses med en sterkt sur ionevekslerharpiks til ren aldonsyre.

Når ketose-aldonsyreblandingen renses med aktivkull og en sterkt sur ionevekslerharpiks, blir den et søtningsmiddel som har en viss surhet, hvilket kan brukes som tilsetningsmiddel til næringsmidler.

Etter fjerning av syren fra ketoseløsningen avfarges moderlutten og vaskevæsken eller den ikke adsorberte fraksjon med aktivkull, avsaltes og avsyres under anvendelse av anioniske og kationiske ionevekslere og konsentreres til sirup slik at maltulose kan oppnås.

Egenskapene til ketosesøtningsmidlet oppnådd ved foreliggende oppfinnelse og anvendt som næringsmiddeltilsetning ble undersøkt og følgende resultater ble oppnådd.

1. SØTHET

Søthetsprøver viste at dette søtningsmiddel er litt mindre søtt enn vanlig sukker, men søtere enn druesukker. Med hensyn til søthetskvaliteten er det mildere enn sukker, men har mer "fylde" eller "dybde" enn druesukker, hvilket skyldes den komplekse struktur omfattende flere sakkarider.

I en gruppeundersøkelse utført av 30 personer ble vanlig sukker, druesukker, maltitol og ketosen i søtningsmidlet fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse sammenlignet med hensyn til søthet. Hvert prøvemateriale ble undersøkt 5 eller flere ganger. Når sammenlignet i forskjellige sukkerkonsentrasjoner på 35 %, 20 % og 10 % ble forsøksmaterialet gradert i følgende orden av avtagende søthet:

Vanlig sukker > ketose = maltitol > druesukker.

Ketose er således klassifisert mellom vanlig sukker og druesukker og er praktisk talt på samme nivå som maltitol.

For sammenligning av søthetsstyrken ble en 35 % ketose-

løsning sammenlignet med sukkerløsninger i forskjellige konsentrasjoner, på 10 %, 15 %, 20 %, 25 % og 30 %. Resultatene indikerte at 35 %-løsningen av ketose i henhold til oppfinnelsen var like søt som 25 % løsningen av vanlig sukker.

2. KRYSTALLISERBARHET OG KRYSTALLISASJONSHEMMEDE EGENSKAPER.

Maltulosesøtningmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen er lett løselig i vann og er vanskelig krystalliserbart i høye konsentrasjoner ved normal temperatur.

I et forsøk ble 10 % på tørr basis av dette ketose-søtningmiddel separat tilsatt sukker og druesukker under dannelse av 70 % løsninger som fikk henstå ved romtemperatur. I motsetning til sukker- og druesukkerløsningene som uten tilsetning av søtningmidlet begynte å krystallisere etter en natts forløp, krystalliserte ikke sukkerløsningene inneholdende søtningmidlet i det hele tatt.

3. FUKTIGHETS- OG AROMABEVARENDE EGENSKAPER OG VISKOSITET

Da søtningmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen er en ketoseblanding bestående av maltulose, maltotriulose og mindre andeler høyere ketoser, har det en utmerket fuktighetsbevarende egenskap. Det bevarer aroma og har noe høyere viskositet enn rørsukker fordi det inneholder visse andeler av tri- og tetra-sakkari-der. Med disse trekk er det best egnet for anvendelse som tilsetningsmiddel for næringsmidler. Det har vist seg spesielt egnet for fremstilling av sukkerbrød, og dets viskositet og aromabevarende egenskap gir i kombinasjon frisk aroma og enestående velsmakenhet til hermetisk frukt, fruktsafter og lignende.

4. pH- STABILITETSPRØVE

Endelig sukkerkonsentrasjon:	0,02 %
Bufferløsning, 0,02 M, pH:	2,0 - 10,0
Temperatur:	98°C

Etter prøvetaking ved forutbestemte tidsintervaller ble forandringer i mengdene av direkte-sukker og total-sukker bestemt i overensstemmelse med Somogyi-Nelson-metoden. På basis av den opprinnelige konsentrasjon som ble betraktet som 100, ble forandringer i konsentrasjonen notert.

Forandringer i totalt sukkerinnhold ble bestemt ved Somogyi-Nelson-metoden etter tilsetning av 0,5 ml 5 % HCl til hver

128818

8

ml reagert løsning, oppvarming av løsningen ved 100°C i 45 minutter og nøytralisering av den resulterende løsning med 0,5 ml NaOH, idet den mengde som derved ble oppnådd, ble betraktet som totalt sukkerinnhold.

Opprinnelig	pH-verdi		Oppvarmingstid (timer)				
	12 timer senere		1	2,5	5	8	12
2	2,3	Direkte	100	101	102	103	105
		Total		100	99,7	99,7	100
4	4,3	Direkte	100	100	99,7	100	100
		total		100		99,7	100
6	6,0	Direkte	100	101	100	101	101
		total		99,7		93,0	92,3
8	7,3	Direkte	100	102	103	103	103
		total		99,7	99,1	96,5	96,7

Som det vil fremgå av ovenstående tabell, hydrolyseres søtningmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen bare noen få prosent under oppvarming ved 100°C i 12 timer ved en aciditet av pH 2, men på den alkaliske siden med pH-verdier over 7 blir det ustabilisert med spaltning av selve sakkariidkomponentene i likhet med vanlig sukker.

Som nevnt ovenfor er søtningmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen egnet som tilsetning til forskjellige søtdrikker. Med alminnelig søthet harmoniserer det med forskjellige kullsyredrikker, slik som cola-drikker, siderlignende drikker og limonader, og gir en forfriskende ettersmak til slike drikkevarer. Det gir også "calpis", yoghurt og andre melkesyreholdige drikker en søthet som passer godt sammen med surheten av selve drikkene. De muliggjør dessuten at naturlige og syntetiske fruktsafter, konsentrerte fruktsafter, konsentrert tomatsaft og tomat-ketchup og lignende beholder sin fruktaroma, friske smak og søthet på den mest forønskede måte. Dessuten gir søtningmidlet passende viskositet til slike drikkevarer uten at det krystalliserer selv i høykonsentrerte safter.

Av grunner som ovenfor nevnt, kan søtningmidlet med fordel anvendes ved fremstilling av frosne søtsaker som iskrem og ved søtning av konserverte frukter.

Når søtningmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen anvendes i forskjellig fint bakverk og bløte kaker, har det vist seg

fordelaktig med sin manglende evne til å krystallisere, sin raffinerte søthet, fuktighetsbevarende egenskap og andre ønskverdige egenskaper. Det gir passende fuktighet og hindrer tørking av sukkerbrød og lignende hvor aldring eller tørking og krystallisering av søtningsmidler kan være uheldig. Disse egenskaper koplet sammen med ikke-krystalliserbarheten til søtningsmidlet i høye konsentrasjoner gjør det i høy grad egnet for anvendelser som nevnt.

Det gir optimal glans og kulør til bakte kaker og kjeks. Dets fuktighetsbevarende egenskap hindrer deformasjon ved baking og eventuelt tap på grunn av brekkasje. Midlet bevarer således aromaen og forlenger levetiden for næringsmidlet.

Det holder geleer velsmakende, stabiliserer farven og bevarer klarheten samtidig som det hindrer tørking og krystallutskillelse i lengre tidsrom. Således holdes geleer i frisk tilstand gjennom hele sin levetid. Kremkaker holder seg likeledes søte og myke ved tilsetning av søtningsmiddelet fremstilt i henhold til foreliggende fremgangsmåte.

Når det er blandet med sukkertøy, sjokoladefyll, tygg gummi, karameller og forskjellige former for sjokolade modererer søtningsmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen deres utmerkede søthet, forbedrer deres ettersmak og gjør dem bedre egnet for moderne smak.

Nok en annen anvendelse er i alkoholiske drikkevarer. Små mengder av søtningsmidlet fremstilt i henhold til oppfinnelsen gir forskjellige viner og alkoholiske drikker merkbart øket velsmak og "fylde".

Eksempel : Fremgangsmåte for fremstilling av ketose.

Eksempel 1: Fremgangsmåte for fremstilling av utgangsstoff.

En oppslemning av søtpotetstivelse i en konsentrasjon på 20 % og pH 6,0 ble flytendegjort ved 90°C ved tilsetning av 0,2 % av et flytendegjørende enzym pr. gram stivelse. Det ble oppnådd en homogen flytendegjort stivelse med en spaltningsgrad på 3,5 %. Denne flytendegjorte stivelse ble hurtig kjølt til 50°C, β -amylase (britisk patent 1 130 398) og α -1,6-glukosidase oppnådd fra en *Escherichia*-stamme (*Escherichia intermedia* ATCC 21073) ble tilsatt i mengder på henholdsvis 20 og 10 enheter pr. gram stivelse og den flytendegjorte stivelse ble forsukret ved 45°C og pH 6,0 i løpet av 35 timer. Etter deaktivering av enzymene ble det resul-

terende produkt avfarvet og rensset med aktivkull, og det ble oppnådd en sukkerløsning med en maltoserenhet på 93 % på tørr basis. Rensning av den således oppnådde maltose ble utført ved krystallasjon.

Fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen.

2 kg av denne maltose ble løst i 10 l vann, og etter tilsetning av 13 g kalsiumhydroksyd ble blandingen omsatt ved 35°C i løpet av 4 dager. Den optiske dreining av den reagerte løsning ble bestemt og da verdien ble konstant, ble reaksjonen avsluttet og det resulterende produkt konsentrert i vakuum. Det hadde et maltoseinnhold på ca. 52 %. En halvdel av denne blandede løsning ble satt til side, og 1 l av en løsning inneholdende 10 % av reaksjonsproduktet på anhydridbasis ble nøytralisert med CO₂. I denne løsning ble løst 1 % kornstøp, 0,2 % karbamid, 0,06 % kaliumdihydrogenfosfat, 0,025 % MgSO₄·7H₂O og 2,5 g kalsiumkarbonat. Blandingene ble sterilisert ved oppvarming og inokulert med *Pseudomonas graveolens* NRRL 14 som ble kultivert under omrøring ved 400 r.p.m. og lufting med en ekvivalent mengde luft ved 30°C i 50 timer. Fra kulturvæsken ble bakteriecellene oppsamlet ved sentrifugering og brukt som enzymkilde.

Den enzymatiske aktivitet ble bestemt på følgende måte: 200 μ-mol av en fosfatpuffer (pH 5,6), 20 μ-mol maltose, 0,5 μ-mol 2,6-diklorfenolindofenol og konsentratet av bakterieceller i et totalvolum på 6,0 ml ble blandet inn og reagert ved 30°C i 10 minutter. Aktiviteten ble målt ved å følge minskningen i absorpsjonen ved 590 mμ, idet en enzymenhet ble definert som den mengde som gir en minskning i absorpsjonen på 0,001 i ett minutt.

Kulturvæsken befridd for bakterieceller etter kultiveringen ble rensset ved avfarvning og filtrering gjennom aktivt trekull, konsentrert, tilsatt til en løsning mettet med kalsiumhydroksyd, og etter oppvarming av løsningen ble aldonsyren felt og fjernet i form av basisk kalsiumaldonat. Filtratet ble befridd for kalsium ved hjelp av en sterkt sur ionevekslerharpiks, og under anvendelse av en svakt basisk ionevekslerharpiks ("Amberlite IRA 64") ble den resterende bionsyre fjernet. Derpå ble det rensset med forskjellige ionevekslerharpikser, dvs. sterkt basisk "IRA 411" og sterkt sur "IR 120", til en farveløs væske og konsentrert til sirup. Analyse ved papirkromatografi viste at sirupen inneholdt 95 % maltulose, 1 % maltotriulose, 1 % maltose, 2 % maltotriose og resten var noen andre oligosakkarider. Utbyttet var 45 % på basis

av maltosemengden.

Bionatet fraskilt som et uløselig kalsiums salt ble løst i 5 ganger sitt volum av vann, og ved gradvis tilsetning av fortynnet svovelsyre ble kalsium felt som kalsiumsulfat og fjernet. Ved hjelp av en kationvekslerharpiks ("IR 120") ble resten av kalsiumet fjernet, og ved bruk av en moderat basisk ionevekslerharpiks ble svovelsyreradikalet fjernet. Den resulterende løsning ble konsentrert i vakuum, og maltobionsyre ble oppnådd i en siruplignende tilstand. Utbyttet var 41 % på basis av den brukte maltosemengde. Papirkromatografi viste at denne bionsyre inneholdt små mengder maltulose, maltose, maltotriose og også maltotriionsyre, mens maltobionsyre utgjorde mer enn 95 % av totalmengden.

Eksempel 2

På samme måte som beskrevet i eksempel 1, ble *Pseudomonas amyloclavata* (ATCC 21262) kultivert og den derved produserte α -1,6-glukosidase ble brukt til fremstilling av maltosesirup (maltoserenhet 92 %). 1 liter av en løsning av sirupen i en konsentrasjon på 15 % ble omsatt med 200 ml ammoniumhydroksyd som hadde en spesifikk vekt på 0,88, ved 35°C i 4 dager. Da den optiske dreining ble stabil og konstant, ble løsningen nøytralisert med svovelsyre til pH 5,8. Deretter ble tilsatt 0,5 % kornstøp, 0,06 % kaliumdihydrogenfosfat og 0,025 % magnesiumsulfat hvoretter blandingen ble sterilisert og inokulert med *Pseudomonas fragi* (NRRL 25). På samme måte som i eksempel 1 ble aerob kultur utført under justering av pH med kalsiumkarbonat. Kulturvæsken ble konsentrert, felt kalsiumsulfat fjernet og væsken kjølt. Den dannede aldonsyre ble krystallisert og felt som basisk kalsiums salt, bunnfallet sentrifugert fra og vasket med en liten mengde vann. Moderluten og vaskevannet ble begge avfarvet med aktivkull og det resulterende produkt konsentrert og rensset ved ioneveksling. Det ble oppnådd et utbytte på 35 % i form av en svakt gulaktig sirup, regnet på maltosemengden.

Kalsiumfelling av maltobionsyre ble utført som beskrevet i eksempel 1, og etter felling og fjerning av mesteparten av kalsium med svovelsyre ble metallionene fjernet ved hjelp av ioneveksler. Det ble oppnådd en aldonsyresirup i et utbytte av 45 % på basis av den brukte maltosemengde.

Eksempel 3

Maltose oppnådd som i eksempel 1 ble fortynnet til 2 liter i en konsentrasjon av 15 % og løsningen omsatt under tilsetning av 2,0 g kalsiumhydroksyd ved 35°C i løpet av 3 til 4 dager. Etter avslutning av reaksjonen ble reaksjonsløsningen nøytralisert med karbondioksyd, avfarvet med aktivkull og 37 g kalsiumkarbonat ble tilsatt pr. liter løsning. Med ytterligere tilsetning av 5 g bakterieceller oppnådd i eksempel 1 ble løsningen kraftig omrørt under lufting ved 30°C i 15 timer. Deretter ble reaksjonen avsluttet og den fremstilte bionsyre felt og fraskilt i form av et basisk kalsiumsalt på samme måte som beskrevet i eksempel 1, og filtratet inneholdende maltulose ble avfarvet og avsaltet med ionevekslerharpiks. Fra væsken ble det etter konsentrering oppnådd 150 g søt sirup. Vannfritt utbytte var 47 %. Produktet inneholdt noen få prosent maltotriulose. Maltobionsyren fraskilt som kalsiumsalt ble befridd for kalsium og avfarvet som i eksempel 1. Utbyttet av maltobionsyre som inneholdt en del maltotriionsyre, var 45 %.

Eksempel 4.Fremgangsmåte for fremstilling av utgangsmaterialet.

Renset maisstivelse i form av en 20 % stivelsesoppslemning ble kontinuerlig flytendegjort ved 160°C. Etter en oppholdstid på 20 minutter ble det oppnådd en væske med en dekstroseekvivalent på 2,5 %. Den flytendegjorte stivelse ble hurtig kjølt til 60°C, og under tilsetning av β -amylase ved en hastighet på 20 enheter pr. g stivelse ble blandingen omrørt. Da viskositeten avtok, ble væsken kjølt til 45°C, α -1,6-glukosidase av *Lactobacillus* (ATCC 8008) ble tilsatt med en hastighet av 20 enheter pr. g stivelse, og så ble blandingen forsukret ved pH 6,0 og 45°C i løpet av 30 timer. Etter fullføring av forsukringen ble enzymene deaktivert ved koking og det resulterende produkt ble avsaltet og rensert med aktivkull og ioneveksler. Analyse av det konsentrerte produkt viste et innhold på 80 % maltose, mindre enn 15 % maltotriose og mindre mengder tetrose og pentose.

Fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen.

Den oppnådde maltosesirup ble justert til en konsentrasjon på 50 % og til en pH-verdi på 10 med kaustiksoda og så isome-

risert ved oppvarming i kontinuerlig apparatur ved 95°C i 5 min. Reaksjonsløsningen ble nøytralisert med saltsyre under hurtig kontinuerlig kjøling. Resultatet ble ført gjennom et 4 m tykt lag av granulert aktivkull for avfarvning og ble så avsaltet med ioneveksler hvorved det ble oppnådd en svakt gulaktig sirup.

Denne isomeriserte sirup inneholdt 45 % maltulose og ved papirkromatografi ble det funnet at den også inneholdt maltotriulose og tetrulose samt en del andre ukjente bestanddeler.

Til en 10 % løsning av denne ketoseblanding ble tilsatt kalsiumkarbonat i en mengde av 2,5 % på basis av løsningen. Som en dehydrogenase ble også tilsatt bakterieceller oppnådd som i eksempel 1 med en hastighet av 200 milligram pr. 10 gram sakkarider. Blandingen ble omrørt under lufting ved 30°C i 40 timer, men det var praktisk talt ingen spor av en aldosereaksjon. Den omsatte løsning ble avfarvet med trekull, filtrert, avkationisert med en kationvekslerharpiks og adsorbent på en svakt eller moderat basisk ionevekslerharpiks. Den avsyrede ketose-ekvivalentløsning ble ytterligere avfarvet og konsentrert i vakuum til en sirup med et utbytte på 45 % på basis av utgangsmaterialet. Papirkromatografi viste at produktet inneholdt som ketose en del triulose og tetraulose i tillegg til maltulose samt en liten mengde aldose.

Bionsyren, trionsyren osv. adsorbent på ionevekslerharpiksen ble drevet ut med fortynnet svovelsyre og det resulterende produkt nøytralisert med kalsiumhydroksyd, avfarvet med aktivkull og konsentrert. Så meget svovelsyre som mulig ble felt og fjernet ved hjelp av bariumklorid og den resterende væske renses med kationveksler hvorved det ble oppnådd en farveløs sirup. Utbyttet var 41 % på basis av utgangsmaterialet.

Eksempel 5

En 20 % maltoseløsning fremstilt som i eksempel 1 ble kokt for fjerning av luft. Under tilsetning av en stor mengde "Amberlite IRA 400"-ioneveksler ble strømningshastigheten av løsningen senket og løsningen ført gjennom SV 1. Temperaturen ble regulert til 70°C og oppvarmet i over 5 timer hvorved oppnåddes en isomeriseringsgrad på 35 %. Denne sakkaridløsning ble renses gjennom et blandet sjikt av ionevekslerharpikser ("Amberlite IR 120" og "IRA 411") og ble så konsentrert. Den oppnådde sirup var meget søt og egnet seg for bruk som søtningsmiddel.

Under anvendelse av en del av denne sakkaridløsning og

bakteriecellene av Pseudomonasstammen oppnådd i eksempel 1 ble samme behandling som beskrevet i eksempel 3 utført under oppnåelse av en blandet ketose-aldonsyre-løsning. Etter fraskilling på samme måte som beskrevet i tidligere eksempler, ble det oppnådd en blanding av maltulose og maltotriulose med et utbytte på 30 %. Uttrykt som aldonsyre var utbyttet 45 %.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et ketosemateriale som i det vesentlige er sammensatt av maltulose og eventuelt maltotriulose, ved hvilken et materiale som inneholder maltose og eventuelt maltotriose, isomeriseres under alkaliske betingelser for dannelsen av ketosen maltulose og eventuelt maltotriulose, k a r a k t e r i s e r t ved at isomeriseringsproduktet underkastes oksydasjon med en laktosedehydrogenase for omdannelse av ikke-omdannet aldose til aldonsyrer, hvoretter de dannede aldonsyrer fraskilles.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t ved at det anvendes laktosedehydrogenase som er fremstilt av Pseudomonas graveolens NRRL 14 eller Pseudomonas fragi NRRL 25.

(56) Anførte publikasjoner:

C.A. 53: 1454 i