



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 72142
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patenti myönnetty
Patent nro 13 04 1087

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 12 P 19/24, C 12 M 1/40,
C 12 N 9/92

(21) Patentihakemus — Patentansökning 824204

(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 07.12.82

(23) Alkupäivä — Giltighetsdag 07.12.82

(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 10.06.83

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 31.12.86

(86) Kv. hakemus — Int. ansökan

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 09.12.81

Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken

Tyskland(DE) P 3148603.7

Toteennäytetty-Styrkt

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Kali-Chemie Aktiengesellschaft, Hans-Böckler-Allee 20, Hannover,
Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(72) Günter Weidenbach, Hannover, Dirk Bonse, Arpke/Lehrte, Boris Meyer,
Hannover, Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(74) Oy Borenius & Co Ab

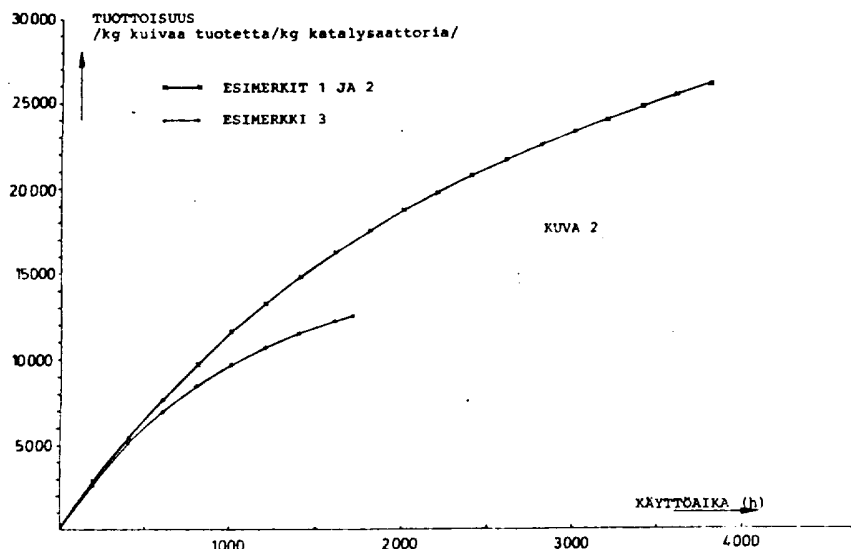
(54) Menetelmä ja laite isomeroosin valmistamiseksi - Förfarande och
anordning för framställning av isomeros

(57) Tiivistelmä

SiO₂-pohjaiselle kantajalle valmistetun glukoosi-isomeraasia omaavan katalysaattorin tuottoisuutta nostetaan huomattavasti, kun kantajakatalysaattorilla täytetyn reaktorin eteen asennetaan esikolonne, joka on täytetty SiO₂- tai alumiinisiliikaattikappaleilla.

(57) Sammandrag

Produktiviteten av en på en SiO₂-baserad bärare framställd katalysator med glukosisomerasaktivitet förhöjs märkbart då man före den med bärarkatalysator fyllda reaktorn ansluter en förkolonn, som är fylld med SiO₂-eller aluminiumsilikatstycken.



Menetelmä ja laite isomeroosin valmistamiseksi.

Förfarande och anordning för framställning av isomeros.

Keksintö käsittelee menetelmää, jolla valmistetaan glukoosia ja fruktoosia sisältävää liuosta glukoosiliuoksesta SiO_2 -pohjaiselle kantajalle valmistetulla glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavalla katalysaattorilla.

Tämä glukoosin entsymaattinen muuttaminen glukoosi-fruktoosiseokseksi on saanut kasvavaa merkitystä. Seos myydään useimmiten siirapin, isomeroosin, muodossa ja se korvaa ennen kaikkea elintarvike- ja juomateollisuudessa maailmanlaajuisesti niukemmin käytetyn ja kalliimman kristallisokerin (ruokosokeri, juurikassokeri, sakkaroosi), joka on valmistettu sokeriruo'osta tai sokerijuurikkaasta. Glukoosi-fruktoosiseoksen valmistamiseen tarvittavan glukoosin lähteenä voivat olla luonnolliset tärkkelykset, esim. maissi- tai perunatärkkelys, jotka muutetaan glukoosiksi happo- tai entsymaattisella hydrolyysillä.

Glukoosin muuttamiseksi entsymaattisesti fruktoosiksi lisätään glukoosivesiliuokseen toimivaa glukoosi-isomeraasia, mahdollisesti myös isomerointia edistäviä yhdisteitä (esim. koboltti- ja magnesium-ioneja), kun haluttu isomeroitumisaste on saavutettu, erotetaan liuoksesta siihen mahdollisesti lisätyt yhdisteet ja liuos tiivistetään siirapiksi.

Aikaisemmin on työskennelty panosmenetelmin ja käytetty joko eristettyä glukoosi-isomeraasia tai glukoosi-isomeraasia, joka on jätetty luonnollisessa solusidoksessa sitä tuottaviin mikro-organismeihin. Koska näin lisättynä glukoosi-isomeraasi ei ole, tai on vain vaikeasti kerättävissä takaisin ja uudelleen käytettävissä, käytetään nykyään lisääntyvässä määrin solusidoksessa kiinnittämällä veteen liukenemattomaksi tehtyä ja lisäyksen mekaanisesti lujitettua glukoosi-isomeraasia. Edelleen voidaan glukoosi-isomeraasi sitoa epäorgaaniseen tai

orgaaniseen kantajaan adsorptiolla tai kovalenttisesti ja tehdä se siten veteen liukenemattomaksi. Tällä tavoin kiinnitettyä ja lujitettua tai kantajaan sidottua glukoosi-isomeraasia voidaan käyttää useasti ja tällöin voidaan käyttää jatkuvia menetelmiä, esim. täyttämällä reaktori kantajaan sidotulla glukoosi-isomeraasilla ja antamalla glukoosiliuoksen (substraatin) virrata reaktorin läpi.

Tällaiseen jatkuvaan menetelmään tarvittava, kantajaan sidottu glukoosi-isomeraasi, jota kutsutaan myöhemmin glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavaksi katalysaattoriksi tai kantajakatalysaattoriksi, edustaa sinänsä tekniikan tasoa. Esimerkkinä mainittakoon DE-patenttijulkaisu 27 26 188, jossa kuvataan erityisesti SiO_2 -kantajaan perustuva glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaava katalysaattori.

Keksinnön mukainen menetelmä glukoosia ja fruktoosia sisältävän liuoksen valmistamiseksi perustuu sellaiselle jatkuvasti toimivalle menetelmälle, jossa glukoosiliuos (substraatti) virtaa reaktorin läpi, joka sisältää glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavan kantajakatalysaattorin.

Keksintö perustuu lisäksi seuraaville tiedoille:

Isomeroosin kilpailukelpoisuus määräytyy suhteessa luonnolliseen sakkaroosiin paitsi hintansa, pääasiassa sen fruktoosipitoisuuksien mukaan, sillä tämä on ratkaiseva tekijä sen makeudessa. Päinvastoin kuin luonnollisessa sakkaroosissa, joka on glukoosin ja fruktoosin muodostama disakkaridi, jossa glukoosi ja fruktoosi esiintyvät molekyylisuhteessa 1:1, vaihtelevat glukoosin ja fruktoosin pitoisuudet isomeroosissa ja siten sen makeus on ensisijaisesti riippuvainen ajasta, jonka glukoosi-isomeraasi vaikuttaa glukoosiliuokseen, sekä lämpötilasta, jossa reaktio tapahtuu. 60 °C:ssa, riittävän pitkän reaktioajan jälkeen saavutettava maksimaalinen termodynaaminen tasapaino on suunnilleen 51%:ssa isomeroitumisasteessa, s.o.

100:sta käytetystä glukoosimolekyylistä on 51 muuntunut fruktoosiksi. Nykyään hyväksytään kaupan isomeroosi, jonka kuiva-ainepitoisuudesta on fruktoosia 42%. Koska teknisen lähtöaineen glukoosipitoisuus on tavallisesti 90 - 95%, on käytännössä isomeroitumisaste 44 - 46% pakollinen, jotta saavutettaisiin em. fruktoosipitoisuus. Jotta em. isomeroitumisaste saavutettaisiin, voidaan glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavia kantajakatalysaattoreita käyttää vain tietyllä tilavuusnopeudella, joka on riippuvainen niiden silloisesta aktiivisuudesta. Nykyaikaisia, korkea-aktiivisia katalysaattoreita, joita voidaan esim. valmistaa DE-patenttijulkaisussa 27 26 188 kuvatulla menetelmällä, voidaan käyttää alkutilavuusnopeudella 10 - 20 tilavuus/tilavuutta tunnissa.

Käyttöajan lisääntyessä laskee tunnettujen katalysaattoreiden aktiivisuus riippuen reaktiolämpötilasta ennemmin tai myöhemmin.

DE-patenttijulkaisun 27 26 188 mukainen tunnettu katalysaattori omaa vielä 670 käyttötunnin jälkeen reaktiolämpötilan ollessa 60 °C 50% lähtöaktiivisuudestaan. Jotta saavutettaisiin sama isomeroitumisaste kuin alussa, voidaan sellaista katalysaattoria käyttää enää vain puolella lähtötilavuusnopeudella. 20% loppuaktiivisuus, jota pidetään alimpana taloudellisena rajana, saavutetaan 1700 käyttötunnin jälkeen.

Yllättäen havaittiin, että glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavan SiO_2 -kantajalle perustuvan katalysaattorin käyttöaikaa voidaan lisätä yli kaksinkertaiseksi, kun glukoosiliuos ennen muuntamista kantajakatalysaattorilla saatetaan kosketukseen SiO_2 - tai alumiinisilikaattikappaleiden kanssa. Massasuhde katalysaattori:kappaleet vaihtelevat välillä 3:1 ja 1:3, esim. 1:1. Näin menetellen lisääntyy katalysaattorin tuottoisuus kaksinkertaiseksi. Tuottoisuus on laskettu substraattimääränä, substraattikuiva-aineena (kg), joka yhdellä kilolla katalysaattoria tietyllä isomeroitumisasteella voidaan käyttää 20% loppuaktiivisuuteen lähtöaktiivisuudesta.

Laitteistossa, joka on erityisesti tarkoitettu jatkuvatoimiseen glukoosin muuntamiseen fruktoosiksi ja jossa laitteistossa on glukoosi-isomeraasiaktiivisuuden omaavan kantajakatalysaattorireaktorin lisäksi tarvittavat lisälaitteet kuten varasto- ja keräyssäiliöt, liitäntäjohdot, pumpput, mittauslaitteet, lämpötilansäätölaitteet ja vastaavat, on keksinnön mukaisesti reaktorin asennettu esikolonni, SiO_2 - tai alumiinisisilikaattikappaleita vasten. Esikolonnin tilavuus on suhteutettu reaktorin tilavuuteen siten, että huomioimalla katalysaattorin ja esikolonnimateriaalin syöttöpainot voidaan saavuttaa yllä mainitut massasuhteet.

Keksinnön mukaisen menetelmän toteutus tapahtuu erityisesti jatkuvatoimisesti työskennellen siten, että glukoosin vesiliuos, esim. kuiva-ainepitoisuus 40 - 50 p-%, säädetään pH-arvoon, joka on sopiva kantajaan sidotulle glukoosi-isomeraasille, lämmitetään sopivaan isomeroimislämpötilaan ja sitten pumpataan SiO_2 tai alumiinisisilikaatilla täytetyn esikolonnin läpi ja sitten glukoosi-isomeraasiaktiivisuuden omaavalla SiO_2 -kantajakatalysaattorilla täytetyn reaktorin läpi. Ulos tulevan glukoosi-fruktoosiliuoksen fruktoosipitoisuus mitataan säännöllisin väliajoin, esim. polarometrisesti tai HPLC:llä. Virtausnopeus, jolla katalysaattoria käytetään, asetetaan sellaiseksi, että ulos tulevan liuoksen fruktoosipitoisuus on 42 p-%, kuiva-aineksi laskettuna.

Esikolonnimateriaalin raekoko on 0,5 - 5,0 mm ja kantajakatalysaattorin raekooksi 0,08 - 0,5 mm on osoittautunut erityisen sopivaksi.

Kun glukoosi-isomeraasiaktiivisuuden omaavan kantajakatalysaattorin valmistamiseen on käytetty Streptomyces albus'en glukoosi-isomeraasia, on erittäin sopivaksi osoittautunut glukoosiliuoksen pH:n säätö 7,0 - 8,5:ksi ja sen lämpötilan säätäminen 55 - 65 °C:een.

Lisäksi Streptomyces albus'en glukoosi-isomeraasille on osoittautunut isomeroitumista edistäväksi tekijäksi Co(II)- ja Mg(II)-ionien lisääminen glukoosiliuokseen pitoisuuksin 0,1 -2 ppm Co(II):ta ja 10 - 200 ppm Mg(II):ta niiden vesiliukoisina suoloina kuten klorideina tai sulfaatteina.

Edelleen on hyödyllistä lisätä glukoosiliuokseen stabiloiva määrä antioksidanttia, esim. SO₂:ta, pitoisuudessa 100 -600 ppm alkalimetallisulfiittina tai -bisulfiittina.

Ennen kuin saatu glukoosi-fruktoosiliuos haihdutetaan siirapiksi tai tehdään käyttötarkoitukseensa sopivaksi liuokseksi, on suositeltavaa poistaa siitä ei-toivotut ioniset komponentit kuten esim. makua antavat ionit kationi- ja anionivaihdon avulla.

Keksintöä selvennetään seuraavien esimerkkien avulla:

Esimerkki 1.

5 g glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavalla kantajakatalysaattorilla, joka oli valmistettu DE-patenttijulkaisun 27 26 188 mukaisesti, ja jolla on alla esitetyt ominaisuudet, täytettiin reaktori, jonka eteen oli asennettu kolonni, joka oli täytetty 5 g:lla kaupallisesti saatavaa pallomuotoista veden kestävää, huokoista alumiinisilikaattia (esim. Typ KCT-WS der Kali-Chemie AG, koostumukseltaan 97 p-% SiO₂ ja 3 p-% Al₂O₃). Tämän esikolonni-reaktorijärjestelmän läpi pumattiin 60 °C:sta glukoosiliuosta. Läpivirtausnopeus säädettiin sellaiseksi (laskettuna katalysaattorille, huomioon ottaen vaaditut reaktiutilavuudet), että isomeroitumisaste pysyi koko käyttöajan vakiona 46,5%:na. Ulosvirtaavan substraattiliuoksen isomeroitumisaste mitattiin polarometrisesti. Yksityiskohdittain ovat katalysaattori, esikolonnin täyte ja menetelmä tunnettuja seuraavista parametreista:

1. Katalysaattori

- 1.1 Kantaja: SiO_2
1.2 Aktiivisuusaste: 9000 U/g
1.3 Raekoko: 0,1 - 1,2 mm
1.4 Tärypaino (kuiva) 0,45 kg/l

2. Esikolonnin täyte

- 2.1 Täyttömateriaali: KCT-WS (Kali-Chemie AG)
2.2 Raekoko: 1 - 2 mm
2.3 Tärypaino (kuiva) 0,7 kg/l

3. Menetelmä

- 3.1 Substraatti: 45 p-% glukoosin vesiliuos
3.2 Kofaktorit: 120 ppm Mg(II)
1 ppm Co(II)
200 ppm SO_2 (Na_2SO_3 :na)
3.3 pH: 7,5
3.4 Substraattitiheys: 1,2 kg/l
3.5 Substraatin syöttö-
lämpötila 60 °C
3.6 Isomeroitumisaste 46,5%
3.7 Aloitusyöttönopeus: 13,0 h⁻¹

4. Glukoosi-isomeraasiliuoksen aktiivisuuden määrittäminen

Katalysaattorin valmistukseen käytetyn glukoosi-isomeraasiliuoksen aktiivisuus määritettiin Takasakin menetelmällä (vrt. Y. Takasaki: Agr. Biol. Chem. Vol. 30, nro 12, s. 1247-1253 ja Z. Dische ja E. Borenfreud: J. Biol. Chem. 192, 583, 1951). Aktiivisuusyksikkö on määritetty entsyymimääränä, joka inkubaatio-olosuhteissa muodostaa 1 mg:n fruktoosia.

Inkubaatio-olosuhteet:

- Lämpötila: 65 °C
Reaktioaika: 1 h
Substraatti: 0,1 mol glukoosi x H_2O (Merck 8342) 0,05 mol
fosfaattipuskurissa, pH 8,0, jossa 0,0004 mol
 MgSO_4

Esimerkillä saatiin seuraavat tulokset:

Puolikäyttöaika:	1300 h
Käyttöaika 20%:n	
loppuaktiivisuuteen:	3800 h
Keskimääräinen aktiivisuus	
3800 käyttötunnin jälkeen:	44,4% (laskettuna 100%:n lähtöaktiivisuudesta)
Tuottoisuus 3800 h:n jälkeen:	26000 kg kuiva-aineena 46,5% fruktoosia/kg katalysaattoria

Esimerkki 2.

Reaktori täytettiin 5 g:lla esimerkin 1. mukaista kantajakatalysaattoria ja sen eteen oli asennettu esikolonni, jossa oli 10 g kaupallista, pallomuotoista vedenpitävää, huokoista SiO_2 :ta (esim. Typ AF 125 der Kali-Chemie AG, SiO_2 -pitoisuus suurempi kuin 99 p-%). Muut työmenetelmät olivat esimerkin 1. mukaiset. Esikolonnin parametrit olivat seuraavat:

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1. Täyte: | AF 125 (Kali-Chemie AG) |
| 2. Raekoko: | 1 - 2 mm |
| 3. Tärypaino (kuiva): | 0,45 kg/l |

Koetulokset olivat identtiset esimerkin 1. kanssa.

Esimerkki 3.

Vertailuksi toistettiin esimerkki 1. samanlaisella katalysaattorilla, ilman esikolonnia, mutta muuten samanlaisissa koeolosuhteissa.

Esimerkissä 3. saatiin seuraavat tulokset:

Puolikäyttöaika:	670 h
Käyttöaika 20%:n	
loppuaktiivisuuteen:	1700 h

Keskimääräinen aktiivisuus

1700 h:n käytön aikana: 47.2% (laskettuna 100%:n
alkuaktiivisuudesta)

Tuottoisuus 1700 h:n jälkeen: 12500 kg kuiva-ainetta 46,5%
fruktoosia/kg katalysaattoria

Esimerkkien 1., 2. ja 3. mukaisten tulosten havainnollistamiseksi esitettiin aktiivisuuden vähenemisen riippuvuus käytöstäajasta kuvassa 1. Näin esitettynä käy selvästi ilmi, että keksinnön mukaisen alumiinisilikaatti- tai SiO_2 -helmillä täytetyn esikolonnin käyttö (esimerkit 1. ja 2.) stabiloi katalysaattorin aktiivisuuden pitkän käyttöjakson aikana.

Kuvassa 2 on esitetty menetelmän ratkaiseva vaikutus tuottoisuuden verrattuna käyttöaikaan. Keksinnön mukaisissa menetelmäolosuhteissa toteutetut esimerkit 1. ja 2. nostivat katalysaattorin taloudellisesti käyttökelpoista, spesifistä suorituskkyä kertoimella 2,08, s.o. tietyn isomeroosimäärän valmistamiseksi tarvitaan vähemmän kuin puolet katalysaattorin määrästä. Koska keksinnön mukaisesti tarvittavan esikolonni-
materiaalin kustannukset ovat vain murto-osa katalysaattorin kustannuksista, on keksinnön mukaisen menetelmän taloudellinen etu huomattava.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä glukoosia ja fruktoosia sisältävän liuoksen valmistamiseksi saattamalla glukoosia sisältävä liuos kosketukseen SiO_2 -pohjaiselle kantajalle valmistetun glukoosi-isomeraasiaktiivisuutta omaavan katalysaattorin kanssa, t u n n e t t u siitä, että glukoosia sisältävä liuos saatetaan kosketukseen SiO_2 - tai alumiinisilikaattikappaleiden kanssa ennen reaktiota kantajakatalysaattorilla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että massasuhde katalysaattori: kappaleet on välillä 3:1 ja 1:3, erityisesti noin 1:1.

3. Laite menetelmän toteuttamiseksi patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisesti kantajakatalysaattorilla täytetyllä reaktorilla, t u n n e t t u siitä, että reaktorin eteen on asennettu SiO_2 - tai alumiinisilikaattikappaleilla täytetty esikolonni.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en lösning innehållande glukos och fruktos genom att bringa en glukoshaltig lösning i kontakt med en på basen av en SiO_2 -bärare framställd katalysator med glukosisomerasaktivitet, k ä n n e t e c k n a t därav, att den glukoshaltiga lösningen bringas i kontakt med stycken av SiO_2 eller aluminatsilikat före reaktionen på bärarkatalysatorn.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att massaförhållandet mellan katalysator och stycken är mellan 3:1 och 1:3, fördelaktigt ca 1:1.

3. Anordning för utförande av förfarandet enligt patentkravet 1 eller 2 med en med bärarkatalysatorn fylld reaktor, k ä n n e t e c k n a t därav, att före reaktorn anordnats en med stycken av SiO_2 eller aluminatsilikat fylld förkolonn.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

ESIMERKIT 1 JA 2

ESIMERKKI 3

