

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 150310 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4349/81

(51) Int.Cl.⁴: C 12 P 19/12
C 12 P 19/18

(22) Indleveringsdag: 01 okt 1981

(41) Alm. tilgængelig: 10 apr 1982

(44) Fremlagt: 02 feb 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 09 okt 1980 DE 3038219

(71) Ansøger: *SUEDEDEUTSCHE ZUCKER-AKTIENGESSELLSCHAFT; Mannheim, DE.

(72) Opfinder: Mohammad *Munir; DE.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af isomaltulose
ved enzymatisk omdannelse af saccharose

(57) Sammendrag:

4349-81

Fremstilling af isomaltulose (6-D- α -D-glucopyranosido-D-fructose) ved enzymatisk omdannelse af saccharose under anvendelse af immobiliserede celler fra en bakteriekultur, eksempelvis ved anbringelse af enzympræparatet i en reaktorsøjle, hvorigennem man leder en højkoncentreret (45 - 75 vægt-%, fortrinsvis 65 - 75 vægt-%) opløsning af overvejende ren saccharose.

Man opnår herved en høj omdannelsesgrad og ringe produktion af melasse og uden de energitab og metabolismetab, der er knyttet til anvendelsen af levende bakterier i tyndere næringssubstrater.

DK 150310 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af isomaltulose (6-0- α -D-glucopyranosido-D-fructose) ved enzymatisk omdannelse af saccharose og påfølgende krystallisation af den således dannede iso-

5 maltulose.

Isomaltulose er et mellemprodukt ved fremstilling af glucopyranosido-1,6-mannit (DE fremlæggeskrift nr. 2 520 173) og glucopyranosido-1,6-sorbit (isomaltit, DE patentskrift nr. 2 217 628). Begge disse stoffer meta-

10 boliseres og resorberes ikke i organismen og er derfor velegnede som erstatningsstoffer for sukker, f.eks. som sødemiddel og strukturgivende fyldstoffer i nærings- og nydelsesmidler til diabetikere.

Fra DE patentskrift nr. 1 049 800 er det kendt, at saccha-

15 rose kan omlejres enzymatisk til isomaltulose. De herved virksomme enzymer er af mikrobiel oprindelse. Virksomme ved denne omlejring er foruden *Protaminobacter rubrum* andre bakterier, såsom *Erwinia carotovora*, *Serratia marcescens*, *Serratia ply-*

20 *muthica* og *Leuconostoc mesenteroides* (S. Schmidt-Berg-Lorenz, W. Mauch, Zeitschrift für die Zuckerindustrie 14, 625 - 627 (1964); F.H. Stodola, 126th Meeting, Amer. Chem. Soc., Sept. 1954, Abstracts of papers, S. 5 D; W. Mauch, S. Schmidt-

25 Berg-Lorenz, Zeitschrift für die Zuckerindustrie 14, 309 - 315 og 375 - 383 (1964).

Fra DE patentskrift nr. 2 217 628 og det tilsvarende GB patentskrift nr. 1 429 334 er det endvidere kendt, at man kan gennemføre den enzymatiske omdannelse af saccharose til isomaltulose batchvis eller kontinuert i en 15 - 40 %'ig

30 opløsning under kraftig omrøring og under aerobe betingelser ved 20 - 37 °C.

Fra DE offentliggørelsesskrift nr. 2 806 216 er det kendt, at man kan gennemføre kontinuerlig dyrkning af isomaltulose-dannende mikroorganismer under samtidig omdannelse af saccharose til isomaltulose.

De ovenfor omtalte fremgangsmåder er behæftet med en række ulemper, bl.a.:

- 5 a) at de levende cellekulturer under deres formering udnytter en del af den tilsatte saccharose til deres egen livsvirksomhed (vækst og formering), hvorved denne del af saccharosen går tabt for omsætningen til isomaltulose;
- 10 b) at omdannelsen af saccharose til isomaltulose og den samtidigt forløbende celleformering kræver en fermentering under kraftig omrøring og beluftning, hvilket igen er forbundet med et højt energiforbrug;
- 15 c) at koncentrationen af næringssubstratet på 25% (DE offentliggørelsesskrift nr. 2 806 216), henholdsvis på 15 - 40 % (DE offentliggørelsesskrift nr. 2 217 628) er for ringe til påfølgende indvinding af isomaltulosen ved direkte krystallisation; idet den omdannede saccharoseopløsning efter fraseparering af cellemassen skal inddampes, før den kan underkastes krystallisation, således at man ud fra 100 kg omsat saccharoseopløsning ifølge DE offentliggørelsesskrift
20 nr. 2 806 216 må afdampe ca. 67 kg vand, før isomaltulosen udkrystalliserer;
- 25 d) at cellemassens formering ikke alene kræver en egenet carbonkilde, men ligeledes nitrogenkilder og næringssalte.

Ved de ovenfor omtalte fremgangsmåder sker tilførselen af nitrogen og næringssalte ved, at man i stedet for rene saccharoseopløsninger anvender sukkeropløsninger af ringere renhed, således som de forekommer i en sukkerfabrik. Disse forureninger (ikke-sukkerstoffer) er på
30 den ene side ubetinget nødvendige for cellevæksten, og på den anden side forårsager de tab af isomaltulose gennem dannelse af melasse ved krystallisationen.

De ovennævnte ulemper kan principielt undgås, når det lykkes, at adskille omdannelsen af saccharose til isomaltulose fra celleformeringen og at stabilisere den over længere tid.

- 5 Til den kendte teknik hører endvidere immobilisering af hele celler, jfr. f.eks. I. CHIBATA (Immobilized Enzymes, John Wiley and Sons, New York, London, 1978).

10 Det har nu overraskende vist sig, at det er muligt i rene saccharoseopløsninger at omdanne saccharosen til isomaltulose ved hjælp af immobiliserede celler af isomaltulose-dannende mikroorganismer, under i det følgende nærmere beskrevne betingelser.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde, af den ovenfor angivne art, som er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

- 15 Denne løsning repræsenterer et overraskende teknisk fremskridt, idet man ikke kunne forvente, at isomaltulose-dannende mikroorganismer, f.eks. Protamino-bacter rubrum (CBS 574.77) var i stand til at omdanne saccharosen til isomaltulose i død tilstand.
- 20 Det er endvidere overraskende, at man kan arbejde med rene saccharoseopløsninger med en sådan høj koncentration og derved frembringe isomaltulose med høj renhedsgrad.

- 25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen udviser bl.a. følgende fordele:

- a) Den isomaltuloseholdige opløsning kan straks uden forudgående inddampning bringes til krystallisation, hvorved man opnår en betydelig energibesparelse.

- b) Anvendelsen af døde celler forhøjer udbyttet af isomaltulose, eftersom der ikke længere behøves saccharose til bakteriemassens metabolismer.
- 5 c) Isomaltulose-udbyttet forøges yderligere derigennem, at man kan anvende rene saccharoseopløsninger, og dermed i meget stort omfang undgå dannelsen af melasse.
- 10 d) Eftersom saccharoseopløsninger med koncentrationer på mere end 65 vægt-% er mikrobiologisk stabile, kan man give afkald på en sterilisation af substratet.
- e) På grund af de højere koncentrationer af substratet skal man behandle mindre rumfang og derved kan man klare sig med mindre apparatur.
- 15 f) Formeringen af bakteriemassen til fremstilling af immobiliserede celler kan gennemføres under optimale vækstbetingelser, og man behøver således ikke længere at gå ind på et kompromis mellem de optimale betingelser for omdannelse til isomaltulose og for bakterievæksten.
- 20 g) Man kan anvende et billigt næringssubstrat, f.eks. fortyndet melasseopløsning, til fremstilling af bakteriemassen.
- I beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 4760/80 og dansk patentansøgning nr. 3700/81, som begge først er blevet offentligt tilgængelige efter den foreliggende ansøgnings prioritetsdag, omtales fremstilling af isomaltulose ved enzymatisk omdannelse af saccharose ved hjælp af immobiliserede celler af isomaltulose-dannende mikroorganismer, men kun gennemført ved temperaturer under 40 °C.
- 25
- 30

- Til indvinding af de celler, der skal immobiliseres til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, gennemføres en optimal celleformering i et næringssubstrat, der kun indeholder ca. 5 vægt-% tørstofindhold.
- 5 Næringssubstratet kan indeholde tyksaft (et mellemprodukt i sukkerindustrien), majsstøbevand og $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. For-
- delagtig er dog anvendelsen af et betydeligt billigere næringsmedium, som kun består af sukkerroemelasse og $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Til fremstilling af dette næringssubstrat
- 10 fortyndes melassen med destilleret vand til et tørstofindhold på 5 vægt-%. Som yderligere nitrogenkilde og phosphatkilde tilsættes 0,1 kg $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ til 100 kg af denne opløsning. pH-Værdien indstilles på 7,2 ved hjælp af NaOH, KOH eller HCl.
- 15 Celler fra en podning med en isomaltulose-dannende mikroorganisme, f.eks. Protaminobacter rubrum (CBS 574.77), bortskylles med 10 ml sterilt næringssubstrat af ovennævnte sammensætning og dyrkes i 200 ml af det samme næringssubstrat ved 20 °C. Så snart kimtallet
- 20 i rystekolbekulturen har nået 5×10^9 kim/ml, overføres kulturen til en mini-fermentor med næringssubstrat af ovenfor beskrevne sammensætning, og den videreformeres ved 20 °C med højst mulig beluftningshastighed og omrøringshastighed. Kontrollen med formeringen sker
- 25 ligesom ved rystekolbekulturen ved bestemmelse af kimtallet. Så snart kimtallet har nået 5×10^9 kim/ml, kan man indhøste fermentorens indhold.

Til immobilisering af de således opnåede celler egner sig principielt alle de metoder til immobilisering af

30 hele celler, der er omtalt af I. CHIBATA (Immobilized Enzymes, John Wiley and Sons, New York, London 1978). Særligt egnede er følgende metoder:

- a) Fermentorens indhold tilsættes enten i selve fermentoren eller i en anden beholder en 1%-ig opløsning af kation-aktivt flokkuleringsmiddel. Den nødvendige mængde flokkuleringsmiddelopløsning må fastlægges i et forudgående forsøg. Man lader den udflokkulerede cellemasse sedimentere, fraseparerer den ovenfor værende væske, vasker bundfaldet 2 gange med phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0). Derpå afvandes cellemassen til en pasta, der lader sig ekstrudere. Den ekstruderes til stænger, tørres, formales og sigtes.
- b) Til 10 liter af fermentor-væsken tilsætter man under langsom oprøring 0,5 - 2,0 liter af en 0,2%-ig opløsning af chitosan. Den udflokkulerede cellemasse vaskes med phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0), afvandes i en centrifuge, f.eks. en bægercentrifuge eller en kappecentrifuge, ekstruderes til stænger, tørres, formales og sigtes.
- c) Cellemassen separeres fra fermentorvæsken i en centrifuge. 5 - 20 g af denne cellesuspension (tørstofindhold ca. 10%) bringes i suspension i 45 - 60 ml Na-alginatopløsning (8 g i 100 ml), og tildryppes gennem en kanyle (tværsnit 0,55 mm) til en 2%-ig CaCl_2 -opløsning. De således opståede perler omrøres yderligere ca. 15 min. i CaCl_2 -opløsningen og udvaskes derpå med vand. Perlerne tørres ca. 20 timer ved stuetemperatur.
- d) Cellemassen fraseparerer fra fermentorvæsken i en centrifuge, vaskes med phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) og lyophiliseres.
- 15 g cellulosediacetat opløses i en blanding af dimethylsulfoxid og acetone (6 : 4) ved 90 °C under tilbagesvaling. Efter afkøling til 30 °C tilsætter man 3 - 30 g lyophiliserede celler. Denne suspension tildryppes ved hjælp af en injektionsprøjte (kanyle 0,8 mm) til vand ved stuetemperatur. De dannede perler tørres.

- e) Cellemassen separeres fra fermentor-væsken i en centrifuge. 5 g af denne cellemasse bringes i suspension i 5 ml fysiologisk kogsaltopløsning ved 45 - 50 °C. 1,7 K-carrageenan (opløseligt polysaccharid-thioester) opløses i 34 ml fysiologisk kogsaltopløsning ved 45 - 60 °C. De 2 opløsninger blandes og holdes i 30 min. ved 10 °C. Den således dannede gel hærdes i kold 0,3 molær KCl-opløsning og brækkes derpå i ca. 3 mm store stykker.
- f) Til fermentor-væsken sættes enten i selve fermentoren eller i en anden beholder først en 1%-ig opløsning af et kationaktivt flokkuleringsmiddel og derpå en 1%-ig opløsning af et anionaktivt flokkuleringsmiddel. De nødvendige mængder flokkuleringsmiddel må fastlægges i et forudgående forsøg. Den udflokkulerede cellemasse får lov til at sætte sig, vaskes med phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0), ekstruderes til stænger, tørres, formalises og sigtes.

De præparater, som er fremstillet ved de ovenfor anførte metoder, skal som nævnt tværbindes for at undgå en udblødning af cellerne.

- 20 Hertil anvendes bifunktionelle reagenser, såsom f.eks. glutaraldehyd. Man kan imidlertid ikke arbejde med de sædvanligvis anvendte koncentrationer af glutaraldehyd på 2,5 - 5,0% ved en kontakttid på 30 - 45 min., idet det har vist sig, at alle immobiliserede præparater
- 25 under sådanne betingelser blev fuldstændig inaktiverede. Som optimale tværbindingsbetingelser ved den foreliggende fremgangsmåde har man fastlagt en koncentration på 0,1% glutaraldehyd og en behandlingstid på 10 min.

- 30 De ved en af de ovenfor beskrevne metoder immobiliserede og tværbundne celler kan fyldes på en egnet søjlereaktor. Denne reaktor må kunne temperaturreguleres og udvise et forhold mellem diameter og tykkelse på 1 : 1 til 1 : 20, for-

trinsvis 1 : 1 til 1 : 10, især 1 : 1,5 til 1 : 5. Rene saccharoseopløsninger (65 - 75 vægt-%) pumpes gennem søjlen ved en temperatur på 40 - 60 °C enten ovenfra og nedefter eller nedefra og opefter. Herved indstilles strømningsha-
5 stigheden således, at man opnår en kontakttid på 1 - 10, fortrinsvis 4 - 7 timer (dette svarer til 0,2 - 0,8 g saccharose, fortrinsvis 0,4 - 0,6 g saccharose, pr. g immobiliserede cel-
ler (tør tilstand) pr. time). Den tilførte saccharose bliver herved fuldstændig omdannet, hvorved der opstår ca. 1% glu-
10 cose, 4% fructose, 82% isomaltulose og 13% 1-0- α -D-glucopy-
ranosido-D-fructose.

En del af isomaltulosen kan udvindes krystallinsk ved simpel afkøling af opløsningen. Ved inddampning og afkøling kan man fra moderluden udkrystallisere en yderligere mængde isomal-
15 tulose, således at man alt i alt kan indvinde 91,5% af den dannede isomaltulose krystallinsk.

En fordelagtig udformning af fremgangsmåden består i, at man leder saccharoseopløsninger hurtigere gennem søjlen, således at kun ca. 75 - 80% af saccharosen omdannes. Ud fra produkt-
20 strømmen kan man udkrystallisere en del af isomaltulosen ved afkøling og efter supplerende tilsætning af frisk saccharoseopløsning lede resten endnu en gang igennem søjlen. For-
delen ved denne fremgangsmåde består i, at man gennem den kortere kontakttid undertrykker dannelsen af 1-0- α -D-glucopy-
25 ranosido-D-fructose, og at man som totaleffekt kan opnå et højere udbytte af det ønskede produkt isomaltulose.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af to eksempler:

EKSEMPEL 1

- 30 a) Man bortskyller celler fra en podning af stammen *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77) med 10 ml af et sterilt næringssubstrat, som består af 8 kg tyksaft fra en sukkerfabrik (tørstofindhold = 65%), 2 kg majsstøbevand, 0,1 kg

(NH₄)₂HPO₄ og 89,9 kg destilleret vand, efter behov indstillet på pH 7,2. Denne suspension tjener som podemateriale for en forkultur i rystemaskine i 1 liter kolber med 200 ml næringsopløsning af ovenfor beskrevne sammensætning.

Efter 30 timers dyrkning ved 29°C podes 16 l næringsopløsning af ovennævnte sammensætning i en 30 l mini-fermentor med indholdet af 20 kolber (4 l), og der fermenteres ved 29 °C med 20 l luft pr. min. og en omrøringshastighed på 350 omdr/min. Det tiltagende kimtall bestemmes mikroskopisk. Efter man har opnået et kimtall på 5×10^9 kim/ml overføres fermentorens indhold til en anden beholder, hvortil tilsættes et kationaktivt flokkuleringsmiddel (som f.eks. "Primaflor" C 7 fra firmaet Rohm & Haas, Philadelphia/USA). Man lader de udflokkede celler sætte sig, fradekanterer, vasker med 0,1 M phosphatpuffer pH 7,0 og fjerner vandet ved centrifugering. Massen ekstruderes derpå til stænger, lufttørres og formales.

b) Sigtefraktionen 0,3 til 0,8 mm af det ovenfor udvundne præparat omrøres i en 0,1%-ig glutaraldehydopløsning i 10 min., vaskes med phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) og fyldes under vand på en søjle, hvis temperatur kan reguleres. Søjlen opvarmes derpå til 50 °C og gennemstrømmes kontinuerligt med en 70 vægt-%-ig saccharoseopløsning. Strømningshastigheden afpasses derved således, at man ved søjlens udløb ikke længere kan påvise nogen saccharose. Den på denne måde indvundne isomaltuloseopløsning overføres til en nedkølingskrystallisator, køles til 20 °C, og den udkrystalliserede isomaltulose frasepareres fra moderluden i en sigtekurvscentrifuge.

EKSEMPEL 2

Man bortskyller celler fra et podemateriale af stammen *Prot-aminobacter rubrum* (CBS 574.77) med 10 ml af et sterilt næringssubstrat, som består af 6,25 kg roemelasse (tør-

stofindhold 80%), 0,1 kg $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ og 93,65 kg destilleret vand (om nødvendigt indstillet til pH 7,2 ved hjælp af HCl). Denne suspension tjener som podemateriale for en forkultur i rystemaskine i 1 liter kolber med 200 ml næringsopløsning af

5 den ovenfor beskrevne sammensætning. Efter en dyrkningstid på 30 timer ved 29 °C podes 16 l næringsopløsning af den ovenfor beskrevne sammensætning med indholdet af 20 kolber (4 l) i en 30 l mini-fermentor, og der fermenteres ved 29 °C med 20 l luft pr. min. og en omrøringshastighed på 350 omdr./min.

- 10 Man går videre analogt med fremgangsmåden beskrevet i eksempel 1 a) og 1 b).

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af isomaltulose (6-0- α -D-glucopyranosido-D-fructose) ved enzymatisk omdannelse af saccharose og påfølgende krystallisation
5 af den således dannede isomaltulose, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymatiske omdannelse gennemføres ved, at man ved 40 - 65 °C kontinuerligt fører rene saccharoseopløsninger med koncentrationer på 45 - 75 vægt-%, fortrinsvis 65 - 75 vægt-%, gennem en med immobiliserede
10 celler af isomaltulose-dannende mikroorganismer fyldt reaktor, hvilke mikroorganismeceller, eventuelt efter indeslutning i en matrix, er blevet tværbundet med et bifunktionelt reagens i en mængde, der ikke bevirker inaktivering af præparatet.
- 15 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte mikroorganismer er *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77), *Serratia plymuthia* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285) eller *Leuconostoc mesenteroides* [NRRL B-51F (ATCC 10830a)], fortrinsvis
20 *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77).
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte immobiliserede celler tværbindes med glutaraldehyd eller cyanursyrehalogenid.
4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte celler immobiliseres ved flokkulering med et kationaktivt eller et anionaktivt flokkuleringsmiddel eller med en kombination af disse.
25

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte celler er blevet udflokkuleret ved hjælp af chitosan.

5 6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte celler er blevet indesluttet i en calciumalginat-matrix.

10 7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte celler er blevet indesluttet i cellulosediacetat eller celloseetriacetat.

8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte celler er blevet indesluttet i K-carrageenan-gel.

Fremdragne publikationer:

DK 4760/80, 3700/81 (PL § 2.2.3) (patent nr. 148776)
GB patent nr. 1429334.