



F100096323B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT**  
**C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 10 06 1996**

96323

(51) Kv.1k.6 - Int.c1.6

C 12P 7/02, C 12S 3/00, 13/00, B 09B 3/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	946053
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	23.12.94
(24) Alkuperäinen - Löpdag	23.12.94
(41) Tulnut julkiseksi - Blivit offentlig	29.02.96
(44) Nähtävääksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.02.96

(71) Hakija - Sökande

1. Eriksson Capital AB, Ekonomiegatan 1, 22100 Mariehamn, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Viikari, Liisa, Lokkikuja 5 F, 00200 Helsinki, (FI)
2. Mustranta, Annikka, Kiiltokalliontie 16, 02180 Espoo, (FI)
3. Ojamo, Heikki, Veijolantie 15, 08150 Lohja, (FI)
4. Itävaara, Merja, Oravatie 11, 02400 Kirkkonummi, (FI)
5. Johansson, Tor, Koivuniemenkatu 37 D 30, 10650 Tammisaari, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Forssén &amp; Salomaa Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä makkarankuorien ja muiden selluloosapitoisten aineiden liuottamiseksi entsyymiliuoksen avulla**  
Förfarande för upplösning av korvskinn och andra cellulosahaltiga ämnen med hjälp av en enzymlösning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 72533 (C 12P 19/02), GB A 2107320 (C 12P 19/02), US A 5348871 (C 12S 1/00),  
Process Biochem 22 (6) (1987) 173-180

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä makkarankuorien ja muiden pääasiassa selluloosaa sisältävien aineiden hävittämiseksi liuottamalla entsyymiliuoksen avulla. Menetelmässä lisätään entsyymejä vesiliuoksen sisältävään reaktoriin, jonka jälkeen tai ennen liuotettavat aineet lisätään reaktoriin. Liuotettavien aineiden osittaisen tai täydellisen liukenemisen annetaan tapahtua, jonka jälkeen lisätään uusi erä liuotettavia aineita reaktoriin. Kun entsyymit ovat adsorboituneet uusiin liuotettaviin aineisiin, aiemmin liuenneet aineet sisältävä liuos otetaan talteen erottamalla liuos ja liuotettavat aineet toisistaan, jolloin liuotettaviin aineisiin lisätään vettä ja haluttaessa edelliset vaiheet toistetaan haluttu määrä kertoja.

Uppfinningen avser ett förfarande för att förstöra korvskinn och andra ämnen som i huvudsak innehåller cellulosa genom upplösning med hjälp av enzymer. Vid förfarandet tillsätter man enzymer i en reaktor som innehåller en vattenlösning, efter vilket eller före vilket ämnena som skall lösas upp tillsätts reaktorn. Efter en partiell eller fullständig upplösning av ämnena tillsätts en nyt sats ämnen som skall upplösas i reaktorn. Då enzymerna adsorberats i de nya ämnena som skall lösas upp, återvinns de tidigare upplösta ämnena genom separering av lösningen och ämnena som skall lösas upp från varandra, varvid vatten tillsätts ämnena som skall lösas upp och vid behov upprepas föregående skeden önskat antal gånger.

Menetelmä makkarankuorien ja muiden selluloosapitoisten  
aineiden liuottamiseksi entsyymiliuoksen avulla  
Förfarande för upplösning av korvskinn och andra  
cellulosahaltiga ämnen med hjälp av en enzymlösning

5

Keksinnön kohteena on menetelmä makkarankuorien ja muiden pääasiassa selluloosaa sisältävien aineiden hävittämiseksi liuottamalla entsyymiliuoksen avulla.

10

"Makkarankuorella" tarkoitetaan tässä hakemuksessa kuitusuolta (engl. fibrous casing) tai selluloosa- tai sellofaanisuoilta tai muuta selluloosapohjaista suoilta.

Makkaratehtailla on tarve hävittää makkarankuoria, joista syntyy paljon jätettä. Tähän  
15 asti niistä yleensä on päästy eroon yksinkertaisesti viemällä kaatopaikalle. Eräs  
käytetty menetelmä on myös niiden kompostointi kosteissa olosuhteissa, mikä on  
hankalaa, koska eri tekijöitä, kuten hapensaantia ja lämpötilaa on säädettävä. Eräs  
aiemmin käytetty menetelmä on myös niiden polttaminen.

20 Tämän keksinnön tavoitteena on aikaansaada makkarankuorten hävittäminen entsyymi-  
hydrolyysin avulla siten, että menetelmä on taloudellisesti kilpailukykyinen.

Siten keksinnön mukainen menetelmä on tunnettu siitä, että menetelmässä suoritetaan  
seuraavat vaiheet:

25

- a) lisätään sellulaasientsyymejä vesiliuoksen sisältävään reaktoriin,
- b) ennen vaihetta a) tai sen jälkeen liuotettavat aineet lisätään reaktoriin,
- 30 c) annetaan liuotettavien aineiden osittaisen tai täydellisen liukenemisen tapahtua,  
jonka jälkeen

- d) lisätään uusi erä liuotettavia aineita reaktoriin,
- e) kun entsyymit ovat adsorboituneet uusiin liuotettaviin aineisiin, vaiheessa c) aiemmin liuenneet aineet sisältävä liuos otetaan talteen erottamalla liuos ja liuotettavat aineet toisistaan, jolloin
- 5
- f) liuotettaviin aineisiin lisätään vettä ja haluttaessa vaiheet c-f toistetaan haluttu määrä kertoja.
- 10 Siten keksinnöllä saadaan taloudellinen menetelmä kuorten liuottamiseksi entsyymien avulla, koska entsyymit saadaan talteen ja ne jälleenkäytetään seuraavaa liuotusta varten. Käytännössä menetelmässä kuitenkin yleensä tapahtuu jonkun verran entsyymin hävikkiä, jolloin tietty määrä entsyymejä lisätään edullisesti missä vain halutussa ajankohdassa reaktoriin. Tämä on kuitenkin pieni määrä verrattuna hydrolyysissä
- 15 tarvittavaan kokonaismäärään.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä hävitettävät kuoret ja mahdollisesti muu selluloosapitoinen aine liuotetaan reaktorissa, joka sisältää entsyymiliuosta. Tällöin entsyymit tarttuvat makkaranukuoreen ja hydrolyysireaktio näiden liuottamiseksi käynnistyy. Tämän reaktion annetaan tapahtua, kunnes vaadittava osa, mieluummin kaikki,

20 liuotettavista kuorista on liennut, jonka jälkeen lisätään uusi erä hävitettäviä kuoria reaktoriin, jolloin entsyymit adsorboituvat uusiin kuoriin. Reaktorista otetaan talteen liuos, jossa kuorien hajoamistuotteet eli sokerit ovat. Nämä hajoamistuotteet, joita usein yksinkertaisesti mitataan pelkistävinä sokereina, muodostuvat pääasiassa oligo- ja

25 monosakkarideista, viimeksimainitut pääasiassa glukoosista.

Menetelmän eräessä suoritusmuodossa menetelmää voidaan siten käyttää esim. glukoosin valmistamiseen, jota siten saadaan sivutuotteena kun kuoria hävitetään.

Menetelmässä kuorten pilkkoutumista voidaan seurata ajan, entsyymi- ja/tai kuoripitoisuuden funktiona ja/tai määrittämällä hydrolysaattiliuoksesta glukoosin ja pelkistävien sokereiden pitoisuuksia sekä liukenemattoman ja liukoisen kuiva-aineen määrää.

- 5 Käytetyt entsyymit ovat sellulaasipreparaatteja, edullisesti kaupallisia ja helposti saatavilla olevia, jotka pilkkovat selluloosaa molekyylipainoltaan pienemmiksi hiilihydraateiksi. Lopputuotteen koostumus ja glukoosin osuus liuenneista hiilihydraateista riippuu käytetyn sellulaasipreparaatin eri aktiivisuuksien suhteesta.
- 10 Kun menetelmää samalla käytetään glukoosin valmistamiseen, reaktoriin lisätään edullisesti myös  $\beta$ -glukosidaasientsyymiä, joka tuottaa glukoosia sellobioosidisakkariidista ja oligosakkarideista.  $\beta$ -glukosidaasi myös estää sellobioosin aiheuttamaa sellulaasien inhibitiota. Koska  $\beta$ -glukosidaasi ei tartu makkarankuoriin, se kiinnitetään edullisesti kiinteään kantajaan. Tällaisen immobilisoidun  $\beta$ -glukosidaasin käyttö
- 15 mahdollistaa myös tämän entsyymin kierrättämisen.

Entsyymi- ja kuorikonsentraatiosta riippuen kuoret saadaan jo 2-5 tunnissa liukenemaan. Käytännössä hydrolyysi aika valitaan entsyymien sopivalla annostelulla myös sen mukaan, mikä tehtaan kannalta on edullisinta käytettävissä olevien laitteiden, kuoriker-

20 tymän ja sen lisäyksen kannalta sekä entsyymikustannusten kannalta.

Entsyymikustannusten alentamiseksi sellulaaseja edullisesti kierrätetään puolijatkuvissa panohydrolyyseissä siten, että entsyymit sidotaan hydrolyysin jälkeen uusiin kuoriin ja talteenotettu sokeriliuos korvataan mielellään puskuri- tai vesiliuoksella seuraavaa

25 hydrolyysiä varten. Hydrolyysi toimi useita viikkoja samalla teholla ainoastaan pienellä korvaavalla entsyymilisäyksellä. Myös  $\beta$ -glukosidaasin lisäystä tarvitaan hydrolyysitason ylläpitämiseksi vakiona, koska se ei tartu kuoriin, eikä siten ole uudelleen käystettävissä. Kun  $\beta$ -glukosidaasi kuitenkin sidotaan kiinteään kantajaan, samaa entsyymierää voidaan kierrättää useita viikkoja puolijatkuvassa hydrolyysissä ilman

30 sokerisaantojen alenemista. Siten puolijatkuvista hydrolyysikokeista voidaan arvioida

seuraava entsyymikulutus, kun uusi entsyymipanostus (30 FPU Econasea ja 1000 nkat  $\beta$ -glukosidaasia/g kuorta) tapahtuu 150 vuorokauden välein.

Econase: 0,7 FPU/g kuorta

- 5 Immobilisoitu  $\beta$ -glukosidaasi: 6,7 nkat/g kuorta.

nkat = nanokataali, joka on entsyymiaktiivisuuden yksikkö. Yksi nanokataali tuottaa yhden nanomoolin reaktiotuotetta sekunnissa tai vastaavasti hajottaa tai muuttaa yhden nanomoolin lähtöainetta sekunnissa analyysimenetelmässä käytettävissä olosuhteissa.

10

Kokonaan uuden entsyymipanostuksen tarve riippuu monesta käytännön tekijästä tehtaan toiminnassa. Näitä on esim. entsyymien inaktivoituminen ja poistuma, kuoriker-  
tymä, hydrolyysiin käytettävissä oleva aika, laitteiston likaantuminen yms.

- 15 Reaktiotuotetta voidaan käyttää myös rehuna.

Seuraavassa keksintöä selostetaan kuvioiden avulla, joiden yksityiskohtiin keksintöä ei ole tarkoitus rajata.

- 20 Kuvio 1 on kaaviokuva keksinnön mukaisesta prosessista.

Kuviossa 2 on lohkokaavio keksinnön mukaisen menetelmän vaiheista kun entsyymiä kierrätetään.

- 25 Kuviossa 3 on lohkokaavio keksinnön mukaisen menetelmän vaiheista ilman entsyymien kierrätystä tai kun hydrolyysi suoritetaan vain kerran.

Käytännössä voidaan käyttää kahta tai useampaa panosreaktoria 1 kuvion 1 mukaisesti (esim. 5 m<sup>3</sup>/500 kg kuorta/d), joissa hydrolyysiaika on esim. 24 tuntia tai enemmän.

- 30 Hydrolyysiaika voi vaihdella riippuen tehtaan käytännön toiminnasta. Reaktorit 1 ovat edullisesti vaipallisia 3 (lämpötilasäätö) sekoittimella 2 varustettuja säiliöitä, joissa on

siiviläpohja 4 sekoittimen yläpuolella. Reaktoreita syötetään erillisestä syöttö/kuortenkeruu -säiliöstä 5 yhdettä 6 pitkin. Kun tietyn reaktorin 1 hydrolyysi on valmis, lisätään hydrolysaattiin uusi panos kuoria, joihin sellulaasit adsorboituvat. Kun adsorptio on tapahtunut, pysäytetään sekoitus ja lasketaan liuos siiviläpohjan 4 läpi tuoteastiaan 5 9 yhdettä 7 pitkin. Reaktoriin lisätään vettä yhdettä 8 pitkin ja sekoitusta ja hydrolyysiä jatketaan. Imobilisoitu  $\beta$ -glukosidaasi pysyy reaktorissa siivilän 4 pidättämänä.

Vaihtoehtoisesti liukenematon kuiva-aine, kuoret, joihin entsyymit ovat sitoutuneet ja imobilisoitu  $\beta$ -glukosidaasi voidaan erottaa hydrolysaatista sentrifugoimalla, suodattamalla tai muilla tunnetuilla kiintoaineen erotusmenetelmillä. Erotettu liukenematon 10 kuiva-aine palautetaan reaktoriin, joka tässä tapauksessa on mikä tahansa vaipallinen sekoitettu säiliö ilman välipohjaa.

Liukenemattomat aineet poistetaan halutuun väliajoin reaktorista sopivassa prosessin 15 vaiheessa.

Seuraavassa esitetään esimerkkejä, joissa on tietoja keksinnön mukaisen menetelmän yksityiskohtaisesta suorittamisesta.

## 20 ESIMERKIT

### JOHDANTO

Käyttämättömiä ja käytettyjä makkarankuoria liuotettiin entsyymaattisesti kolmella 25 kaupallisella sellulaasipreparaatilla, Alkon valmistamalla Econasella sekä Genencorin valmistamalla Spezyme CE- ja Spezyme CP- sellulaaseilla. Kuorten hydrolyysiä seurattiin ajan sekä entsyymi- ja kuoripitoisuuden funktiona määrittämällä glukoosin ja pelkistävien sokereiden pitoisuudet sekä liukenemattoman ja liunneen kuiva-aineen määrit. Hydrolyysin tehostamiseksi  $\beta$ -glukosidaasientsyymi (Novozym 188, Novo) 30 kiinnitettiin kiinteään kantajaan.

## KUORTEN KOOSTUMUS

Käytetyissä kuorissa oli melko paljon rasvaa (14,9 % kuiva-aineesta) ja proteiinia (10,5 % kuiva-aineesta). Liukenemattoman kuiva-aineen osuus oli pienempi ja liukoisen 5 kuiva-aineen osuus suurempi kuin käyttämättömissä kuorissa (Taulukko 1).

Taulukko 1. Makkarankuorten koostumus

	Käyttämättömät kuoret	Käytetyt kuoret	
10			
	Kuiva-aine	80 %	70 %
	Liukenematon kuiva-aine	72 %	53 %
	Liukoinen kuiva-aine	8 %	17 %
	Rasva	0,20 % ka:sta	14,9 % ka:sta
15	Proteiini	0,22 "	10,5 "

## KÄYTETYT ENTSYYMIT

20

Kuorten liuotuskokeissa käytettiin kaupallisia sellulaasipreparaatteja, joiden entsyymiaktiivisuudet erosivat jonkin verran toisistaan (taulukko 2).

### Sellulaasipreparaatit:

25

- Econase CE (Alko)
- Spezyme CE (Genencor International)
- Spezyme CP (Genencor International)

### $\beta$ -glukosidaasi:

30

- Novozym 188 (Novo)

Sellulaasipreparaattien FPU- (suodatinpaperia hydrolysoiva aktiivisuus) ja HEC- (hydroksietyyliselluloosaa hydrolysoiva aktiivisuus) aktiivisuuksilla kuvataan selluloosaa pilkkovia ekso- ja endoaktiivisuuksia. Endo-glukanaasit pilkkovat sidoksia selluloosaketjun keskeltä tuottaen erikokoisia oligosakkarideja ja ekso-glukanaasit vapauttavat sellobioosiyksiköitä ketjujen päistä.  $\beta$ -Glukosidaasi tuottaa glukoosia disakkarideista ja oligosakkarideista.

Taulukko 2. Käytettyjen sellulaasipreparaattien aktiivisuudet

Aktiivisuus	Econase	Spezyme CE	Spezyme CP	Novozym
FPU U/ml	31	49	67	0,06
HEC nkat/ml	13500	16400	23100	291
$\beta$ -glukosidaasi nkat/ml	1028	450	1078	7350
$\beta$ -glukosidaasi/FPU	33	9	16	
proteiini mg/ml	85	109	121	63

## PANOSHYDROLYYSIT

### 20 Reaktio-olosuhteet

Makkarankuorten panoshydrolyysit tehtiin kartiopulloissa ravistelevassa vesihauteessa (150 rpm). Näytteeksi otettiin koko pullon sisältö, josta määritettiin sokeri- ja kuiva-ainepitoisuudet. Reaktioseoksen koostumus oli:

25

- 1-3 g kuorta tuorepainona (50-150 g/l)
- 19 ml 50 mM asetaattipuskuria, pH 5,0
- 1 ml entsyymilaimennosta

Entsyymit annosteltiin preparaattien FPU-aktiivisuuden mukaan (2-30 FPU/g kuorta) hydrolyysiseoksiin.

5 Reaktiot tehtiin laimeassa puskurissa pH 5:ssä, koska sellulaasit toimivat parhaiten lievästi happamissa olosuhteissa. Puskurointi ei kuitenkaan ole välttämätöntä, koska kuorten vesiliuoksen pH on säätämättä 5 eikä se muutu hydrolyysin aikana.

Reaktiolämpötilana käytettiin 50 °C, joka on optimaalinen sellulaasien toiminnalle. Lämpötila voi olla myös alempi, esim. 30-50 °C.

10

Käytetyt kuoret hydrolysoituivat yhtä hyvin kuin käyttämättömät kuoret.

15 Kuorien sisältämä rasva jäi reaktioastian seinämille ja nesteen pinnalle. Rasvoja pilkkovalla lipaasientsyymillä (Candida cylindracea lipaasi, Biocatalysts LTD, UK) rasva voitiin pilkkoa rasvahapoiksi ja glyseroliksi, mutta rasvahapot veteenliukenemattomina jäivät suspendoituneena reaktioseokseen.

20 Kuorten hienontamisella ei ollut vaikutusta hydrolyysitulokseen. Kokonaiset kuoret (n. 6 x 30 cm, 15 g/kpl) liukenivat Econasella yhtä hyvin kuin pienemmät partikkelit (0,5 x 0,5 cm; 1 x 1 cm; 3 x 3 cm).

### **Kuori- ja entsyymipitoisuuden vaikutus**

25 Kuviossa 4 on esitetty makkarankuorten hydrolyysi Econase-sellulaasipreparaatilla ja entsyymiannostuksen vaikutus ajan funktiona.

Nämä tulokset osoittavat, että kuoret liukenevat hyvin keksinnön mukaisesti n. 2-5 tunnissa. Liukenematon kuiva-aine kuvaa sitä osuutta, joka ei ole liuennut ja kuvion tulkitsemiseksi viitataan taulukkoon 1, jossa on esitetty kuorten alkukoostumus.

30

Kuvassa 5 on esitetty liukenemattoman kuiva-aineen pitoisuus hydrolyyiseissä, joissa kuoripitoisuudet (käytetyt kuoret) olivat 50, 100 ja 150 g/l sekä sellulaasientsyymipitoisuudet (Econase) 2, 5 ja 10 FPU/g kuorta. Kun käytettiin pienempää entsyymiannostusta (2-5 FPU/g kuorta) tai suurempaa kuoripitoisuutta (100-150 g/l), maksimi-  
5 hydrolyysiin tarvittiin pitempi reaktioaika. Vaikka sokerianalyysit näyttivät hydrolyysin olevan kesken, kuoria oli näkyvästi jäljellä ainoastaan 5 tunnin näytteissä ja 24 tunnin näytteessä, jossa kuoripitoisuus oli 150 g/l ja entsyymipitoisuus 2 FPU/g.

Kun entsyymipitoisuus nostettiin 30 FPU/g kuorta, hydrolyysiaika lyheni viiteen tuntiin  
10 (kuva 6). Kolmen tunnin jälkeenkään kuoria ei enää ollut näkyvissä. Liukenematonta kuiva-ainetta jäi 0,3 g/l jäljelle.

Koska entsyymiannostus tehtiin FPU-aktiivisuuden mukaan Spezyme-entsyymejä käytettäessä HEC-aktiivisuuden ja  $\beta$ -glukosidaasin osuudet jäivät pienemmiksi kuin  
15 Econasella. Kuoret liukenivat Spezyme-entsyymeillä yhtä hyvin kuin Econasella. (Kuvat 7 ja 8).

## PUOLIJATKUVAT HYDROLYYSIT

20 Puolijatkuvassa hydrolyysissä, jossa sokeriliuoksessa olevat entsyymit otetaan talteen jokaisen yksittäisen panoshydrolyysin jälkeen, voidaan entsyymien kulutusta alentaa.

Käytettyjen kuorten puolijatkuvassa hydrolyysissä (50 g/l kuorta, Econasea 30 FPU/g) vuorokauden hydrolyysin jälkeen samaan reaktioseokseen lisättiin uusia kuoria (50 g/l),  
25 joihin sellulaasien annettiin sitoutua 20 minuuttia. Sitoutumisaikaa ei optimoitu. Sokeriliuos otettiin talteen kuoriseoksesta sentrifugoimalla (2500 rpm, 10 min.) ja asetaattipuskuria lisättiin tilalle. Kuorten talteenotto suodattamalla on myös mahdollista. Uusia kuoria hydrolysoitiin taas vuorokausi. Koska  $\beta$ -glukosidaasi ei tartu selluloosaan tätä entsyymiä lisättiin jokaisen puskurinvaihdon yhteydessä alkuperäistä  $\beta$ -glukosidaasiannosta vastaava määrä (1000 nkat/g kuorta). Sama toistettiin vuorokauden välein.  
30 Sokerisaannot laskivat hitaasti toisen panoshydrolyysin jälkeen pienen sellulaasihävikin

takia (Kuva 9). Ilman  $\beta$ -glukosidaasinlisäystä lasku oli vielä jyrkempi (Kuva 10). Sellulaasihävikki korvattiin jatkossa pienellä sellulaasilisäyksellä. Ilman korvaavaa sellulaasilisäystä puolijatkuva hydrolyysi ei toimi aivan samalla teholla.

- 5 Kuorilisäyksen ja hydrolyysiajan sopivan ajankohdan löytämiseksi (50 g/l kuorta, Econasea 10 FPU/g) kuoriseoksista erotettiin kuorijäännökset 2, 4, 6 tai 24 tunnin hydrolyysin jälkeen ja liuoksiin lisättiin uusia kuoria. Vuorokauden hydrolyysin jälkeen liuokset analysoitiin. Hydrolyysi oli edennyt pisimmälle reaktioseoksessa, jossa uudet kuoret oli lisätty vasta 24 tunnin kuluttua hydrolyysin aloituksesta (Taulukko 3).

10

Hydrolyysin kannalta on edullisinta, että uudet kuoret lisätään vasta kun vanhat kuoret ovat täysin lienneet ja sellulaasit vapautuneet liuokseen.

Taulukko 3. Kuorien lisäysajankohdan vaikutus kokonaishydrolyysiin (24 h)

15

Kuorienlisäys- ajankohta (h) = hydr. aika	Pelk.sok. (g/l)	Glukoosi (g/l)	Liukenematon ka. (g/l)	Liukoinen ka. (g/l)
2	7,4	4,3	15,6	47,6
4	9,3	4,8	7,7	51,0
6	16,1	8,2	5,5	52,1
24	22,4	15,7	1,4	55,3

20

## 25 Sellulaasilisäyksen vaikutus

- Sopivan sellulaasilisäyksen löytämiseksi puolijatkuvassa hydrolyysissä reaktioseokseen lisättiin  $\beta$ -glukosidaasin (1000 nkat/g kuorta) lisäksi Econasea 0,1, 0,5 ja 1,0 FPU/g kuorta jokaisen liuoksen vaihdon yhteydessä. Entsyymilisäyksen ollessa 0,5 tai 1,0
- 30 FPU/g hydrolyysi jatkui viikkoja ilman sokerisaantojen alenemista. Glukoosipitoisuus oli keskimäärin 22 g/l (63 % ka:sta), kaikkien pelkistävien sokereiden pitoisuus 25 g/l (71 % ka:sta) ja liukoinen kuiva-aine 33 g/l. Hydrolyysi lopetettiin 78 vuorokauden

kuluttua (kuvat 11 ja 12). Mikro-organismien kasvua tai rasvan kerääntymistä hydrolyysiastiaan ei tänä aikana tapahtunut.

5 Tuloksista voidaan laskea todellinen entsyyminkulutus entsyymien kierrätyksellä toimivassa hydrolyysissä:

Sellulaasin alkuannostus 30 FPU/g kuorta yhteen panokseen 150 vuorokauden välein.

10 Sellulaasin lisäys 0,5 FPU/g kuorta jokaiseen panokseen ja  $\beta$ -glukosidaasin lisäys 1000 nkat/g kuorta jokaiseen panokseen.

YHTEENSÄ: 0,7 FPU Econasea ja 1000 nkat  $\beta$ -glukosidaasia/g kuorta.

#### **$\beta$ -glukosidaasin immobilisointi kiinteään kantajaan**

15

Liukoisien  $\beta$ -glukosidaasin lisääminen jatkuvasti hydrolyysiseokseen lisää merkittävästi entsyymikustannuksia. Koska kaupallista jatkuvatoimiseen käyttöön soveltuvaa kiinteään kantajaan sidottua  $\beta$ -glukosidaasia ei ole saatavilla, immobilisoitu entsyymipreparaatti valmistettiin itse.

20

Novon  $\beta$ -glukosidaasin sitoutumista tutkittiin viidellä eri kantajalla. Immobilisointiseos sisälsi 5 g vedellä pestyä kantajaa, 49 ml 50 mM asetaattipuskuria, pH 5 ja 1,35 ml entsyymiä (2000 nkat/g kantajaa). Reaktioseoksia sekoitettiin lievästi kylmässä (+4 °C) 24 tuntia. Entsyymien sitoutumista seurattiin liuoksista ja kantajista.  $\beta$ -glukosidaasi sitoutui parhaiten heikkoon kationinvaihtajaan. Entsyymi kiinnitettiin glutaarialdehydillä ristisitomalla kantajaan stabiilisuuden parantamiseksi.

25

Immobilisoitua  $\beta$ -glukosidaasia (1000 nkat/g kuorta) kierrätettiin puolijatkuvassa makkaran kuorten hydrolyysissä kolme viikkoa, jolloin se toimi kuten liukoinen entsyymi. Ilman glutaarialdehydisidontaa entsyymi irtosi melko pian kantajasta. Myös kolme eri määrää glutaarialdehydikäsiteltyä immobilisoitua  $\beta$ -glukosidaasia (1000, 2000 ja

30

3000 nkat/g kuorta) kierrätettiin kuukauden ajan hydrolyysissä sokerisaantojen laske-  
matta.

Kuviossa 13 on esitetty immobilisoidun  $\beta$ -glukosidaasin kierrätyksen vaikutus liukoisen  
5 kuiva-aineen muodostumiseen puolijatkuvassa käytettyjen makkaran kuorten hydrolyysis-  
sä Econase-sellulaasilla. Alussa kuoria on 50 g/l ja entsyymiannostus 30 FPU/g kuorta.  
Vuorokauden välein reaktioseokseen on lisätty uusia kuoria (50 g/l), sokeriliuos on  
otettu talteen ja korvattu sellulaasia sisältävällä puskuriliuoksella (0,5 FPU/g).  
Immobilisoitu, glutaarialdehydillä käsitelty  $\beta$ -glukosidaasi (1000-3000 nkat/g kuorta) on  
10 lisätty vain reaktion alussa. Reaktio-olosuhteet: 50 °C, pH 5, sekoitus 150 rpm.

Entsyymikustannuksia voidaan olennaisesti pienentää käyttämällä immobilisoitua  $\beta$ -  
glukosidaasia. Samaa entsyymierää voidaan kierrättää useita viikkoja tai kuukausia  
jatkuvatoimisessa hydrolyysissä.

## Patenttivaatimukset

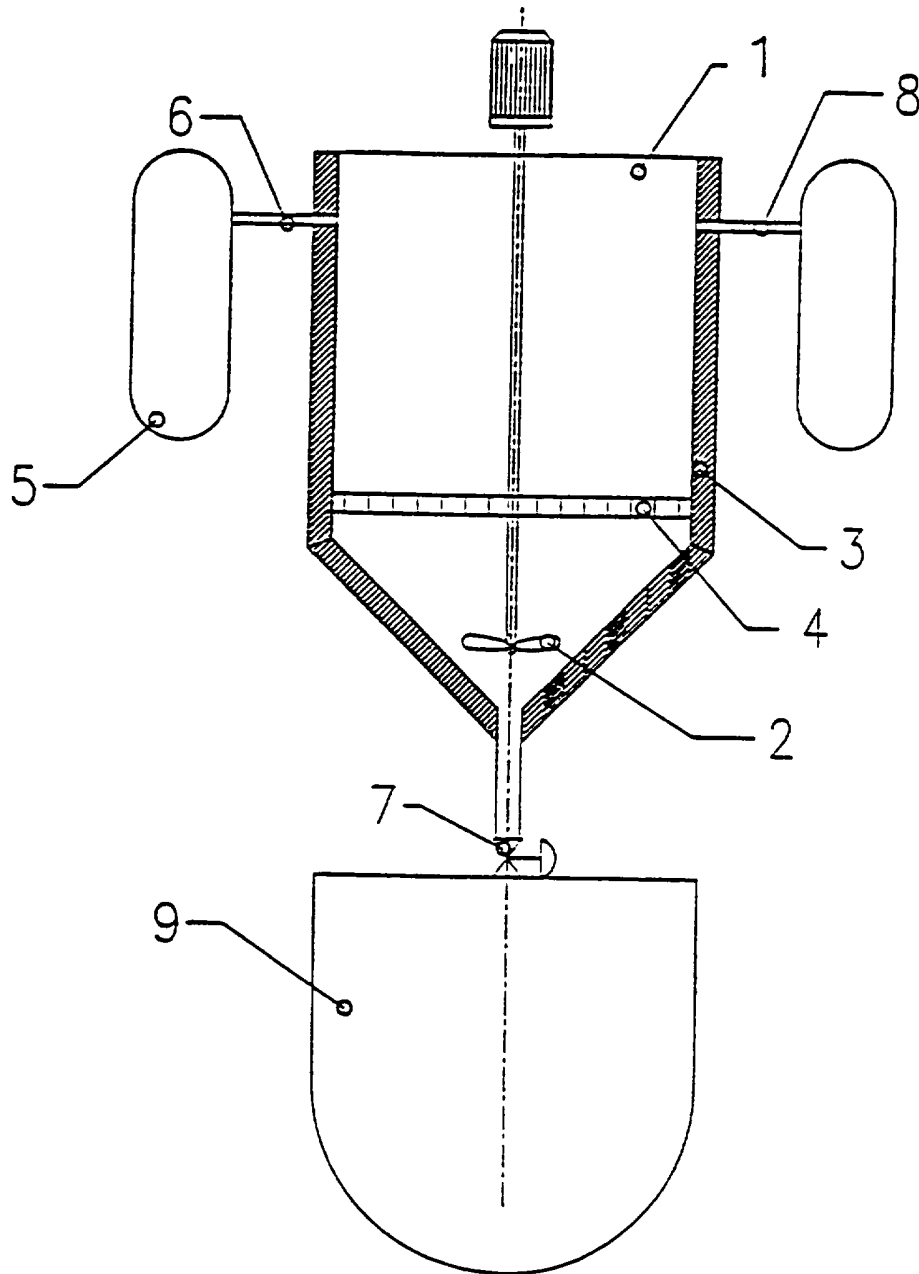
1. Menetelmä makkarankuorien ja muiden pääasiassa selluloosaa sisältävien aineiden hävittämiseksi liuottamalla entsyymien avulla, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä  
5 suoritetaan seuraavat vaiheet:
- a) lisätään sellulaasientsyymejä vesiliuoksen sisältävään reaktoriin,
  - b) ennen vaihetta a) tai sen jälkeen liuotettavat aineet lisätään reaktoriin,  
10
  - c) annetaan liuotettavien aineiden osittaisen tai täydellisen liukenemisen tapahtua, jonka jälkeen
  - d) lisätään uusi erä liuotettavia aineita reaktoriin,  
15
  - e) kun entsyymit ovat adsorboituneet uusiin liuotettaviin aineisiin, vaiheessa c) aiemmin liuenneet aineet sisältävä liuos otetaan talteen erottamalla liuos ja liuotettavat aineet toisistaan, jolloin
  - 20 f) liuotettaviin aineisiin lisätään vettä ja haluttaessa vaiheet c-f toistetaan haluttu määrä kertoja.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymit ovat sellulaaseja, joilla on oleellinen FPU-, HEC- ja  $\beta$ -glukosidaasiaktiivisuus.  
25
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sellulaasipreparaatit ovat Econase CE<sup>®</sup>, Spezyme CE<sup>®</sup> ja/tai Spezyme CP<sup>®</sup>.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että  
30 hydrolyysiaikaa säädetään kuorten pitoisuudella ja entsyymin konsentraatiolla.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydrolyysiaika on 2-5 tuntia kun kuorten pitoisuus on noin 1-200 g/l ja entsyymien konsentraatio 1-50 FPU/g kuorta.
- 5 6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sellulaasientsyymien määrä on liuoksessa 1-50 FPU/g kuorta.
7. Jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että prosessiin lisätään myös  $\beta$ -glukosidaasia hydrolyysin tehostamiseksi, kun halutaan  
10 suurempi osuus glukoosia.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että  $\beta$ -glukosidaasi immobilisoidaan sen kierrättämiseksi.
- 15 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoidun  $\beta$ -glukosidaasin määrä on noin 1000 nkat/g kuorta.
10. Jonkin patenttivaatimuksen 1-9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kuorten lisäysten välillä tai sen yhteydessä lisätään tarvittava määrä sellulaasientsyymejä sekä  $\beta$ -glukosidaasia.  
20
11. Jonkin patenttivaatimuksen 1-10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kuoripitoisuus on 1-200 g/l.
- 25 12. Jonkin patenttivaatimuksen 1-11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä suoritetaan puolijatkuvana panosprosessina yhtä, kahta tai useampaa reaktoria käyttäen.

## Patentkrav

1. Förfarande för att förstöra korvskinn och andra ämnen som innehåller i huvudsak cellulosa genom upplösning med hjälp av enzymer, k ä n n e t e c k n a t därav, att  
5 följande steg utförs vid förfarandet:
- a) tillsättning av cellulasezymer i en reaktor som innehåller en vattenlösning,
  - b) före steg a) eller efter detta tillsätts ämnena som skall lösas upp i reaktorn,  
10
  - c) man låter en partiell eller fullständig upplösning av ämnena ske, efter vilket
  - d) en ny sats ämnen som skall lösas upp tillsätts reaktorn,
  - 15 e) då enzymerna adsorberats i de nya ämnena som skall lösas upp, återvinns en lösning som innehåller de i steg c) tidigare upplösta ämnena genom att separera lösningen och ämnena som skall lösas upp från varandra, varvid
  - f) vatten tillsätts ämnena som skall lösas upp och vid behov upprepas stegen c-f  
20 önskat antal gånger.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymerna är cellulaser med avsevärd FPU-, HEC- och  $\beta$ -glukosidasaktivitet.
- 25 3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att cellulasepreparaten är Econase CE<sup>®</sup>, Spezyme CE<sup>®</sup> och/eller Spezyme CP<sup>®</sup>.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att hydrolystiden regleras med halten skinn och koncentrationen på enzymerna.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att hydrolystiden är 2-5 timmar då halten skinn är cirka 1-200 g/l och koncentrationen på enzymerna 1-50 FPU/g skinn.
- 5 6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att mängden cellulasezymer i lösningen är 1-50 FPU/g skinn.
7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t därav, att också  $\beta$ -glukosidas tillsätts processen för effektivisering av hydrolysen då man önskar  
10 en större halt glukos.
8. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att  $\beta$ -glukosidasen immobiliseras för cirkulering av denna.
- 15 9. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att mängden immobiliserad  $\beta$ -glukosidas är ca 1000 nkat/g skinn.
10. Förfarande enligt något av patentkraven 1-9, k ä n n e t e c k n a t därav, att mellan tillsättningarna av skinn eller i samband med dessa tillsätts behövlig mängd  
20 cellulasezymer samt  $\beta$ -glukosidas.
11. Förfarande enligt något av patentkraven 1-10, k ä n n e t e c k n a t därav, att skinnhalten är 1-200 g/l.
- 25 12. Förfarande enligt något av patentkraven 1-11, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet utförs i form av en semikontinuerlig satsprocess genom att använda sig av en, två eller flera reaktorer.



## MAKKARANKUORTEN LIUOTUS

## 2. LIUOTUS ENTSYIMIEN KIERRÄTYKSELLÄ

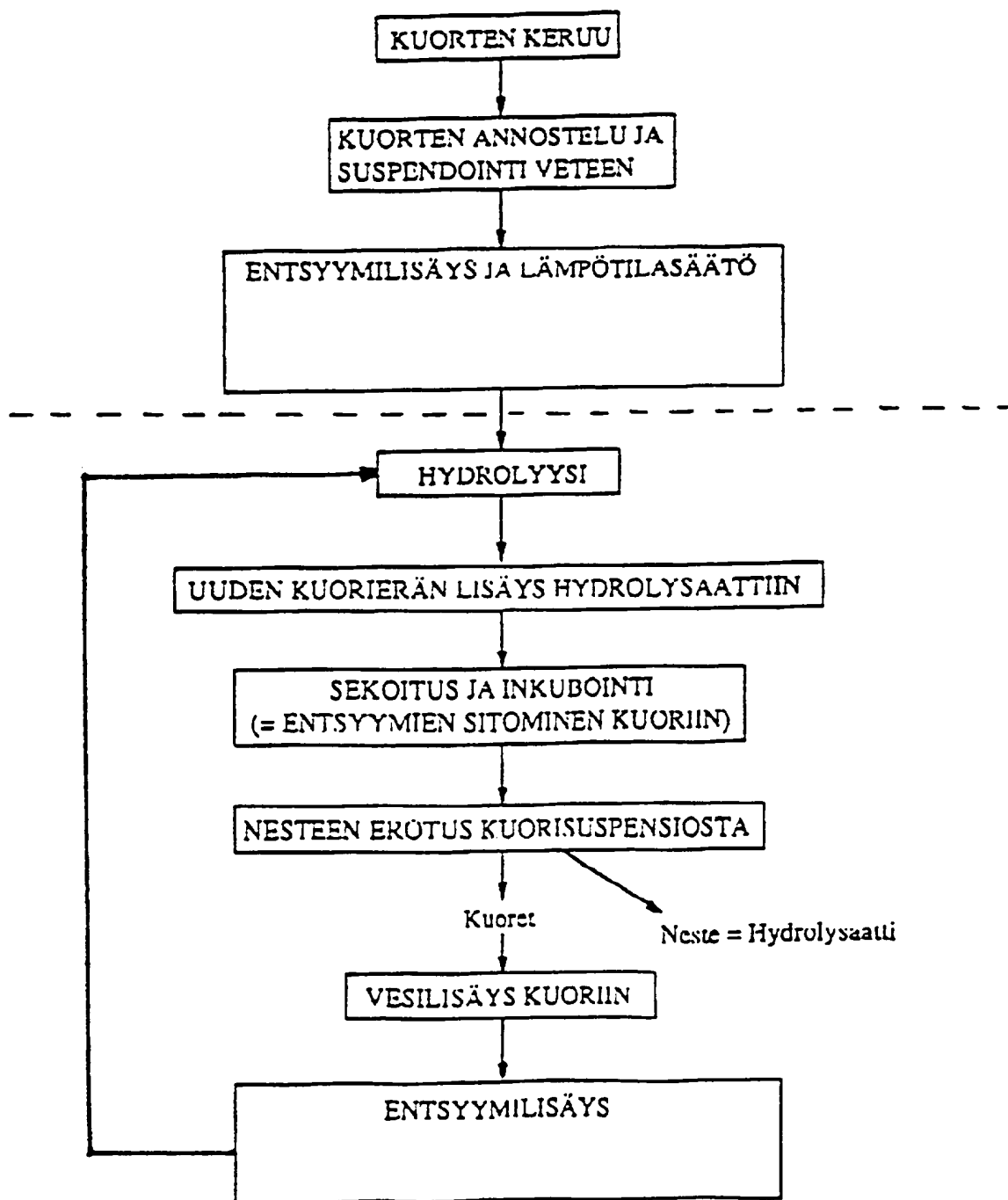


FIG. 2

## MAKKARANKUORTEN LIUOTUS

### 1. LIUOTUS ILMAN ENTSYIMIEN KIERRÄTYSTÄ

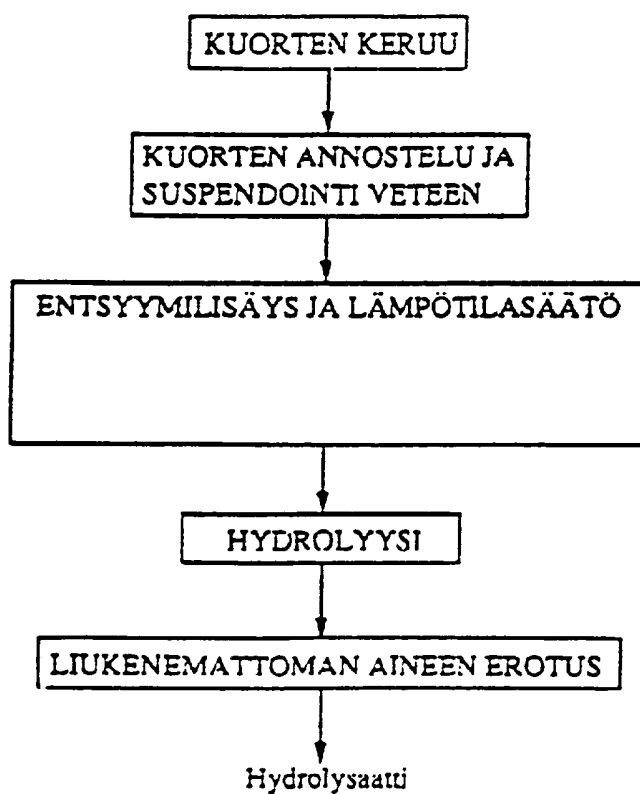
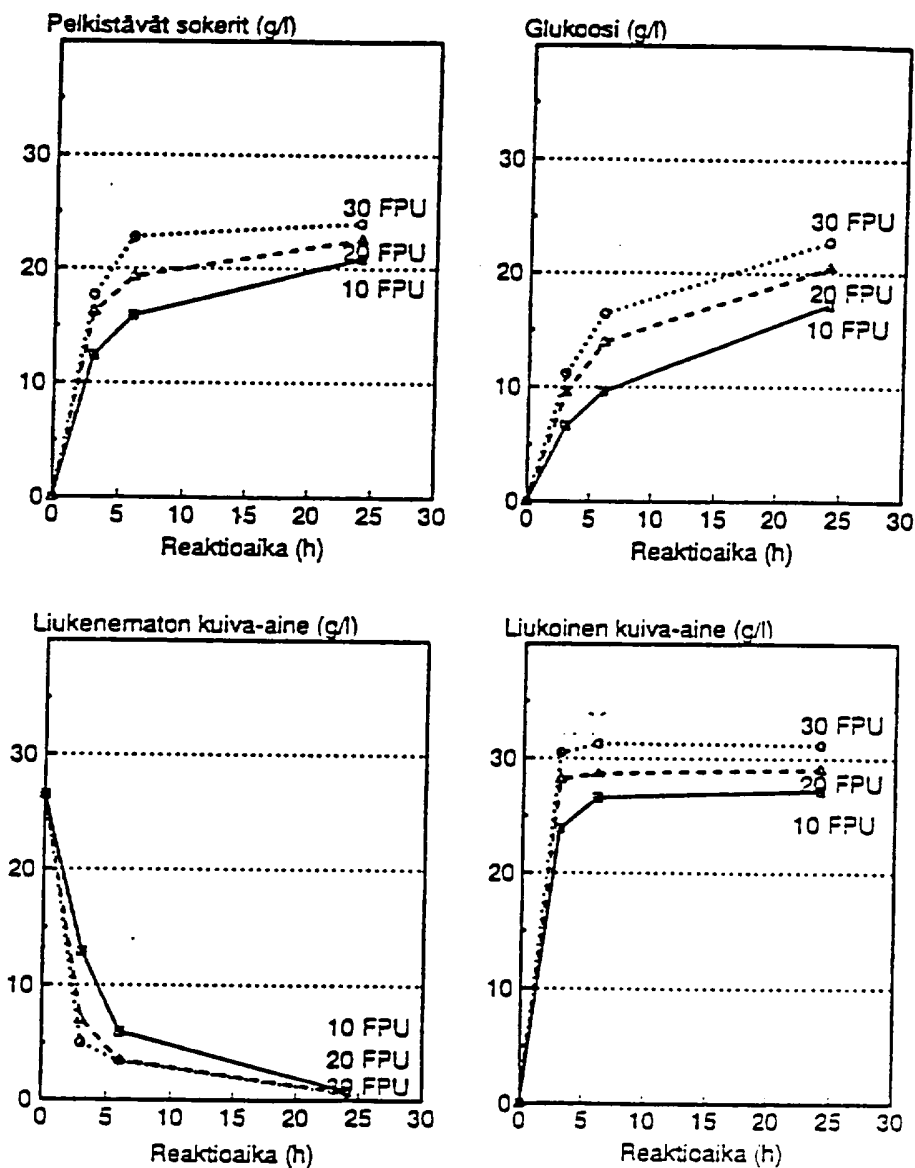
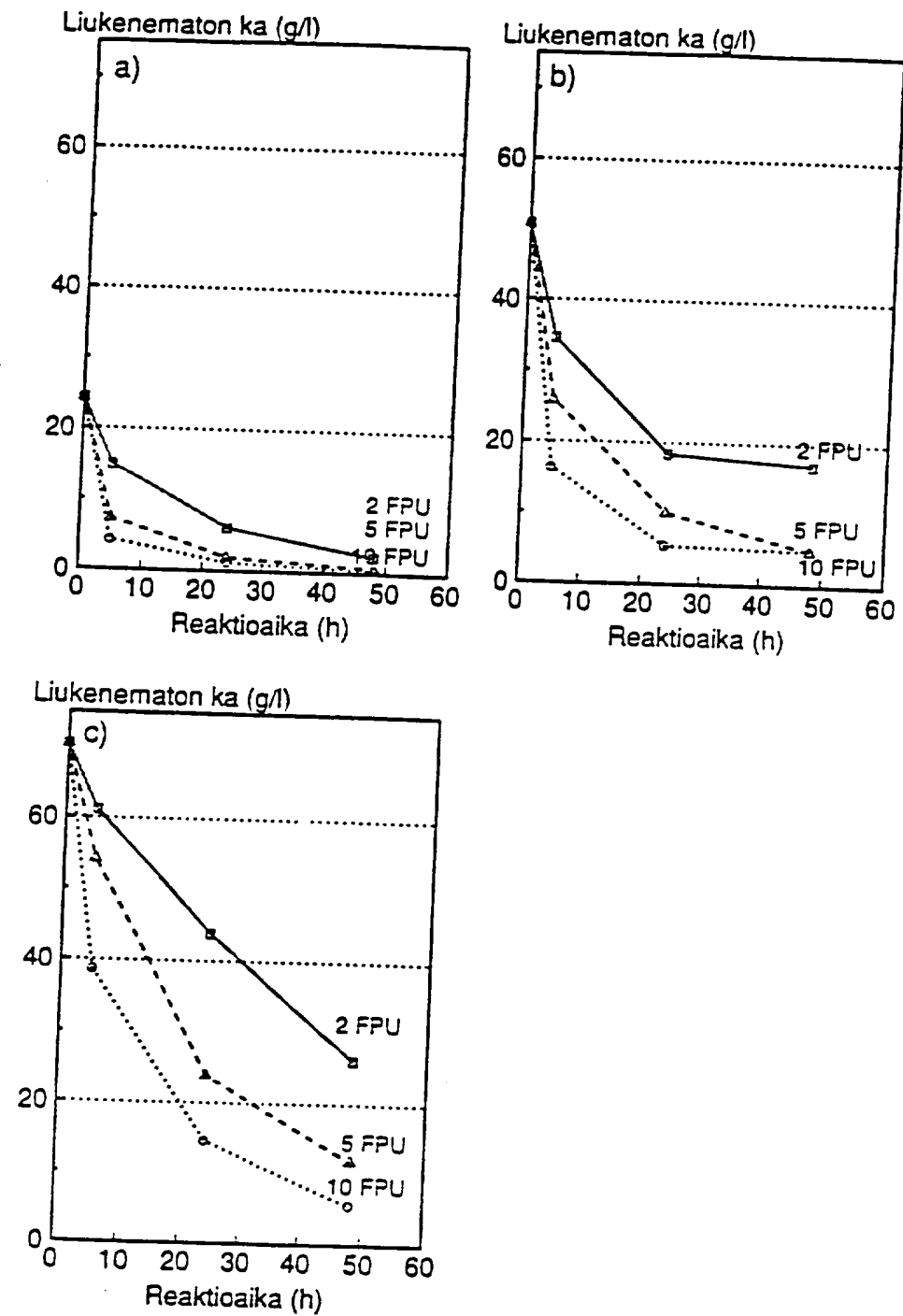


FIG. 3



Kuva 4. Makkaran kuorten (50 g/l) hydrolyysi Econase-sellulaasipreparaatilla. Entsyymiannostuksen (10, 20 ja 30 FPU/g kuorta) vaikutus pelkistävien sokereiden, glukoosin, liukenemattoman ja liukoisen kuiva-aineen pitoisuuteen ajan funktiona. Reaktio-olosuhteet: 50 °C, pH 5, sekoitus 150 rpm. Kuori partikkeleiden koko 3,0 x 3,0 cm.



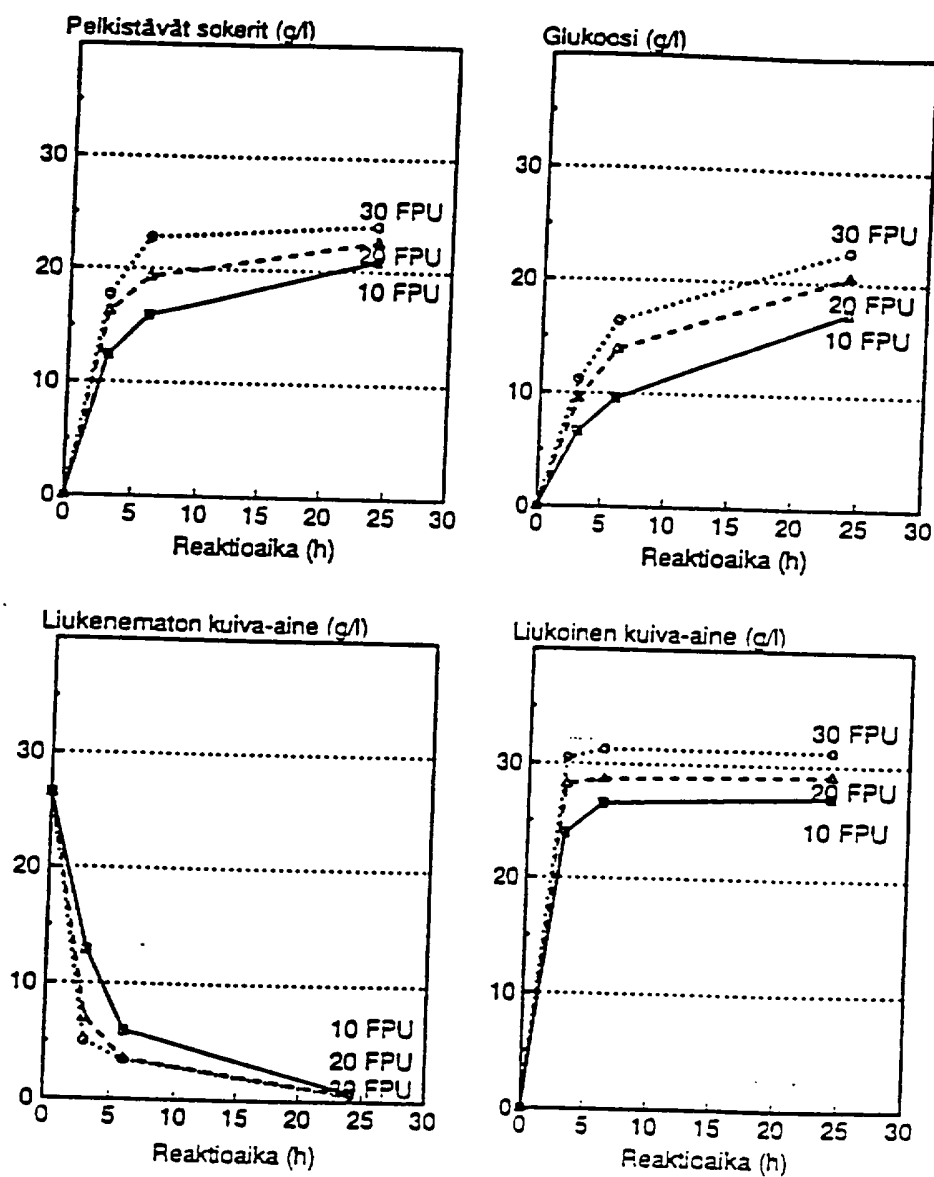
Kuva 5. Ensyymi- ja substraattikonsentraatioiden vaikutus liukenenemattoman kuiva-aineen muodostumiseen ajan funktiona käytettyjen makkarankuorten hydrolyysissä Econase-sellulaasipreparaatilla. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm.

Ensyymiannostus: 2, 5 ja 10 FPU/g kuorta. Kuoripartikkeleiden koko 3,0 x 3,0 cm.

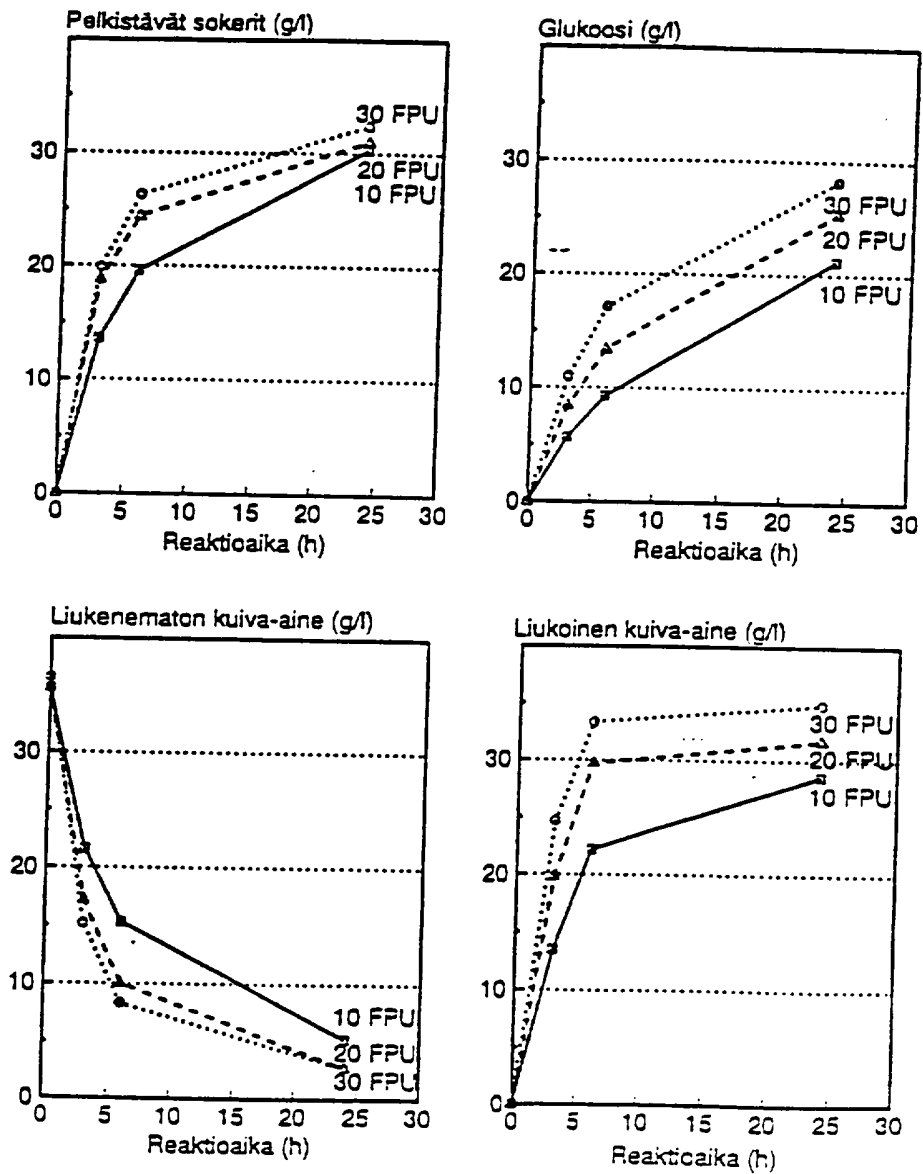
a) kuoripitoisuus 50 g/l

b) kuoripitoisuus 100 g/l

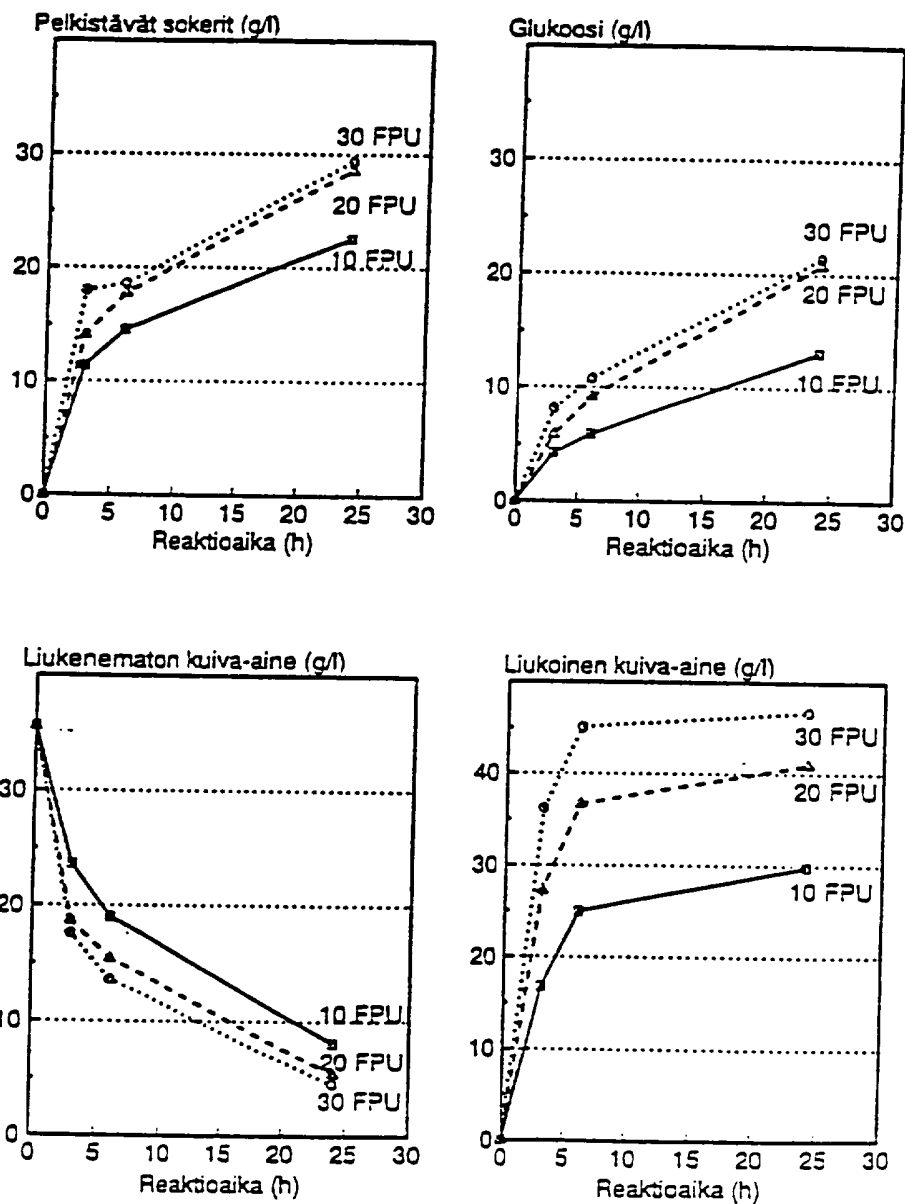
c) kuoripitoisuus 150 g/l



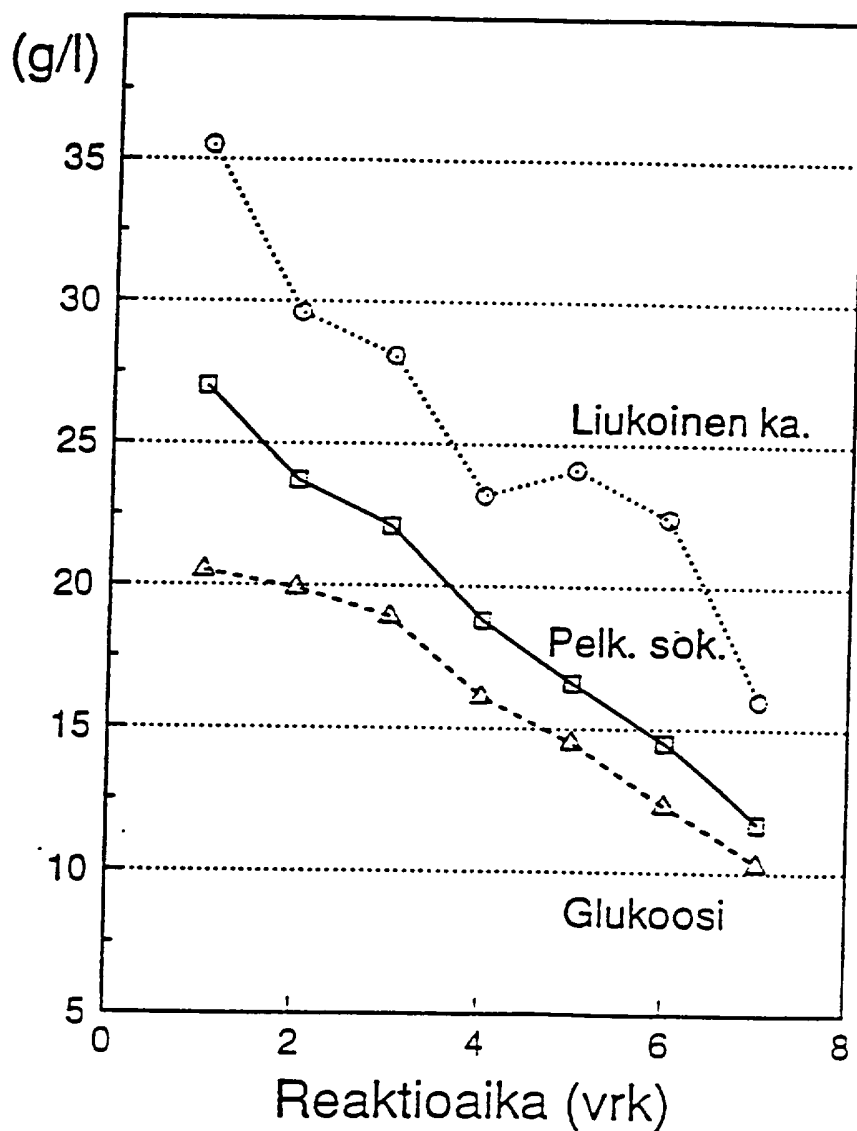
Kuva 6. Käytettyjen makkarankeuorten (50 g/l) hydrolyysi Eiconase-sellulaasipreparaatilla. Entsyymiannostuksen (10, 20 ja 30 FPU/g kuorta) vaikutus pelkistävien sokereiden, glukoosin, liukenemattoman ja liukoisen kuiva-aineen muodostumiseen ajan funktiona. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm. Kuoriparikkeleiden koko 3.0 x 3.0 cm.



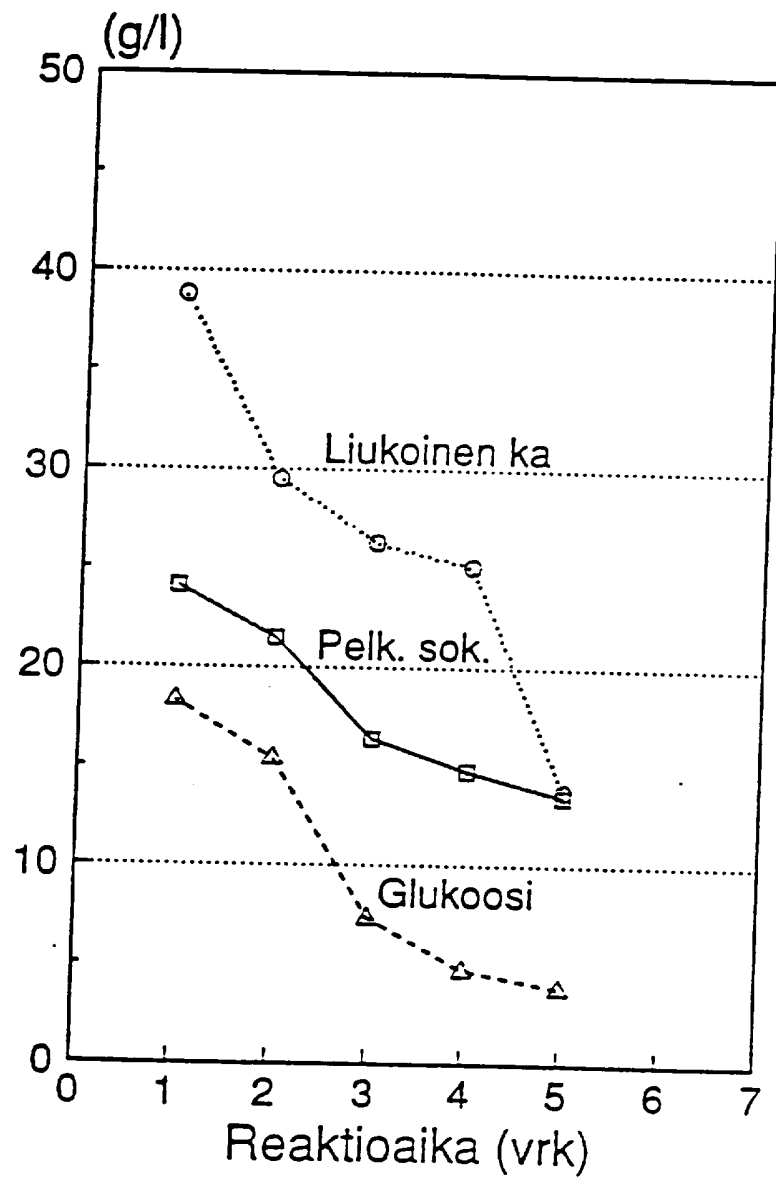
Kuva 7. Käyttämättömien makkarankuorten (50 g/l) hydrolyysi Spezyme CE-sellulaasipreparaatilla (Genencor). Entsyymiannostuksen (10, 20 ja 30 FPU/g kuorta) vaikutus pelkistävien sokereiden, glukoosin, liukenemattoman ja liukoisin kuiva-aineen muodostumiseen ajan funktiona. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm. Kuoripartikkeleiden koko 3,0 x 3,0 cm.



Kuva 8. Käyttämättömien makkarakuorten (50 g/l) hydrolyysi Spezyme CP-sellulaasipreparaatilla (Genencor). Entsyymiannostuksen (10, 20 ja 30 FPU/g kuorta) vaikutus pelkistävien sokereiden, glukoosin, liukenemattoman ja liukoisen kuiva-aineen muodostumiseen ajan funktiona. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm. Kuoripartikkeleiden koko 3,0 x 3,0 cm.

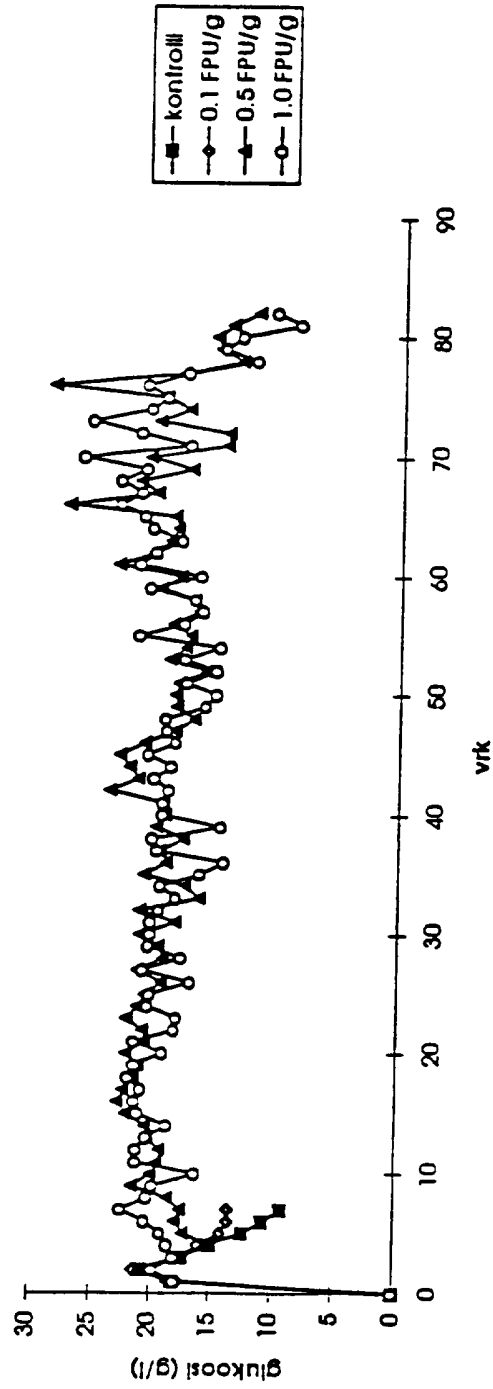


Kuva 9. Puolijatkuva käytettyjen makkaran kuorten (50 g/l) hydrolyysi Eonase-sellulaasipreparaatilla (30 FPU/g kuorta, kuoripartikkeleiden koko 3,0 x 3,0 cm). Vuorokauden välein reaktioseokseen on lisätty uusia kuoria (50 g/l), sokeriliuos on otettu talteen ja korvattu  $\beta$ -glukosidaasia sisältävällä puskuriliuoksella. Reaktio-olosuhteet: 5°C, pH 5, sekoitus 150 rpm.



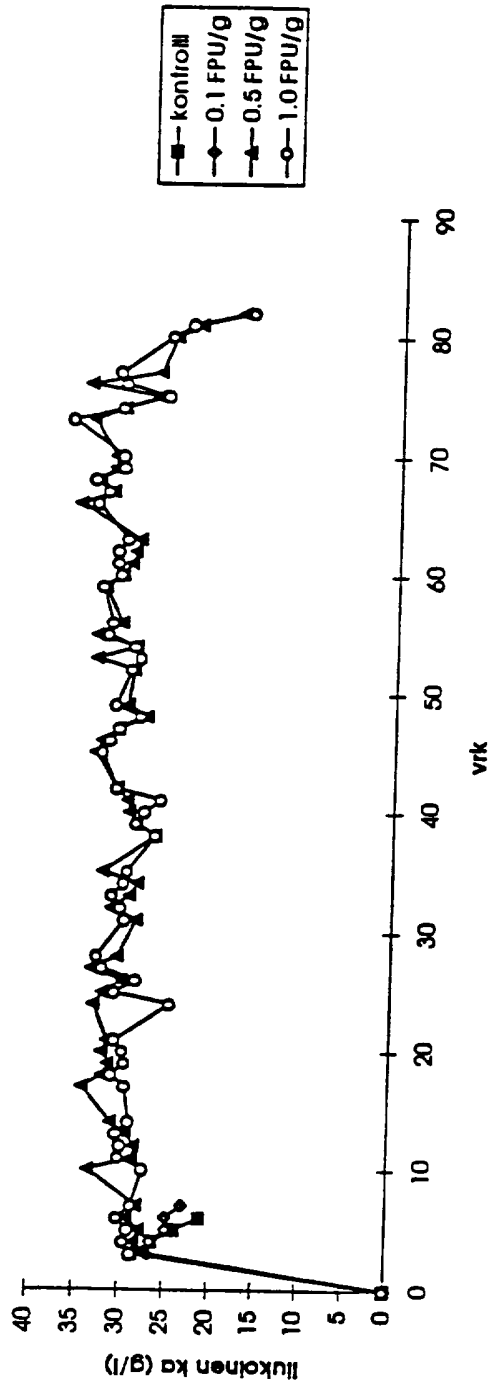
Kuva 10. Puolijatkuva käytettyjen makkaran kuorien (50 g/l) hydrolyysi Econase-sellulaasipreparaatilla (30 FPU/g kuorta, kuoripartikkeleiden koko 3.0 x 3.0 cm). Vuorokauden välein reaktioseokseen on lisätty uusia kuoria (50 g/l), sokeriliuos on otettu talteen ja korvattu puskuriliuoksella. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm.

PUOLIJATKAVA KÄYTETTYJEN MAKKARANKUORTEN HYDROLYYSI ALKON ECONASELLA



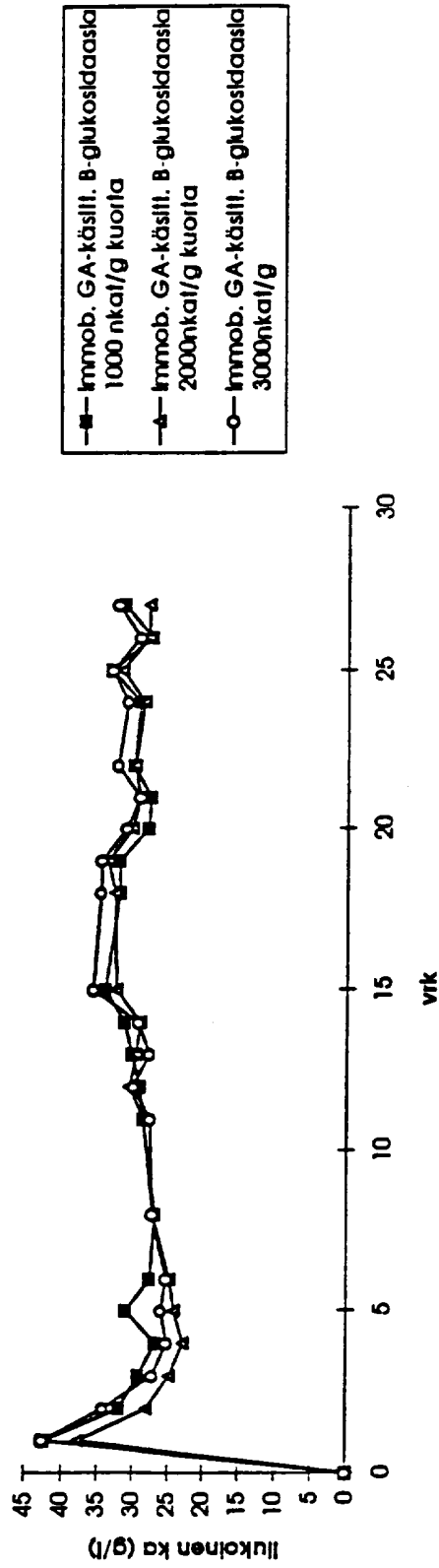
Kuva 11. Sellulaasillisäyksen vaikutus glukoosin muodostumiseen puolijatkuvassa puolijatkuvassa käytettyjen makkarankuorten hydrolyysissä Econase-sellulaasilla. Alussa kuoria on 50 g/l ja entsyymiannostus 30 FPU/g kuorta. Vuorokauden välein reaktioseokseen on lisätty uusia kuoria (50 g/l), sokeriliuos on otettu talteen ja korvattu  $\beta$ -glukosidaasia (1000 nkat/g) ja sellulaasia sisältävällä puskuriliuoksella. Reaktioolosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm.

PUOLIJATKUVA KÄYTETTYJEN MAKKARANKUORTEN HYDROLYYSI ALKON ECONASELLA



Kuva 12. Sellulaasillisäyksen vaikutus liukaisen kuiva-aineen muodostumiseen puolijatkuvassa käytettyjen makkaran kuorten hydrolyysissä Econase-sellulaasilla. Alussa kuoria on 50 g/l ja entsyymiannostus 30 FPU/g kuorta. Vuorokauden välein reaktioseokseen on lisätty uusia kuoria ( 50 g/l ), sokeriliuos on olettu talteen ja korvattu  $\beta$ -glukosidiasia (1000 nkat/g ) ja sellulaasia sisältävällä puskuriliuksella. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm.

PUOLIJATKAVA KÄYTETTYJEN MAKKARANKUORTEN HYDROLYYSI  
IMMOBILISOIDULLA  $\beta$ -GLUKOSIDAASILLA



Kuva 13. Imobilisoidun  $\beta$ -glukosidaasin klerätyksen vaikutus liukoksen kuiva-aineen muodostumiseen puolijatkuvassa käytettyjen makkaran kuorten hydrolyysissä Econase-sellulaasilla. Alussa kuoria on 50 g/l ja entsyymimäärä 30 FPU/g kuorta. Vuorokauden välein reaktioseokseen on lisätty uusia kuoria (50 g/l), sokeriliuos on otettu talteen ja korvattu sellulaasia sisältävällä puskuriliuoksella (0.5 FPU/g). Imobilisoitu, glutaarididehydillä käsitelty  $\beta$ -glukosidaasi (1000-3000 nkat/g kuorta) on lisätty vain reaktion alussa. Reaktio-olosuhteet: 50°C, pH 5, sekoitus 150 rpm.