

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af isomaltulose (6-O- α -D-glucopyranosido-D-fructose) ved enzymatisk omdannelse af saccharose ved hjælp af mikroorganismer, som kan danne isomaltulose ud fra saccharose, hvorved man behandler en ren saccharoseopløsning med døde, immobiliserede bakterieceller eller bringer opløsningen i kontakt med sådanne celler, hvorefter man udvinder den dannede isomaltulose ved udkrystallisation. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Fra dansk patentansøgning nr. 4349/81 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af isomaltulose ved enzymatisk omdannelse af saccharose, hvorved man bringer rene saccharoseopløsninger i kontakt med døde, immobiliserede celler af mikroorganismer, som kan danne isomaltulose ud fra saccharose. Ved denne fremgangsmåde leder man ved en temperatur på 40-65 °C kontinuerligt saccharoseopløsninger i koncentrationsområdet 45-75 vægt-%, fortrinsvis 65-75 vægt-% gennem en reaktor, der er fyldt med immobiliserede celler. Den derved dannede isomaltulose udvindes i krystallinsk form på i og for sig kendt måde.

De mikroorganismer, der anvendes ved denne kendte fremgangsmåde, kan f.eks. være *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285) eller *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512 F (ATCC 10830a), men er fortrinsvis *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77).

Det har ved gennemførelsen af denne kendte fremgangsmåde nu vist sig, at en stor andel (op til 1/3) af den tilførte saccharose hyppigt ikke omdannes til den ønskede forbindelse (isomaltulose), men derimod til biprodukter, og/eller at den forbliver i uomsat tilstand i reaktionsopløsningen. Eftersom disse biprodukter også hæmmer krystallisationen af den dannede isomaltulose og derved

yderligere sænker udbyttet af krystaller, er det af stor økonomisk interesse at tilvejebringe en fremgangsmåde, som helt eller i det mindste delvis forhindrer dannelsen af uønskede og generende biprodukter.

5

Det har nu overraskende vist sig, at det er muligt at udvinde isomaltulose med høj renhedsgrad og i stort udbytte ud fra saccharose, hvis man deler saccharoseopløsningen med en koncentration på 40-75 vægt-%, fortrinsvis 10 45-60 vægt-%, i to dele og leder den første del gennem en reaktor, som er fyldt med immobiliserede, døde celler af mikroorganismer, som kan danne isomaltulose ud fra saccharose, ved 25-40 °C, fortrinsvis 30-40 °C, på en sådan måde, at 80-90 % af saccharosen bliver omdannet, og der- 15 efter leder den efter udkrystallisation af den dannede isomaltulose opnåede moderlud, blandet med den anden del af saccharoseopløsningen, igennem en anden reaktor, der ligeledes er fyldt med immobiliserede, døde celler af mikroorganismer, som kan danne isomaltulose ud fra saccha- 20 rose, ved 25-40 °C, fortrinsvis 30-40 °C, på en sådan måde, at saccharosen omdannes næsten fuldstændigt, hvorpå man på i og for sig kendt måde udvinder den opnåede isomaltulose fra denne opløsning i krystallinsk form, opløser krystallerne i den allerede omsatte første del af 25 saccharoseopløsningen, fremkalder krystallisation og fraseparerer de således dannede isomaltulose-krystaller.

Middelopholdstiden i reaktoren for saccharoseopløsningen, som skal omsættes, er afhængig af den til enhver tid foreliggende specifikke aktivitet af de immobiliserede 30 celler. Den specifikke aktivitet defineres som μmol omsat saccharose pr. g immobiliserede celler (tørvægt) pr. minut. Eksempelvis indeholder en reaktor på 100 mm i diameter og 450 mm i lejevøjde 950 g immobiliserede celler 35 (tørvægt) med en specifik aktivitet på 60 enheder/g. Denne reaktor skal gennemstrømmes af 1900 ml saccharoseopløsning (50 vægt-%) pr. time for at omsætte 90 % af den

tilførte saccharose. Eftersom aktiviteten aftager kontinuerligt under driftsperioden, må man til stadighed efterregulere strømningshastigheden for at opnå et reaktionsprodukt med konstant sammensætning.

5

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres i det nedenstående eksempel 3. Eksemplerne 1 og 2 er sammenligningseksempler, hvor eksempel 1 svarer til eksempel 1 i DK patentansøgning nr. 4349/81.

10

EKSEMPEL 1 (Sammenligningseksempel)

a) Man skyller 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 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 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 indeholdende 200 ml næringsopløsning med den ovenfor beskrevne sammensætning.

Efter 30 timers dyrkning ved 39 °C podes 16 liter næringsopløsning med den ovennævnte sammensætning i en 30 liter minifermentor med indholdet af 20 kolber (4 l), og der fermenteres ved 29 °C med 20 l luft pr. minut og en omrøringshastighed på 350 omdr./min. Det tiltagende kimtal bestemmes mikroskopisk. Efter at man har opnået et kimtal på 5×10^9 kim/ml, overføres fermentorens indhold til en anden beholder, hvor der tilsættes et kationaktivt flokkuleringsmiddel (som f.eks. "Primafloc C7" fra firmaet Rohm & Haas, Philadelphia, USA). Man lader de udflokkede celler sætte sig, fradekanterer, vasker med 0,1 M fosfatpuffer (pH 7,0) og fjerner vandet ved centrifugering. Massen ekstruderes derpå til stænger, som lufttørres og formales.

b) Sigtefraktionen 0,3-0,8 mm af det ovenfor udvundne præparat omrøres i en 0,1 % glutaraldehydopløsning i 10 minutter, vaskes med fosfatpuffer (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-% saccharoseopløsning. Strømningshastigheden afpasses således, at man ved søjlens udløb ikke længere kan påvise nogen saccharose. Den på denne måde indvundne isomaltuloseopløsning har følgende gennemsnitlige sammensætning (HPLC = højtryksvæskechromatografi):

	Fructose	7,4 g/100 g tørstof
	Glucose	0,3 g/100 g "
15	Saccharose	0,1 g/100 g "
	Isomaltulose	62,6 g/100 g "
	1-O- α -D-gluco-pyranosido-D-fructose	16,6 g/100 g "
	Oligosaccharider	13,0 g/100 g "

20 Denne opløsning overføres til en nedkølingskrystallisator og køles til 20 °C, hvorefter den udkrystalliserede isomaltulose separeres fra moderluden i en sigtekurvcentrifuge.

25 Udbytte

100 kg af en opløsning indeholdende 70 kg saccharose indeholder efter omsætningen 43,8 g isomaltulose (62,6 % af tørstofindholdet). Heraf udvinder man ved den første krystallisation 15,9 kg ren isomaltulose og ved den anden krystallisation 13,4 kg isomaltulose med 98 % renhed. Dette svarer til et samlet udbytte på 29 kg ren isomaltulose ud fra 70 kg saccharose eller 41,4 % af råstoffet. (I dette eksempel og i de efterfølgende eksempler regnes der med vandfri isomaltulose).

EKSEMPEL 2

Sigtefraktionen 0,3-0,8 mm af et analogt med eksempel 1a fremstillet præparat omrøres i 10 minutter i en 0,1 % glutaraldehydopløsning, vaskes med phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) og fyldes under vand på en søjle, hvis temperatur kan reguleres. Søjlen opvarmes derpå til 30 °C og gennemstrømmes kontinuerligt med en 50 vægt-% saccharoseopløsning. Strømningshastigheden afpasses således, at man ved søjlens udløb ikke længere kan påvise nogen saccharose. Den således udvundne isomaltuloseopløsning har følgende gennemsnitlige sammensætning (HPLC):

Fructose	3,6 g/100 g tørstof	
15 Glucose	1,8 g/100 g	"
Saccharose	0	
Isomaltulose	78,4 g/100 g	"
1-O- α -D-glucopyranosido-D-fructose	12,6 g/100 g	"
20 Oligosaccharider	3,6 g/100 g	"

Denne opløsning inddampes til 78-82 % tørstofindhold, overføres til en nedkølingskrystallisator og køles til 20 °C, hvorefter den udkrystalliserede isomaltulose separeres fra moderluden i en sigtekurvcentrifuge. Moderluden inddampes igen til 78-82 % tørstofindhold og underkastes et andet nedkølingskrystallisationstrin til 20 °C, hvorpå den udkrystalliserede anden isomaltulosemængde separeres fra moderluden i en sigtekurvcentrifuge.

30 Udbytte:

100 kg af en opløsning indeholdende 50 kg saccharose indeholder efter omsætningen 39,2 kg isomaltulose (78,4 % af tørstofindholdet). Deraf udvinder man ved den første krystallisation 25,0 kg ren isomaltulose og ved den anden krystallisation 9,6 kg isomaltulose med 98 % renhed. Dette svarer til et samlet udbytte på 34,4 kg ren isomaltu-

lose ud fra 50 kg saccharose eller 68,8 % af råstoffet.

EKSEMPEL 3

5 Sigtefraktionen 0,3-0,8 mm af et analogt med eksempel 1a fremstillet præparat omrøres i 10 minutter i en 0,1 % glutaraldehydopløsning, vaskes med phosphatpuffer (0,1M, pH 7,0) og fyldes under vand på to søjler, hvis temperatur reguleres til 30 °C.

10

Fremgangsmåden belyses nærmere ved hjælp af skemaet vist på fig. 1.

15 Den ene af søjlerne (1) gennemstrømmes kontinuerligt af en 50 vægt-% saccharoseopløsning. Strømningshastigheden reguleres således, at der ved gennemstrømning af søjlen kun omdannes ca. 90 % af saccharosen. Den herved opnåede reaktionsopløsning har følgende sammensætning (HPLC):

20	Fructose	2,9 g/100 g tørstof
	Glucose	1,6 g/100 g "
	Saccharose	10,8 g/100 g "
	Isomaltulose	75,2 g/100 g "
	1-O- α -D-gluco-pyranosido-D-fructose	6,4 g/100 g "
25	Oligosaccharider	3,1 g/100 g "

30 Parallelt med den første søjle tilføres den anden søjle (2) et substrat, som består af en blanding af saccharose og moderlud fra en forudgående isomaltulose-krystallisation. Dette substrat har sammensætningen (HPLC):

35

	Tørstofindhold	50 vægt-%
	Fructose	2,0 g/100 g tørstof
	Glucose	1,0 g/100 g "
	Saccharose	76,2 g/100 g "
5	Isomaltulose	10,8 g/100 g "
	1-O- α -D-glucopyranosido-D-fructose	8,2 g/100 g "
	Oligosaccharider	1,8 g/100 g "

10 Strømningshastigheden gennem denne søjle reguleres på en sådan måde, at opløsningen ved udgangen fra søjlen højst indeholder 1 g saccharose pr. 100 g tørstof. Den på denne måde opnåede reaktionsopløsning har følgende sammensætning (HPLC):

15	Fructose	5,4 g/100 g tørstof
	Glucose	2,2 g/100 g "
	Saccharose	1,0 g/100 g "
	Isomaltulose	72,3 g/100 g "
	1-O- α -D-glucopyranosido-D-fructose	16,6 g/100 g "
20	Oligosaccharider	2,5 g/100 g "

25 Denne opløsning inddampes til 78-82 % tørstofindhold og underkastes en nedkølingskrystallisation ved 20 °C, hvorefter den udkrystalliserede isomaltulose separeres fra denne anden moderlud i en sigtekurvcentrifuge.

30 Den på dette trin opnåede isomaltulose opløses i den reaktionsopløsning, der opnås fra den første søjle, og som inddampes til 78-82 % tørstofindhold. Opløsningen afkøles i en nedkølingskrystallisator til 20 °C, og den udkrystalliserede, rene isomaltulose adskilles fra moderluden i en sigtekurvcentrifuge. Den moderlud, der opstår på dette trin, anvendes til substratfremstillingen for den anden søjle.

Udbytte

Ved at gå frem på den måde, der er beskrevet i dette ek-
sempel, udvinder man pr. 100 kg saccharose 80,0 kg ren
isomaltulose.

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af isomaltulose (6-O- α -
5 D-glucopyranosido-D-fructose) ved enzymatisk omdannelse
af saccharose ved hjælp af mikroorganismer, som kan danne
isomaltulose ud fra saccharose, hvorved man behandler en
ren saccharoseopløsning med døde, immobiliserede celler
af sådanne mikroorganismer eller bringer opløsningen i
10 kontakt med sådanne celler, hvorefter man udvinder den
dannede isomaltulose ved udkrystallisation, k e n d e
t e g n e t ved, at man først leder en del af saccharo-
seopløsningen med en koncentration på 40-75 vægt-%, for-
trinsvis 45-60 vægt-%, igennem en reaktor fyldt med de
15 immobiliserede døde celler ved 25-40 °C, fortrinsvis ved
30-40 °C, og gennemfører omsætningen på en sådan måde, at
80-90 % af saccharosen bliver omdannet, at man derefter
leder den efter udkrystallisation af den dannede isomal-
tulose opståede moderlud, blandet med den resterende del
20 af saccharoseopløsningen igennem en anden reaktor, der
ligeledes er fyldt med immobiliserede døde celler, ved
25-40 °C, fortrinsvis ved 30-40 °C, således at saccharo-
sen bliver næsten fuldstændig omsat, og at man udvinder
den fra den anden del af opløsningen opnåede isomaltulose
25 i krystallinsk form på i og for sig kendt måde, opløser
krystallerne i den allerede omsatte første del af opløs-
ningen, bringer opløsningen til at udkrystallisere og
fraseparerer de opnåede isomaltulose-krystaller.

30

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at de anvendte mikroorganismer er valgt blandt
Protaminobacter rubrum (CBS 574.77), Serratia plymuthica
(ATCC 15928), Serratia marcescens (NCIB 8285) og
35 Leuconostoc mesenteroides (NRRL B-512 F (ATCC 10830 a)),
idet der fortrinsvis anvendes Protaminobacter rubrum (CBS
574.77).

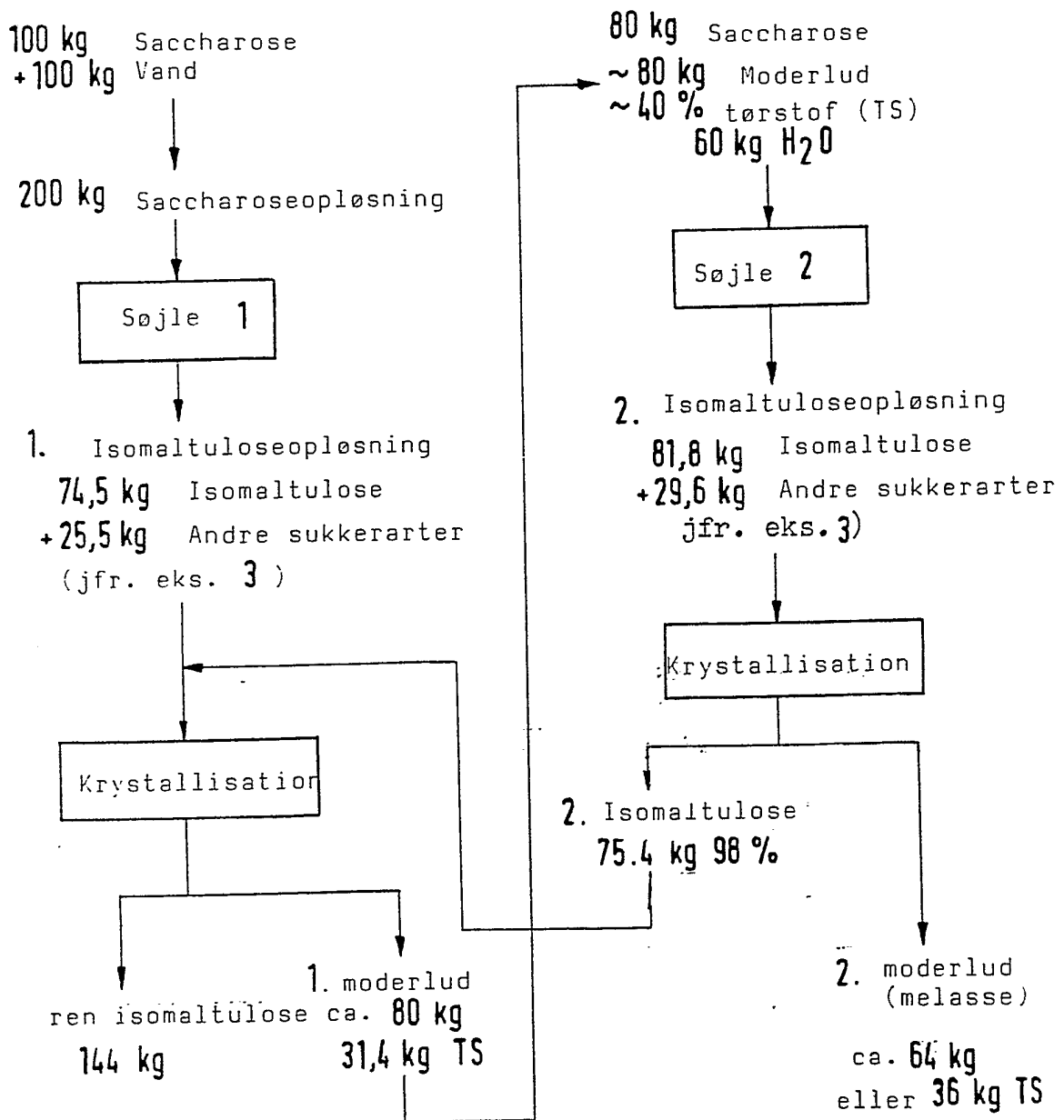


Fig. 1