



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 69098
UTLÄGKNINGSSKRIFT

C (45) Pat. - och rek. - förh. 10:10 1985
Patent meddelat

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 12 P 7/26, 19/02

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökning	820055
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	08.01.82
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	18.06.81
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	08.01.82
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.08.85
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	PCT/US81/00822
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	18.06.80
USA(US) 160763	

(71) Standard Brands Incorporated, 625 Madison Avenue, New York, New York, USA(US)

(72) John A. Maselli, Wilton, Connecticut,
Robert O. Horwath, Westport, Connecticut, USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä glukosonin valmistamiseksi hapettamalla glukosia entsyymaattisesti - Förfarande för framställning av glukoson genom att oxidera glukos enzymatiskt

(57) Tiivistelmä

Keksintö kohdistuu menetelmiin glukosonin valmistamiseksi hapettamalla entsyymaattisesti glukosia glukosi-2-oksidaasin avulla ensimmäisessä vyöhykkeessä ja erottamalla samanaikaisesti syntynyt vetyperoksidi mainitusta ensimmäisestä vyöhykkeestä puoliläpäisevän kalvon läpi toiseen vyöhykkeeseen, jossa alkeenin annetaan reagoida mainitun vetyperoksidin kanssa mainitun alkeenin hapetustuotteiksi, mainitun kalvon läpäistessä vain yhdisteet, joiden molekyylipaino on pienempi kuin noin 100.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser förfaranden för framställning av glukoson genom att enzymatiskt oxidera glukos med tillhjälp av glukos-2-oxidas i en första zon och genom att separera den samtidigt bildade väteperoxiden från nämnda första zon genom ett halvgenomsläppande membran in i en andra zon, var i en alken omsätts med nämnda väteperoxid till oxidationsprodukter av nämnda alken, varvid nämnda membran släpper igenom endast föreningar med en molekyylvikt av mindre än cirka 100.

Menetelmä glukosonin valmistamiseksi hapettamalla glukoosia entsyymaattisesti

Keksintö koskee uutta menetelmää glukosonin valmistamiseksi hapettamalla glukoosia entsyymaattisesti glukoosi-2-oksidaasin avulla. Saatu glukosoni voidaan muuttaa puhtausteeltaan ravinnoksi kelpaavaksi fruktoosiksi.

Kaupalliset menetelmät tärkeän makeutusaineen, fruktoosin, valmistamiseksi perustuvat yleensä kaksivaiheiseen menetelmään: ensin hydrolysoidaan polysakkaridi, kuten tarkkelys, glukoosiksi, ja sitten isomeroidaan siten valmistettu glukoosi fruktoosiksi. Jälkimmäisessä vaiheessa, kuten on tunnettua, muodostuu glukoosin ja fruktoosin seos, josta fruktoosi on vaikeasti eristettävissä. Kaupallinen erotusmenetelmä sisältää kalliiden ja aikaavievien kiteytymenettelmien käytön. Tarkempia kuvauksia eri menetelmistä glukosin isomeroimiseksi löytyy kirjallisuudesta, esim. US-patenttijulkaisut n:o 3 788 945 ja 3 616 221.

Glukoosi voidaan muuttaa fruktoosiksi myös entsyymin, nimittäin glukoosi-2-oksidaasin, avulla, jolloin muodostuu glukosonia (D-arabino-2-heksosuloosia), joka puolestaan voidaan pelkistää fruktoosiksi sinkillä ja etikkahapolilla [Folia Microbiol. 23 (1978), ss. 292 - 298 ja CS-patenttijulkaisu n:o 175 897].

Glukoosi-2-oksidaasin reaktio glukoosin kanssa glukosonin valmistamiseksi tuottaa myös ekvimolaarisen määrän vetyperoksidia. Siten muodostuneen vetyperoksidin käyttöä alkeeniin muuttamiseen vastaaviksi halogeenihydriineiksi ja epoksideiksi on ehdotettu EP-hakemusjulkaisussa n:o 7 176; julkaisun mukaan vetyperoksidi muodostetaan in situ lisäämällä glukoosi-2-oksidaasia ja glukoosia reaktioseokseen, joka sisältää halogenointientsyymiä ja epäorgaanista halogenidilähdettä, johon valittu alkeeni on tarkoitus liittää. EP-hakemusjulkaisusta ilmenee lisäksi, että glukoosin entsyymaattisen hapetuksen tuote, glukosoni, voidaan muuttaa fruktoosiksi yksinkertaisen kemiallisen hydrogenoinnin avulla.

Mainitulla menetelmällä valmistettu fruktoosi voi kuitenkin sisältää epäpuhtautena merkittäviä määriä sivutuotteita, jotka ovat peräisin sekä glukoosin entsyymaattisesta muuttamisesta että alkeenin muutosreaktiosta. Erityisesti jälkimmäinen reaktio tuottaa halogeenihydriinejä ja alkyleenioksidgeja, esimerkiksi etyleenioksidia, jotka ovat hyvin myrkyllisiä aineita jopa ppm-luokkaa olevina pitoisuuksina. Siten tällaisella menetelmällä valmistettu fruktoosi vaatii huolellisen ja kalliin puhdistuksen, jotta päästäisiin ravinnoksi kelpaavaan puhtausasteeseen. Lisäksi mahdollisuus, että fruktoosi kontaminoituu sivureaktioiden vaikutuksesta alkuperäisen valmistusvaiheen aikana, on melko suuri hyvin reaktiokykyisten tuotteiden, halogeenihydriinien ja alkyleenioksidien takia ja tarvitaan melkoisia puhdistuskäsittelyjä ravintona käytettävältä fruktoosilta vaadittavan korkean puhtausasteen saavuttamiseksi.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaisista, että glukoosin entsyymaattinen hapetus suoritetaan ensimmäisessä vyöhykkeessä, jolloin saadaan glukosonia, ja samalla muodostuu vetyperoksidia, joka erotetaan ensimmäisestä vyöhykkeestä puoliläpäisevän kalvon avulla toiseen reaktiovyöhykkeeseen glukosonin jäädessä ensimmäiseen vyöhykkeeseen, ja annetaan alkeenin reagoida vetyperoksidin kanssa toisessa vyöhykkeessä alkeenin hapetustuotteiden muodostamiseksi, mainitun kalvon läpäistessä vain yhdisteet, joiden molekyylipaino on pienempi kuin noin 100.

Keksinnön erään oleellisen sovellutuksen mukaisesti alkeeni muutetaan glykoliksi reaktiolla vetyperoksidin kanssa. Tätä reaktiota katalysoivat osmium, vanadiini tai kromioksidi tai ultraviolettisäteily, viitteissä: J. A. C. S. 58 (1936), 1302 ; ja 59 (1937), ss. 543, 2342 ja 2345, kuvattun menetelmän mukaisesti.

Keksinnön toisen sovellutuksen mukaisesti alkeeni muutetaan halogeenihydriiniksi ja sitten alkuperäistä alkeenia vastaavaksi alkyleenioksidiksi tai glykoliksi antamalla alkeenin reagoida vetyperoksidin, halogenointientsyymin ja

halogenidilähteen kanssa, jolloin muodostuu halogeenihydriiniä, joka sitten muutetaan epoksidiksi tai glykoliksi menetelmällä, joita kuvataan EP-hakemusjulkaisussa n:o 7 176.

5 Tässä menetelmässä käytettävien kalvojen tarkoituksena on muodostaa kaksi erillistä vyöhykettä ja mahdollistaa vetyperoksidin liikkuminen ensimmäisestä vyöhykkeestä toiseen. Kalvojen tulisi siksi olla huokoskooltaan sellaisia, että ne mahdollistavat vetyperoksidin siirtymisen selektiivisesti, mutta estävät ensimmäisessä vyöhykkeessä olevien suurempien molekyylien läpäisyn. Tällaisia kalvoja on 10 kaupallisesti helposti saatavissa, ja voidaan määritellä kalvon läpi kulkevien liuenneiden partikkeleiden molekyyli-painon mukaan. Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä tulisi käyttää kalvoja, jotka läpäisevät aineet, joiden molekyyli- 15 paino on pienempi kuin noin 100, edullisesti pienempi kuin 50.

Vetyperoksidin siirtymisen mainitun kalvon läpi tekee mahdolliseksi se, että muodostuu tasapainotila, joka perustuu vetyperoksidin suhteellisiin pitoisuuksiin kalvon 20 kummallakin puolella. Kun vetyperoksidin pitoisuus ensimmäisessä vyöhykkeessä kasvaa, vetyperoksidia pyrkii siirtymään toiseen vyöhykkeeseen, kunnes tasapaino on palautunut. Reaktio alkeenin kanssa toisessa vyöhykkeessä suurentaa vetyperoksidin virtausnopeutta kalvon läpi toisen vyöhykkeen suuntaan tasapainon saavuttamiseksi. 25

Tämän menetelmän käytöllä on huomattavia etuja erityisesti muutettaessa glukoosi edelleen fruktoosiksi. Vetyperoksidin siirtyminen pois ensimmäisestä vyöhykkeestä tietenkään nopeuttaa glukoosin entsyymaattista hapettumista 30 siten, että reaktio pyrkii tapahtumaan täydellisemmin, ja että reaktioajat voivat olla normaalisti vaadittavia lyhyempiä. Lisäksi ensimmäinen reaktiovyöhyke on miltei kokonaan vapaa kontaminoivista aineista, jotka kerääntyvät pääasiallisesti toiseen reaktiovyöhykkeeseen, jossa muodostunut vetyperoksidi reagoi. Ensimmäisessä reaktiovyöhykkeessä muodostunutta glukosonia voidaan käyttää sellaisenaan hydroge- 35 nointivaiheeseen, tai se voidaan väkevöidä tai käsitellä muu-

ten halutulla tavalla. Glukosoniliuos on miltei vapaa muis-
ta kontaminaatioista kuin pienestä määrästä reagoimatonta
glukoosia tai glukoosidimeeriä tai -trimeeriä ja alkuperäi-
sen glukoosilähteen mukana mahdollisesti tulleista kontami-
5 noivista aineista. Glukoosi-lähtöaine on yleensä glukoosi-
yksiköitä sisältävän luonnontuotteen, tavallisimmin tärkke-
lyksen, hydrolysaatti, joka sisältää liukenevia kontaminoi-
via aineita, kuten muita sokereita, esimerkiksi maltoosia,
joita muodostuu tärkkelyksen hydrolyysissä.

10 Siten ensimmäisen vyöhykkeen reaktiotuotteen pelkis-
tyksessä saadaan tuote, fruktoosi, joka on suhteellisen puh-
das kontaminoivista aineista, jotka vaikuttavat tuotteen
puhtausasteeseen ravintona käytettäessä; kontaminoivat ai-
neet ovat peräisin ainoastaan glukoosin luonnollisista läh-
15 teistä, esimerkiksi tärkkelyksistä, kuten maissitärkkelyk-
sestä.

Alkeenireaktiovyöhyke on myös puhtaampi kuin on saa-
vutettavissa annettaessa molempien reaktioiden tapahtua sa-
massa reaktorissa.

20 Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävät kal-
vot ovat mitä tahansa vesipitoisissa järjestelmissä tavalli-
sesti käytettäviä kalvoja, ja niitä on olemassa laaja vali-
koima. Tavallisemmat kalvot muodostuvat nailonista, styree-
nipolymeeristä, tavallisesti polystyreeniteflonista tai sel-
25 luloosaesteristä, kuten selluloosa-asetaatista tai -propio-
naatista. Ensimmäisessä sovellutuksessa kalvo asennetaan
reaktoriin siten, että muodostuu kaksi vyöhykettä, ja että
kahden vyöhykkeen sisältöjen tahaton sekoittuminen estyy.
Toisessa sovellutuksessa erilliset reaktorit voidaan liit-
30 tää toisiinsa valitun kalvon avulla, joka muodostaa yhdistä-
misessä välttämättömän välipinnan. Jotta vetyperoksidi siir-
tyisi mahdollisimman hyvin ensimmäisestä vyöhykkeestä toi-
seen, ovat edullisia kalvot, joilla on merkittävä vapaa
pinta-ala, mistä syystä ensimmäinen sovellutus on edullisem-
35 pi.

Glukoosi-2-oksidaasi voi olla entsyymiliuksena vedessä sidottuna entsyyminä tai sidottuina soluina tai huovastona tai vapaina soluina tai huovastona. Koska entsyymi on solunsisäinen, valitun mikro-organismin soluja tai huovastoa käytetään tavallisimmin yksinkertaisesti suspendoimalla ne reaktioliuokseen. Entsyymien aktivaattoreita ja niiden suojaajia voi olla myös läsnä. Esimerkiksi, kuten on kuvattu edellä mainitussa viitteessä [Folia Microbiol. 23 (1978), ss. 292 - 298], fluoridi-ionin läsnäolo edistää glukosin entsyymaattista hapetusta *O. mucida*'n avulla. Entsyymien suojaajia, esimerkiksi Co-, Mn- ja Mg-suoloja, voidaan myös käyttää. Entsyymaattisen hapetusreaktion annetaan tapahtua käytännöllisesti katsoen täydellisesti, mikä voidaan määrittää tutkimalla seoksen glukosipitoisuus yhtä suuria määriä käyttäen tai määrittämällä glukosoni kolorimetrisesti tai määrittämällä vetyperoksidi. Tavallisesti reaktioajat 24 - 48 tuntia ovat riittäviä riippuen entsyymin voimakkuudesta tai aktiivisuudesta.

Monenlaisia mikro-organismeja voidaan käyttää tuottamaan tässä menetelmässä käytettävää glukoosi-2-oksidaasia. Kirjallisuudessa kuvataan esimerkiksi seuraavia tähän tarkoitukseen sopivia mikro-organismeja:

- 1) *Aspergillus parasiticus* [Biochem. J. 31 (1937), s. 1033].
- 2) *Iridophycus flaccidum* [Science 123 (1956), s. 171].
- 3) *Oudemansiella mucida* [Folia Microbiol. 13 (1968), s. 334, ibid. 23 (1978), ss. 292 - 298].
- 4) *Gluconobacter roseus* [J. Gen. Appl. Microbiol. 1 (1955), s. 152].
- 5) *Polyporus obtusus* [Biochem. Biophys. Acta 167 (1968), s. 501].
- 6) *Corticium caeruleum* [Phytochemistry 16 (1977), ss. 1895 - 1897].

Entsyaattisen hapetusreaktion lämpötila ei ole kriittinen. Reaktio voidaan suorittaa huoneen lämpötilassa tai jonkin verran korkeammassa lämpötilassa, käytettävän entsyymijärjestelmän lämmönkestävyyden ollessa kohtalainen. On erityisen edullista käyttää lämmössä stabiileja entsyymijärjestelmiä 50^oC:ssa tai lämpimämmässä, missä lämpötiloissa reaktioseoksen bakteerikontaminaatiot ovat mahdollisimman pieniä. Entsyaattinen reaktioseos voi vaihtoehtoisesti sisältää antibakteerisia aineita ylimääräisen bakteerikasvun estämiseksi.

Ensimmäinen reaktiovyöhyke ei saisi tietenkään sisältää merkittäviä määriä vetyperoksidia pelkistävää ainetta, jotta päästäisiin tämän menetelmän mukaisiin edullisiin tuloksiin. Siten järjestelmän tulisi olla miltei vapaa vetyperoksidia pelkistävistä aineista, so. ei-pelkistävä systeemi.

Tämän prosessin aikana on mahdollista, että jonkin verran ainetta diffundoituu toisesta reaktiovyöhykkeestä ensimmäiseen, erityisesti kun toinen reaktiovyöhyke sisältää anioneja, kationeja tai pienimolekyylisiä yhdisteitä, mutta tällainen diffuusio ei ole merkittävää näissä olosuhteissa.

Glukosonin pelkistys fruktoosiksi suoritetaan tunnetuilla menetelmillä, joihin kuuluu kemiallinen pelkistys esimerkiksi sinkin ja etikkahapon avulla sekä katalyyttinen hydrogenointi tavanomaisten metallikatalysaattorien avulla. Näistä on edullinen metallikatalysaattori Raney-nikkeli, koska sen käyttö soveltuu vaadittaessa fruktoosilta ravintokäyttöön riittävää puhtausastetta. Yleensä glukosoni hydrataan korotetussa paineessa ja korotetussa lämpötilassa metallikatalysaattorin läsnäollessa, kunnes on saavutettu haluttu hydrogenoitumisaste. Paine voi olla 100 - 700 atm tai jopa suurempi, ja lämpötila on enintään noin 200^oC. Edullisesti lämpötila on 100 - 150^oC ja paine noin 500 atm.

Seuraava esimerkki valaisee keksintöä.

Esimerkki

O. mudica-huovastoa kasvatetaan CS-patenttijulkai-
 sun n:o 175 897 esimerkin 1 mukaisesti ja 15 g (kuivapai-
 5 no) huovastoa suspendoidaan 10 litran reaktorin, joka on
 jaettu vetyperoksidia läpäisevällä kalvolla kahteen vyöhyk-
 keeseen, toisessa vyöhykkeessä olevaan 3 litraan 2,5-% glu-
 koosiliuosta, jossa on 0,05 moolia natriumfluoridia. Toi-
 sessa vyöhykkeessä, johon johdetaan etyleenikaasua, on kloo-
 10 riperoksidaasin ja halogenidi-ionin vesiliuos, joka on pus-
 kuroitu fosfaattipuskurilla (0,1-m kaliumfosfaatti), kuten
 on kuvattu EP-hakemusjulkaisussa n:o 7 176 (esimerkit 1 -
 18).

Ensimmäisessä vyöhykkeessä olevaa suspensiota se-
 15 koitetaan 25°C:ssa ja siihen johdetaan happea. 24 tunnin ku-
 luttua huovasto erotetaan ensimmäisessä vyöhykkeessä ole-
 vasta liuoksesta ja saatu kirkas liuos hydrataan vedyllä
 Raney-nikkelin läsnäollessa 500 atm:n paineessa 100°C:ssa.
 Reaktioseos suodatetaan katalysaattorin poistamiseksi, suo-
 20 doksen väri poistetaan hiilen avulla, deionisoidaan ionin-
 vaihtajien avulla (anioninen ja kationinen) ja väkevöidään
 fruktoosisiirapiksi alipaineessa. Vaihtoehtoisesti vesiliuos
 väkevöidään ja fruktoosin annetaan kiteytyä.

Fruktoosi, joka saadaan siirappina tai kiteisenä
 25 tuotteena, on puhtausasteeltaan ravinnoksi sopivaa.

Halogeenihydriinit, jotka saadaan toisessa vyöhyk-
 keessä tapahtuvassa reaktiossa, muutetaan vastaaviksi epok-
 sideiksi käsittelemällä natriumhydroksidilla.

Olenmaisilta osiltaan samanlaisia tuloksia saadaan,
 30 kun O. mucida korvataan seuraavilla mikro-organismeilla:

Polyporus obtusus
 Radulum casearium
 Lenzites trabea
 Irpex flanus
 35 Polyporus versicolor
 Pellicularia filamentosa
 Armillaria mellea
 Schizophyleum commune
 Corticium caeruleum

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä glukosonin valmistamiseksi hapettamalla glukoosia entsyymaattisesti glukoosi-2-oksidaasin avulla, t u n n e t t u siitä, että glukoosin entsyymaattinen hapetus suoritetaan ensimmäisessä vyöhykkeessä, jolloin saadaan glukosonia, ja samalla muodostuu vetyperoksidia, joka erotetaan ensimmäisestä vyöhykkeestä puoliläpäisevän kalvon avulla toiseen reaktiovyöhykkeeseen glukosonin jäädessä ensimmäiseen vyöhykkeeseen, ja annetaan alkeenin reagoita vetyperoksidin kanssa toisessa vyöhykkeessä alkeenin hapetustuotteiden muodostamiseksi, mainitun kalvon läpäistessä vain yhdisteet, joiden molekyylipaino on pienempi kuin noin 100.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alkeenin ja vetyperoksidin reaktiotuote on glykoli.
- 20 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alkeenin ja vetyperoksidin reaktiotuote on vastaava alkyleenihalogeenihiydriini.
4. Menetelmä patenttivaatimusten 1 - 3 mukaisella menetelmällä saadun tuotteen edelleen käsittelymiseksi, t u n n e t t u siitä, että se pelkistetään fruktoosiksi.
- 25 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pelkistys suoritetaan katalyyttisesti hydrogenoimalla.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että katalyysaattori on Raney-nikkeli.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av glukoson genom att oxidera glukos enzymatiskt med tillhjälp av glukos-2-oxidas, k ä n n e t e c k n a t därav, att den enzymatis-
5 ka oxideringen av glukos utföres i en första zon, varvid erhålles glukoson och samtidigt bildas väteperoxid, vilken separeras från nämnda första zon genom ett halvpermeabelt membran in i en andra reaktionzon, varvid glukosonen kvar-
10 blir i den första zonen och en alken omsättes med väteperoxiden i den andra zonen för bildning av oxidationsprodukter av alkenen, varvid nämnda membran släpper igenom endast föreningar med en molekylvikt av mindre än ca 100.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att produkten av nämnda reaktion mellan en alken och väteperoxid är glykol.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att produkten av nämnda reaktion mellan en alken och väteperoxid är den motsvarande alkylen-
20 halogenhydrid.

4. Förfarande för vidarebehandling av den enligt förfarandet enligt patentkraven 1 - 3 erhållna slutprodukten, k ä n n e t e c k n a t därav, att den reduceras till fruktos.

25 5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att reduktionen utföres genom katalytisk hydrogenering.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att katalysatorn är Raney-nickel.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patentansökningar: 802967.

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: EP 7176 (C 07 D 301/00).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 911 140 (A 23 C 9/12).