

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

  
(11) 158363 B

(21) Patentansøgning nr.: 5445/82

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> C 12 P 19/24

(22) Indleveringsdag: 08 dec 1982

C 12 M 1/40

(41) Alm. tilgængelig: 10 jun 1983

(44) Fremlagt: 07 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 09 dec 1981 DE 3148603

(71) Ansøger: \*KALI-CHEMIE AKTIENGESELLSCHAFT; Hans-Boeckler-Allee 20; D-3000 Hannover, DE

(72) Opfinder: Guenter \*Weidenbach; DE, Dirk \*Bonse; DE, Boris \*Meyer; DE

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) **Fremgangsmåde og anlæg til fremstilling af isomerase**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5445-82

Der fremstilles en opløsning indeholdende glucose og fructose kaldet isomerase ved omsætning af en glucoseholdig opløsning på en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærer fremstillet katalysator med glucoseisomerase-aktivitet. Katalysatorens produktivitet forøges betydeligt ved, at man før omsætningen på bærekatalysatoren bringer den glucoseholdige opløsning i kontakt med forlegemer af  $\text{SiO}_2$  eller alumosilicat. I et anlæg omfattende en med bærekatalysatoren fyldt reaktor gøres dette ved, at man foran reaktoren indskyder en forsejle fyldt med forlegemer af  $\text{SiO}_2$  eller alumosilicat.

DK 158363 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en opløsning indeholdende glucose og fructose ved omsætning af en glycoholdig opløsning på en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillet katalysator med glucoseisomerase-aktivitet og et anlæg til udøvelse af denne fremgangsmåde.

5

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

10

Den enzymatiske omdannelse af glucose til en glucose-fructose-blanding har i den seneste tid vundet stigende betydning. Blandingen forhandles derved mest i form af en sirup, kaldet isomerase, og erstatter frem for alt i levnedsmiddel- og drikkevareindustrien saccharose (rørsukker, roesukker) fra sukkerrør eller sukkerroer, som

15

verden over bliver stadig knappere og dyrere. Som kilde for den til fremstillingen af glucose-fructose-blandingen nødvendige glucose tjener naturlige stivelsesforekomster, f.eks. majs- eller kartoffelstivelse, som ved sur og/eller enzymatisk hydrolyse omdannes til glucose.

20

Til enzymatisk omdannelse af glucosen til fructose udsætter man en vandig glucoseopløsning, eventuelt under tilsætning af isomeriseringsfremmende stoffer (f.eks. cobalt- eller magnesium-ioner) for indvirkningen af glucoseisomerase, indtil den ønskede isomeriseringsgrad er nået, skiller så eventuelt tilsætningerne fra opløsningen og inddamper eventuelt opløsningen til en sirup.

25

30

Tidligere har man derved overvejende arbejdet chargevis og enten benyttet isoleret glucoseisomerase eller glucoseisomerase efterladt i cellerne af de glucoseisomerase-producerende mikroorganismer. Da en således anvendt glucoseisomerase ikke eller kun under stort besvær kan genvindes og genanvendes, anvender man i nyere

35

tid mere og mere glucoseisomerase, som ved fiksering i

cellerne er gjort vandopløselige og ved tilsætninger er fastholdt mekanisk. Endvidere kan glucoseisomerase bindes adsorptivt eller kovalent til uorganiske eller organiske bærere og derved gøres vandopløselig. En således fikseret og størknet eller bærerbundet glucoseisomerase kan genanvendes flere gange, og man kan dermed gå over til kontinuerlige fremgangsmåder, idet man f.eks. fylder den bærerbundne glucoseisomerase i en reaktor og lader glucoseopløsningen (substratet) strømme igennem reaktoren.

Den for sådanne kontinuerlige fremgangsmåder nødvendige bærerbundne glucoseisomerase, i det følgende betegnet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet, er i sig selv en del af teknikken. Som eksempel herpå kan nævnes DE patentskrift nr. 2 726 188, som især beskriver en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af en glucose- og fructose-holdig opløsninger bygger på sådanne kontinuerligt gennemførlige fremgangsmåder, hvorved glucoseopløsningen (substratet) strømmer igennem en reaktor, som indeholder en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet.

Opfindelsen bygger på følgende erkendelser:

Isomerosens konkurrencedygtighed i forhold til naturlig saccharose bestemmes foruden af dens pris hovedsageligt af den fructoseindhold, da dette er et mål for sødekraften. I modsætning til naturlig saccharose, et disaccharid af glucose og fructose, hvori glucosen og fructosen foreligger i molforholdet 1:1, er isomerosens indhold af glucose og fructose og dermed dens sødekraft varierende og afhænger først og fremmest af glucoseisomerasens indvirkningstid på glucoseopløsningen og

af den temperatur, hvorved indvirkningen finder sted. Den maximalt ved 60 °C opnåelige termodynamiske ligevægt, som indstiller sig efter tilstrækkelig lang tids indvirkning, ligger ved en isomeriseringsgrad på omkring 51%, dvs. af 5 100 anvendte molekyler glucose foreligger 51 molekyler som fructose. Markedet har i dag accepteret en isomerase med et fructoseindhold på 42% i tørstoffet. Da glucoseindholdet i de tekniske udgangsprodukter i regelen ligger mellem 90 og 95%, kræves i praksis isomeriseringsgrader 10 på 44-47% til at indstille dette fructoseindhold. For at opnå sådanne isomeriseringsgrader kan en på basis af SiO<sub>2</sub>-bærere fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet kun drives med en ganske bestemt, af den forhåndenværende aktivitet afhængig rumhastighed. 15 Moderne højaktive katalysatorer, som de f.eks. kan fremstilles ved fremgangsmåden ifølge DE patentskrift nr. 2 726 188, kan drives med begyndelsesrumhastigheder på fra omkring 10 til omkring 20 v/vh.

20 Med tiltagende driftstid synker imidlertid aktiviteten af de kendte katalysatorer mere eller mindre hurtigt i afhængighed af reaktionstemperaturen.

Den kendte katalysator ifølge DE patentskrift nr. 25 2 726 188 har efter ca. 670 driftstimer ved 60 °C kun 50% af sin begyndelsesaktivitet. For at opnå den samme isomeriseringsgrad som i begyndelsen kan en sådan katalysator kun drives med den halve begyndelsesrumhastighed. 20% restaktivitet, der må anses for den 30 nedre grænse for den økonomiske anvendelighed, nås efter 1700 driftstimer.

Det har nu overraskende vist sig, at driftstiden af en på basis af SiO<sub>2</sub>-bærere fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet kan mere end fordobles, hvis man 35 før omsætningen på katalysatoren bringer den glucoseholdige opløsning i kontakt med formlegemer af SiO<sub>2</sub> eller

aluminosilicat. Masseforholdet mellem katalysator og formlegemer ligger hensigtsmæssigt mellem 3:1 og 1:3, fortrinsvis ved 1:1. Ved denne fremgangsmåde fordobles også katalysatorens produktivitet. Produktiviteten defineres som den substratmængde, beregnet som tørstof (kg), som kan forarbejdes til en given isomeriseringsgrad af 1 kg katalysator indtil katalysatoren har nået en restaktivitet på 20% af begyndelsesaktiviteten.

Anlæg til især kontinuerlig omdannelse af glucose til fructose indeholder foruden reaktoren for den på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillede katalysator med glucoseisomeraseaktivitet yderligere nødvendige bestanddele, såsom forråds- og opsamlingsbeholdere, ledninger, pumper, måleapparater, tempereringsindretninger og lignende. Anlægget ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at der foran reaktoren er indskudt en forsøjle fyldt med formlegemer af  $\text{SiO}_2$  eller aluminosilicat. Forsøjlels volumen holdes således i forhold til reaktorens volumen, at der under hensyntagen til katalysatorens og forsøjlematerialets ifyldningsrumvægt kan opnås det ovennævnte masseforhold mellem katalysator og formlegemer.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes især til kontinuerlig isomerisering derved, at man indstiller en vandig glucoseopløsning, fortrinsvis med et indhold på fra omkring 40 til omkring 50 vægt-% tørstof, på en for den bærerbundne glucoseisomerase egnet pH-værdi, opvarmer opløsningen til den egnede isomeriseringstemperatur og pumper opløsningen først igennem forsøjlen fyldt med  $\text{SiO}_2$  eller aluminosilicat og derpå igennem reaktoren fyldt med den på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillede katalysator med glucoseisomeraseaktivitet. Den resulterende glucosefructoseopløsning analyseres med regelmæssige mellemrum for dens fructoseindhold, f.eks. ved hjælp af polarimetrisk analyse eller højtryks-væskechromatografi. Den rumhastighed, hvormed katalysatoren drives, indstilles

derved således, at den resulterende opløsning har et indhold på omkring 42 vægt-% fructose beregnet på basis af tørstof.

5 Forsøjlemateriale med en kornstørrelse på fra omkring 0,5 til omkring 5,0 mm og katalysator med immobiliseret glucoseisomeraseaktivitet med en kornstørrelse på fra omkring 0,08 til omkring 0,5 mm har vist sig særlig fordelagtige.

10 Hvis der ved fremstillingen af den på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillede katalysator med glucoseisomeraseaktivitet er anvendt en *Streptomyces albus* glucoseisomerase, har indstilling af glucoseopløsningen på en pH-værdi på fra omkring 7,0 til omkring 8,5 og opvarmning af glucoseopløsningen til en temperatur på fra omkring 55 til omkring 65 °C vist sig særlig gunstig.

20 Ved en *Streptomyces albus* glucoseisomerase har desuden tilsætning af Co(II)- og Mg(II)-ioner til glucoseopløsningen i mængder på fra omkring 0,1 til omkring 2 ppm Co(II) og fra omkring 10 til omkring 200 ppm Mg(II), hensigtsmæssigt i form af deres vandopløselige salte som f.eks. chlorider eller phosphater, vist sig isomeriseringsfremmende.

30 Endelig er det fordelagtigt at tilsætte glucoseopløsningen en stabiliserende mængde af en antioxidant, fortrinsvis  $\text{SO}_2$ , i en mængde på fra omkring 100 til omkring 600 ppm i form af alkalimetalsulfit eller -hydrogensulfit.

35 Før den opnåede glucose-fructose-opløsning inddampes til sirup, eller opløsningen fremføres til sin endelige anvendelse, kan det endvidere anbefales at fjerne de uønskede, f.eks. smagsforringende ionkomponenter fra glucose-fructose-opløsningen ved hjælp af kation- og anionbyttere.

Opfindelsen belyses nærmere ved de følgende eksempler.

#### EKSEMPEL 1

5 5 g af en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet, fremstillet ifølge DE patentskrift nr. 2 726 188 og med de nedenfor beskrevne egenskaber, blev fyldt i en reaktor, foran hvilken der var indskudt en søjle, som indeholdt 5 g af et kommer-  
10 cielt tilgængeligt kugleformigt vandfast porøst aluminosilicat (af typen KCT-WS fra Kali-Chemie AG, sammensætning omkring 97 vægt-%  $\text{SiO}_2$  og 3 vægt-%  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Gennem dette forsøjle-reaktor-system blev pumpet en til  
15 60 °C opvarmet glucoseopløsning. Indstillingen af rumhastigheden (beregnet på det af katalysatoren udfyldte reaktorvolumen) foregår således, at isomeriseringsgraden over hele driftstiden konstant udgjorde 46,5%. Isomeriseringsgraden af den udstrømmende substratopløsning blev målt polarimetrisk. I detaljer er katalysator,  
20 forsøjlefyldning og fremgangsmåde kendetegnet ved følgende parametre:

#### 1. Katalysator

- 25 1.1 bærer:  $\text{SiO}_2$   
1.2 aktivitet: 9000 enh/g  
1.3 kornstørrelse: 0,1 - 0,2 mm  
1.4 ifyldningsrumvægt (tør): 0,45 kg/l

#### 30 2. Forsøjlefyldning

- 2.1 fyldmateriale: KCT-WS (Kali-Chemie AG)  
2.2 kornstørrelse: 1 - 2 mm  
2.3 ifyldningsrumvægt (tør): 0,70 kg/l

3. Fremgangsmåde

- 3.1 substrat: 45 vægt-% glucose i vandig opløsning
- 5 3.2 cofaktorer: 120 ppm Mg(II)  
1 ppm Co(II)  
200 ppm SO<sub>2</sub> (i form af Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)
- 3.3 pH-værdi: 7,5
- 10 3.4 substratdensitet: 1,2 kg/l
- 3.5 substratindgangstemperatur: 60 °C
- 3.6 isomeriseringsgrad: 46,5 %
- 3.7 begyndelsesrumhastighed: 13,0 h<sup>-1</sup>

15

4. Aktivitetsbestemmelse af glucoseisomeraseopløsningen

Aktiviteten af den til fremstilling af katalysatoren anvendte glycoeseisomeraseopløsning blev bestemt ved Takasaki-metoden (se Y. Takasaki: Agr. Biol. Chem. Vol. 30, Nr. 12, 1247-1253, 1966 og Z. Dische og E. Borenfreund: J. Biol. Chem. 192, 583, 1951). En aktivitetseenhed (enh.) er defineret som den enzymmængde, som under inkubationsbetingelser danner 1 mg fructose.

20

25

Inkubationsbetingelser

- Temperatur: 65 °C
- 30 reaktionstid: 1 h
- substrat: 0,1 M glucose x H<sub>2</sub>O  
(Merck 8342) i 0,05 M  
phosphatpuffer, pH 8,0  
med 0,0004 M MgSO<sub>4</sub>

35

Eksemplet gav følgende resultater:

	Halveringstid:	1300 h
	Driftstid til restaktivitet på 20%:	3800 h
5	Middelaktivitet over driftstiden 3800 h:	44,0 % (beregnet på begyndelsesaktivitet 100%)
10	Produktivitet efter 3800 h:	26000 kg TS med 46,5 % fructose/kg katalysator

EKSEMPEL 2

5 g af en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet ifølge eksempel 1 blev fyldt i en reaktor, foran hvilken der var indskudt en søjle, som indeholdt 10 g af et kommercielt tilgængeligt kugleformigt vandfast porøst  $\text{SiO}_2$  (af typen AF 125 fra Kali-Chemie AG,  $\text{SiO}_2$ -indhold større end 99 vægt-%). Den videre fremgangsmåde svarede til eksempel 1. Forsøjs-  
lefyldningen var kendetegnet ved følgende parametre:

1. Fyldmateriale: AF 125 (Kali-Chemie AG)
2. Kornstørrelse: 1 - 2 mm
3. Ifyldningsrumvægt (tør): 0,45 kg/l

Forsøgsresultaterne var identiske med de i eksempel 1 beskrevne.

30 EKSEMPEL 3

Til sammenligning blev eksempel 1 gentaget med den samme katalysator under i øvrigt samme fremgangsmådebetingelser, men uden forsøjle. Eksempel 3 gav følgende  
35 resultater:

	Halveringstid:	670 h
	Driftstid til restaktivitet på 20 %:	1700 h
5	Middelaktivitet over drifts- tiden 1700 h:	47,2% (beregnet på begyndelsesaktivitet 100%)
	Produktivitet efter 1700 h:	12 500 kg TS med 46,5% fructose/kg katalysator

10

Til anskueliggørelse af resultaterne ifølge eksemplerne 1, 2 og 3 blev aktivitetsaftagelsen i afhængighed af driftsiden vist i fig. 1. Af denne figur ses tydeligt den stabilisering af katalysatorens aktivitet over en lang driftsperiode, som opnås ved anvendelsen af den med aluminosilicat- eller  $\text{SiO}_2$ -perler fyldte forsøjle (eksempel 1 og 2) ifølge opfindelsen.

15

I fig. 2 er vist den for fremgangsmådens økonomi bestemmende udvikling af produktiviteten i afhængighed af driftstiden. De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemførte eksempler 1 og 2 forhøjede den økonomisk udnyttelige specifikke ydeevne af katalysatoren med faktoren 2,08, dvs. til fremstilling af en bestemt mængde isomerase kræves kun mindre end den halve katalysatormængde. Da det ifølge opfindelsen anvendte forsøjlemateriale kun udgør en brøkdel af katalysatoromkostningerne, er den økonomiske fordel ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen betydelig.

25

30

35

## P a t e n t k r a v:

-----

5 1. Fremgangsmåde til fremstilling af en opløsning inde-  
holdende glucose og fructose ved omsætning af en  
glucoseholdig opløsning på en på basis af  $\text{SiO}_2$ -bærere  
fremstillet katalysator med glucoseisomeraseaktivitet,  
k e n d e t e g n e t ved, at man før omsætningen på  
10 katalysatoren bringer den glucoseholdige opløsning i  
kontakt med formlegemer af  $\text{SiO}_2$  eller aluminosilicat.

15 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved, at masseforholdet mellem katalysator og formlegemer  
ligger mellem 3:1 og 1:3, fortrinsvis ved 1:1.

20 3. Anlæg til udøvelse af fremgangsmåden ifølge ethvert af  
kravene 1 eller 2 med en reaktor fyldt med den på basis  
af  $\text{SiO}_2$ -bærere fremstillede katalysator med glucose-  
isomeraseaktivitet, k e n d e t e g n e t ved, at der  
foran reaktoren er indskudt en forsøjle fyldt med form-  
legemer af  $\text{SiO}_2$  eller aluminosilicat.

25

30

35

—x— Eksempel 1 og 2  
—•— Eksempel 3

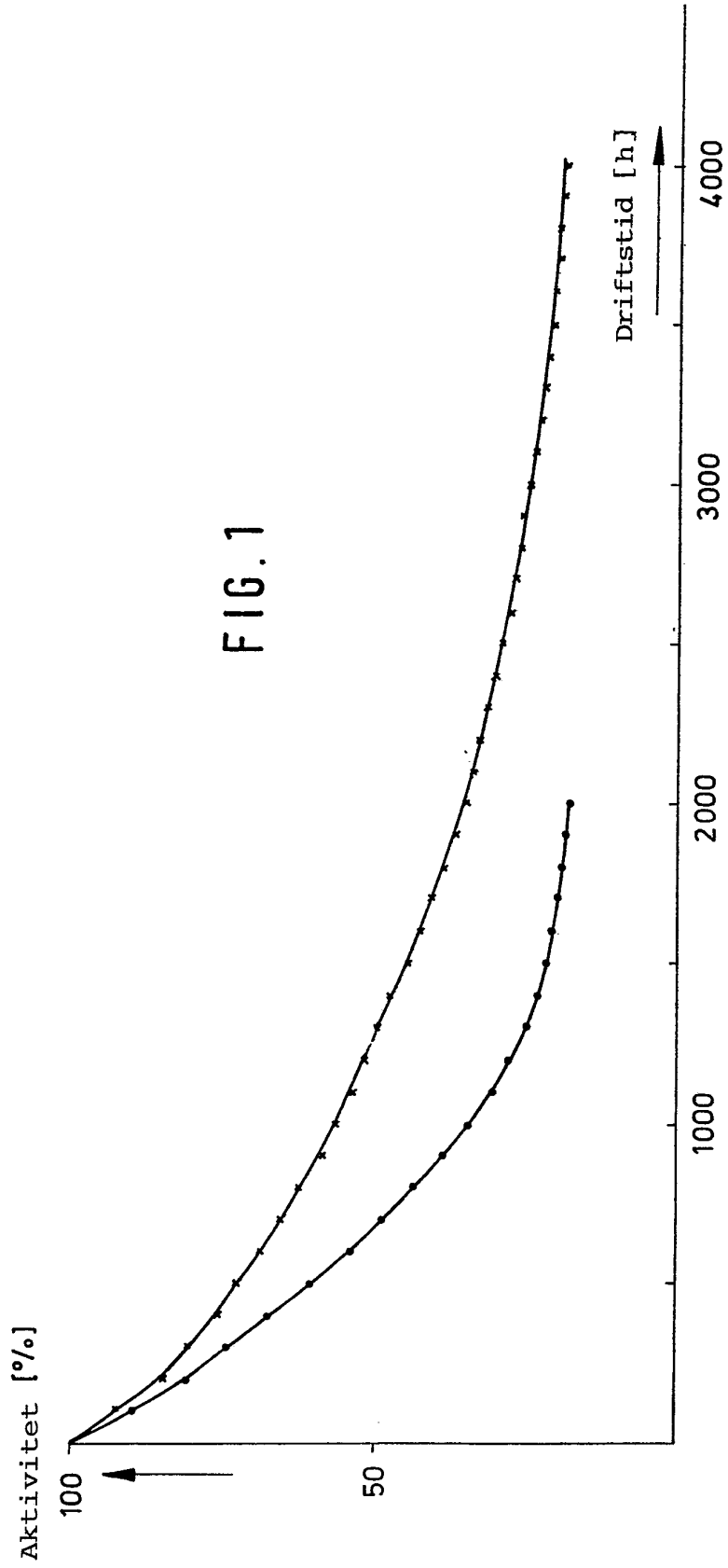


FIG. 1

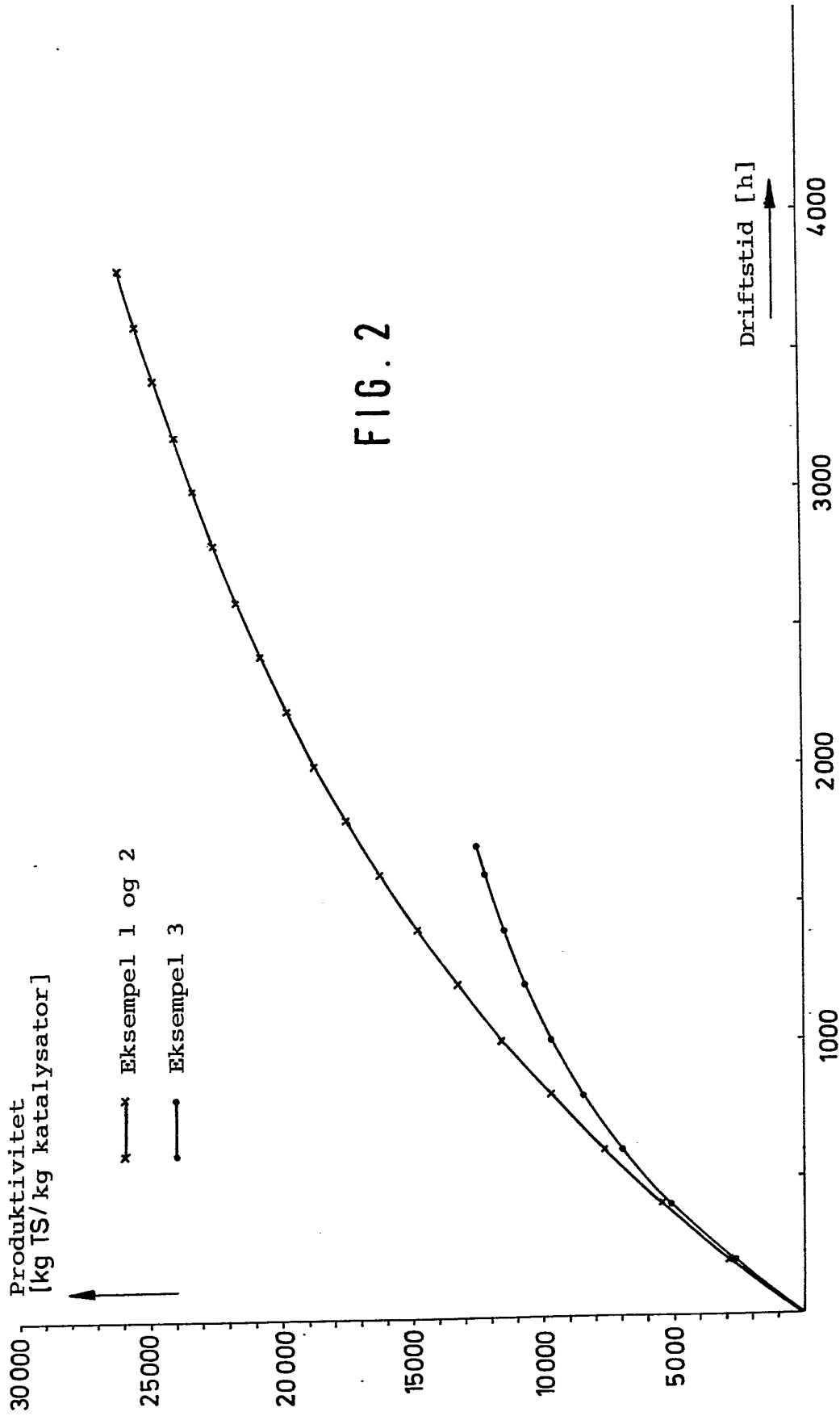


FIG. 2