ETH zürich

ETH Library

Integration of biocatalysis and simulated moving bed chromatography for the high-yield production of rare sugars

Doctoral Thesis

Author(s):
Wagner, Nina

Publication date:
2014

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-010346995

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

DISS.ETH NO 22340

Integration of biocatalysis and simulated moving bed chromatography for the high-yield production of rare sugars

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH
(Dr.sc. ETH Zurich)

presented by
Nina Wagner
Dipl.-Ing., BOKU University, Vienna

born 17.12.1982
citizen of Austria

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Sven Panke (ETH Zurich, Switzerland), examiner
Prof. Dr. Marco Mazzotti (ETH Zurich, Switzerland), co-examiner

2014

Abstract

Rare monosaccharides are typically difficult to interconvert from available bulk sugars by traditional chemical synthesis as the multifunctionality of sugars leads to a strong requirement for protection-group chemistry. This favors the use of substrate- and stereoselective enzymes. In principle, enzyme cascades based on available iso- and epimerases allow the facile and generic synthesis of many rare monosaccharides from a set of inexpensive bulk sugars such as D-glucose, D- galactose, L-sorbose and D-fructose. However, isomerization and epimerization reactions suffer from an unfavorable position of the thermodynamic equilibrium imposing a severe yield limitation, frequently between 20 and 70%, and thus preventing the industrial application of such enzyme casdades. However, the equilibrium problem can be overcome by integrating biocatalysis and separation into one operation. In this work we have investigated a novel integrated process strategy consisting of enzymatic conversion in an enzyme membrane reactor (EMR), substrate and product separation in a simulated moving bed (SMB) chromatography unit and nanofiltration (NF) concentration of the recycled substrate for improving the yields in rare sugar production. This enabled a theoretical yield of 100% during continuous operation.

Starting from the previously mentioned bulk sugars most of the possible rare hexose sugars can be produced combining a maximum of three available isomerase and epimerase enzymes. Therefore, this strategy in principle offers a generic route for rare sugar manufacturing. Here, we selected the rare sugar D-psicose as target compound. D-Psicose can be produced from D-fructose in a single-step enzymatic conversion at the C3 position using the enzyme D-tagatose epimerase, or in a three enzyme reaction cascade from sucrose via sucrose hydrolysis to fructose and glucose, fructose/glucose isomerization and finally the epimerization from fructose to psicose. First, an experimental implementation of the one enzyme process concept was realized to confirm the principal feasibility of the integrated process concept for high-yield production of D-psicose. The integrated process implementation allowed shifting product yield from 25% (possible in batch operation) to 97% and additionally constituted the first experimental report on the proposed integrated set-up. Moreover, a number of important practical aspects were analyzed such as process stability and robustness and an accelerated start-up procedure was suggested.

Rational design of the integrated process required a detailed characterization of all involved unit operations. A particular focus of this work was therefore on the design and optimization of the SMB separation of D-fructose and D-psicose on Ca^{2+} substituted SMB ion exchange material. To this end, chromatographic parameter estimation was

established based on the inverse method which allowed the accurate parameterization of the adsorption and kinetic behavior over a wide temperature range (20 to 70°C). A true moving bed (TMB) model was established for the description of SMB performance and further applied for the multi-objective optimization of the SMB separation employing a Pareto approach. The optimization revealed the optimal SMB operation point at high temperatures (70°C) indicating that the decreased selectivity of the stationary phase at higher temperatures could be fully compensated by the gain in mass transfer affording an overall higher productivity. Based on these results, a comprehensive design and cost-based optimization strategy was established based on an integrated process model.

An important objective of the presented model constituted the incorporation of the temperature dependence of the enzyme kinetics and stability at elevated temperatures. A model-based parameter estimation procedure was established which allowed to evaluate thermodynamic and kinetic enzyme parameters as a function of the EMR operating temperature. This finally enabled us to investigate the EMR temperature as a design variable during process optimization and to devise an enzyme-efficient method to operate the EMR at constant conversion, a prerequisite for robust operation of the integrated process and a major challenge due to the inherent instability of the biocatalysts under elevated temperatures.

Finally, we applied the process concept to the multi-enzyme scenario which involved the use and characterization of two further biocatalysts (invertase, D-xylose isomerase) and the extension of the SMB separation to a 3-component mixture. The presented successful experimental operation of a complex multi-enzyme integrated process represents the first attempt implementing a separation integrated reaction cascade and allowed the stable production of D-psicose in high purities (99%) and high yields (96%).

Zusammenfassung

Seltene Zucker können in der Regel nur schwer durch traditionelle chemische Synthese aus verfügbaren Zuckern hergestellt werden, da ihre Multifunktionalität den Einsatz von Schutzgruppenchemie nötig macht. Diese Tatsache begünstigt die Nutzung von substrat- und stereospezifischen Enzymen. Im Prinzip, erlauben Enzymkaskaden basierend auf verfügbaren Isomerasen und Epimerasen eine einfache und generische Synthese der meisten seltenen Monosaccharide aus einer Reihe von preiswerten Zuckern wie zum Beispiel D-Glucose, D-Galactose, L-Sorbose und D-Fructose. Isomerisierungs- und Epimerisierungsreaktionen weisen jedoch typischerweise eine ungünstige Position ihres thermodynamischen Gleichgewichts auf. Diese führt oftmals zu schwerwiegenden Ausbeutelimitationen zwischen 20 und 70% und steht so einer industriellen Nutzung solcher Enzymekaskaden im Wege. Das Gleichgewichtsproblem kann aber durch Integration der biokatalytischen Umwandlung mit einem Separationsschritt überwunden werden. In dieser Arbeit haben wir eine neue Prozessstrategie, bestehend aus enzymatischer Umsetzung in einem Enzym-Membranreaktor (EMR), Trennung des Substrats und Produkts mittels Simulated Moving Bed (SMB) Chromatographie und Konzentration des Recyclingstroms mittels einer Nanofiltrationsanlage (NF) erforscht um so die Ausbeuten in der Produktion von seltenen Zuckern zu erhöhen. Theoretisch erlaubt eine solche Prozessstrategie eine Ausbeute von 100% während kontinuierlichem Betrieb.

Ausgehend von den vorher erwähnten Zuckern können die meisten der möglichen seltenen Hexosezucker produziert werden, in dem maximal drei verfügbare Iso- und Epimerasen kombiniert werden. Damit bietet diese Strategie grundsätzlich eine generische Möglichkeit seltene Zucker industriell herzustellen. In dieser Arbeit wurde der seltene Zucker D-Psicose als Zielsubstanz gewählt. D-Psicose kann mittels des Enzymes D-Tagatose Epimerase in einem einzelnen enzymatischen Umwandlungsschritt an der C3 Position aus D-Fructose oder in einer dreistufigen Reaktionskaskade von Saccharose, über einen Hydrolyse- Schritt zu D-Fructose und D-Glucose, Isomerisierung von D-Glucose und D-Fructose und einem abschliessenden Epimerisierungsschritt von D-Fructose nach D-Psicose hergestellt werden.

Zunächst wurde eine experimentelle Implementierung des einstufigen Enzymprozesses realisiert um die grundsätzliche Eignung des integrierten Prozesskonzepts zu zeigen, die D-Psicose Ausbeuten zu erhöhen. Tatsächlich, erlaubte es die Implementierung des integrierten Prozess die Ausbeute an Produkt von 25% (möglich im Batch Betrieb) auf 97% zu erhöhen und stellte gleichzeitig die erste experimentelle Realisierung des vorgeschlagenen Integrationskonzept dar. Ausserdem wurden eine Reihe wichtige

praktische Aspekte analysiert so wie die Stabilität und Robustheit des Prozesses und ein beschleunigtes Anfahrprozedere für unsere Anlage ermittelt.

Eine rationale Auslegung des integrierten Prozesses macht eine detaillierte Charakterisierung der involvierten Prozesseinheiten notwendig. Ein besonderer Fokus dieser Arbeit lag deshalb auf der Auslegung und der Optimierung der Trennung von D-Fructose und D-Psicose mittels SMB unter der Verwendung von Ca^{2+}-substituierten Ionenaustauchmaterial. Basierend auf der Inversen Methode wurden dazu die chromatographischen Parameter geschätzt, die eine akkurate Parametrisierung des Adsorptions- und kinetischen Verhalten über einen weiten Temperaturbereich (20 bis 70°C) erlaubt. Für die Beschreibung der Performance der SMB wurde ein True Moving Bed (TMB) Modell etabliert, das dann auch für eine Mehrkriterien-Optimierung der SMB Trennung auf Basis eines Pareto Ansatzes verwendet wurde. Die Optimierung zeigte, dass die SMB optimaler Weise bei hohen Temperaturen betrieben wird (70°C), was darauf hindeutet, dass die geringere Selektivität der stationären Phase bei höheren Temperaturen vollständig durch den erhöhten Masstransfer (der wiederum höhere Produktivität ermöglicht) kompensiert werden kann.

Als nächstes wurde eine umfassende Design- und kostenbasierte Optimierungsstrategie basierend auf einem integrierten Prozessmodel etabliert. Eine wichtige Zielsetzung bei der Modellentwicklung stellte die Eingliederung der Temperaturabhängigkeit der Enzymkinetik und -stabilität bei erhöhter Temperatur dar. Deshalb wurde eine Methode zur modell-basierter Parameterschätzung etabliert, die es uns ermöglichte thermodynamische und kinetische Parameter des Enzymes als Funktion der EMR Betriebstemperatur abzuschätzen. Das ermöglichte uns zum einen die EMR Betriebstemperatur im Zuge der Prozessoptimierung als Designgrösse zu untersuchen und zum anderen eine enzym-effiziente Methode zu entwickeln die es uns erlaubte den EMR bei konstanter Konversion zu betreiben, eine Grundvoraussetzung für den stabilen Betrieb des integrierten Prozesses und eine grosse Herausforderung aufgrund der inhärenten Instabilität des Biokatalysator unter erhöhter Temperatur.

Abschliessend wurde das integrierte Prozesskonzept auf ein Multi-Enzymsystem angewandt. Dafür mussten zwei weitere Enzyme (Invertase, D-Xylose Isomerase) verwendet und charakterisiert und die SMB Trennung auf ein 3-Komponenten Gemisch erweitert werden. Der erfolgreiche experimentelle Betrieb des komplexen, integrierten Prozesses mit mehreren Enzymen stellt die erste Implementierung einer Reaktionskaskade dar, die mit einer Trennung integriert wurde und so eine stabile Produktion von D-Psicose in hoher Reinheit (99%) und hoher Ausbeute (96%) ermöglichte.