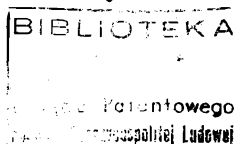




A51k 24/10



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 48039

Kl. 30 h, 2/30
Kl. internat. A 61 k

VEB Serum – Werk Bernburg

Bernburg, Niemiecka Republika Demokratyczna

Sposób wytwarzania fruktozy zwłaszcza do celów infuzyjnych

Patent trwa od dnia 6 grudnia 1961 r.

Pierwszeństwo: 1 marca 1961 r. (Niemiecka Republika Demokratyczna).

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania fruktozy o stopniu czystości wymaganym zwłaszcza przy przygotowywaniu z niej roztworów infuzyjnych.

Terapeutyczne stosowanie samej fruktozy jak i w roztworze jest ogólnie znane.

Pożądane jest przy wszystkich postaciach stosowania aby preparat był wolny od glukozy. Podczas gdy w roztworach fruktozy stosowanych doustnie, domieszki, a także małe ilości glukozy zasadniczo nie przeszkadzają, to roztwory fruktozy do celów infuzyjnych wymagają preparatów o najwyższej czystości.

Znane jest otrzymywanie fruktozy albo z sacharozy, albo z roślinnego polifruktozanu, na przykład inuliny. Otrzymywanie fruktozy z sacharozy przez hydrolityczny rozpad połączonej z selektywnym strącaniem fruktozy daje w rezultacie preparat wolny od wszelkich nieorganicznych i organicznych niecukrów, który

zawiera jednak zawsze do 10% glukozy. Roztwór całkowicie wolny od glukozy można otrzymać z sacharozy na drodze technicznej tylko z dużym nakładem kosztów. Od niedawna znane są sposoby, w których przez mikrobiologiczne oddziaływanie na zawierający sacharozę roztwór pożywki można albo udział glukozy wykorzystać selektywnie, albo glukozę w taki sposób spolimeryzować (dekstran), że łatwo ją oddzielić od pozostałej fruktozy. W obydwóch sposobach oprócz reakcji głównej mają miejsce jeszcze inne jak na przykład synteza oligosacharydów i niskocząsteczkowych polisacharydów. Substancje te trudno oddzielają się od fruktozy. Także tylko przy stosowaniu kosztownych procesów oczyszczania można uwolnić fruktozę od innych składników roztworu kultury, zwłaszcza od białka. Proces oczyszczania można było pominąć przez zastosowanie do oddziaływania czystego roztworu enzymatycznego. Z doświadczeń wy-

nika jednakże, że wytwarzanie czystych roztworów enzymatycznych jest kosztowne.

Według wynalazku unika się niedogodności opisanych powyżej sposobów przez stosowanie do hydrolizy lewanów otrzymanych mikrobiologicznie, które dzięki ich rozpuszczalności w wodzie i nierozpuszczalności w niższych alkoholach i ketonach można łatwo uwolnić od wszystkich towarzyszących cukrów i innych organicznych substancji, zwłaszcza białka, przez wytrącanie niskocząsteczkowymi alkoholami lub ketonami, jak metanol, etanol, propanol i aceton tak, że całkowicie oczyszczony polifruktozan można poddawać hydrolizie. Lewany, jak wiadomo, wytwarzane są z sacharozy przez szereg mikroorganizmów takich jak: *Pseudomonas spec.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* i *Aerobacter levanicus*.

Sposób według wynalazku umożliwia uzyskanie stosunkowo wysokiej wydajności objętościowej lewanu, podczas gdy średnie wydajności lewanu uzyskane ze zwykłej kultury przeznaczonej do syntezy, zawierającej około 10% sacharozy, wynoszą w warunkach technicznych 50% teorii, co odpowiada około 2,5% (ciężar/objętość) wydajności objętościowej. Aby uzyskać wydajność objętościową większą niż 5%, jaka niezbędna jest do przeróbki, należy podnieść stężenie cukru powyżej 30%. Stwarza to jednak szkodliwe warunki fizjologiczne dla wzrostu mikroorganizmów, gdyż około 20% zarodników ginie wskutek za silnie zahamowanego wzrostu, przy czym czas fermentacji wzrasta z pięciu do około dziesięciu dni.

Jak wiadomo z literatury zwiększenie wydajności lewanu uzyskuje się przez dodawanie do kultury przeznaczonej do syntezy małych ilości lewanu dla zapoczątkowania fermentacji. Dodatek tak zwanego startera — lewanu podwyższa wydajność uwarunkowaną wysokim stężeniem cukru (powyżej 30%), jednakże czas trwania syntezy wynosi wówczas 10 dni.

Z załączonego wykresu wynika, że maximum tworzenia się lewanu z czasem znacznie odbiega od maximum rozmnażania się bakterii. Maximum tworzenia się lewanu obserwuje się po zakończeniu nasilenia okresu wzrostowego mikroorganizmów. Wynalazek więc polega na prowadzeniu procesu dwustopniowego w ten sposób, że w 1-szym stopniu prowadzi się rozmnażanie mikroorganizmów przy jednoczesnym tworzeniu się w optymalnych warunkach star-

tera — lewanu, podczas gdy w 2-gim stopniu — następuje właściwa synteza przy zwiększonej ilości cukru, bez widocznej już szkody dla wzrostu bakterii. Przez prowadzenie dwustopniowego procesu można zatem uzyskać w 1-szym stopniu — masę bakteryjną, znaczną część fermentu i starter — lewan, podczas gdy w 2-gim stopniu przez dodanie odpowiedniej ilości sacharozy podnosi się wydajność objętościową lewanu tak dalece, że wynosi ona więcej niż 5%. Według wynalazku oba stopnie procesu można prowadzić nie tylko w sposób okresowy ale także i ciągle.

Roztwór lewanu uzyskany w dwustopniowym procesie jest wskutek wysokiej wydajności objętościowej bardzo lepki, jego wartość pH = 4 4,5, a ilość niezużytej sacharozy wynosi poniżej 5%. Przeróbka lewanu może odbywać się bezpośrednio w fermentorze albo w dostatecznie dużym zbiorniku tak zwanym zbiorniku do strącania. W celu wprowadzenia roztworu lewanu do kotła do strącania należy zmniejszyć lepkość roztworu kultury lewanu. Dokonuje się tego przez rozcieńczenie taką ilością alkoholu na przykład metanolu, aby lewan jeszcze się nie wytrącił. W kotle do wytrącania przez dalszy dodatek alkoholu wytrąca się lewan z roztworu kultury i oddziela. Aby lewan całkowicie wytrącił z roztworu jego kultury, potrzeba przy stosowaniu metanolu dwu- do czterokrotnej ilości w odniesieniu do ilości roztworu kultury. Niepożądane substancje towarzyszące produktowi wytrącenia, a mianowicie glukoza, sole i białka usuwa się przez ponowne wytrącanie strąconego surowego produktu za pomocą niższych alkoholi i ketonów. Po jednorazowym strąceniu produkt wolny już jest od węglowodanów, po dwukrotnym strącaniu otrzymuje się czysty lewan, odpowiedni do przygotowywania roztworów infuzyjnych.

Z procesem strącania można połączyć przesączenie przez warstwy filtracyjne i (lub) obróbkę za pomocą substancji adsorbujących, jak ziemia krzemkowa lub węgiel aktywowany. Dzięki temu stopień oczyszczenia tylko nieznacznie się polepsza. Poza tym powstają straty w lewanie, który przylega i pozostaje na substancjach adsorbujących względnie na warstwach filtracyjnych. Z lewanu oczyszczonego przez strącanie przygotowuje się 5%-owy wodny roztwór. Roztwór ten ogrzewa się i zadaje kwasem, na przykład kwasem solnym lub substan-

cjami dającymi jony wodorowe, na przykład kwaśnymi solami lub wymiennicami kationowymi i hydrolizuje. Temperatura hydrolizy, jak również stężenie jonów wodorowych mogą zmieniać się w szerokich granicach, jednak w przypadku otrzymywania roztworów fruktozy do celów infuzyjnych, optymalne warunki są przy wartości pH większej od 2, temperaturze poniżej 90°C i czasie trwania hydrolizy poniżej 5 minut w celu uniknięcia zbrunatnienia, jak również przegrupowania w uboższe w wodę związki fruktozy (dwubezwodnik dwufruktozy). W przypadku zastosowania wymiennicza kationowego można prowadzić hydrolizę w sposób ciągły zarówno w kotle, jak również w kolumnie. Wartość pH, temperatura i czas trwania hydrolizy mogą się zmieniać w zależności od ciężaru cząsteczkowego lewanu, jego czystości oraz stopnia zhydrolizowania tak, że uzyskuje się niskocząsteczkowe lewany lub oligosacharydyny szeregu lewanu.

Przy otrzymywaniu fruktozy do celów infuzyjnych konieczne jest usunięcie pozostałych soli i substancji białkowych. W celu usunięcia białka można stosować znane metody jak wytrącanie i przesączanie. W przypadku lewanu zhydrolizowanego do fruktozy, substancje białkowe koagulują się w trakcie oziębiania się roztworu po przeprowadzeniu hydrolizy i następnie łatwo można je usunąć przez odsączenie. Usunięcie soli następuje za pomocą wymiennicza jonowego.

W celu wytworzenia roztworów infuzyjnych o odpowiednim stężeniu fruktozy po ich oczyszczeniu stosuje się zagęszczenie w próżni.

Sposób według wynalazku pozwala dzięki uzyskaniu wysokiej wydajności objętościowej jak również wskutek możliwości prostego i skutecznego oczyszczania na otrzymywanie preparatów fruktozy, które odpowiadają wysokim wymaganiom, jeśli chodzi o stopień czystości. Już wskutek jednorazowego strącenia lewanu połącznego z hydrolizą otrzymuje się krystaliczną fruktozę. Po dwóch strąceniach fruktoza jest tak czysta, że oprócz stosowania jej do celów infuzyjnych nadaje się ona do wszelkich możliwych zastosowań terapeutycznych. Obecności innych cukrów niż fruktoza nie można stwierdzić nawet metodą chromatograficzną. Procesy oczyszczania, które mają miejsce po strąceniu, mają jedynie na celu uzyskanie

norm jakości roztworów infuzyjnych pod względem zawartości soli i białka. (N 1 mg/100 ml).

Przykład I. Służem z 5-cio dniowej hodowli szczepu (*Pseudomonas* sp.) zaszczepla się 100 ml roztworu przeznaczonego do dalszego szczepienia o następującym składzie:

4% sacharozy
1,5% peptonu
0,5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
0,5% NaCl
 $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$

Po 24 godzinach wstrząsania roztworu w temperaturze 20 – 23°C, roztwór kultur do szczepienia dodaje się do 1 litra roztworu przeznaczonego do syntezy o następującym składzie:

120 g sacharozy
5 g peptonu
1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
5 g NaCl
1 litr wody z sieci wodociągowej
 $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$

Tę kulturę fermentacyjną napowietrza się lekko tak długo (200 cm³ powietrza/minutę) aż jej pH osiągnie wartość 6. Następnie fermentację prowadzi się dalej bez napowietrzania. Po osiągnięciu wartości pH = 4,5 fermentacja jest zakończona, zwykle po około 50 godzinach.

Wydajność: 25,5 g lewanu.

Roztwór miesza się z 4 litrami metanolu i strącony lewan po osadzeniu uwalnia od pozostałego roztworu przez dekantację. Osad rozpuszcza się w trakcie mieszania w 0,5 litra wody destylowanej i ponownie miesza z 2 litrami metanolu. Po osadzeniu się lewanu, roztwór dekantuje się. Lewan, obecnie całkowicie oczyszczony z cukrów rozpuszcza się w 0,5 litra wody destylowanej i ogrzewa do temperatury 85°C. Następnie dodaje się kroplami 6 n kwas solny w ciągu 30 sekund do uzyskania wartości pH = 2, po czym w ciągu 2 minut utrzymuje się temperaturę 85°C, a następnie roztwór oziębia przez umieszczenie naczynia reakcyjnego w wodzie lodowatej. Po osiągnięciu temperatury 25°C roztwór doprowadza się do wartości pH = 5 za pomocą 1 n NaOH. W celu skoagulowania białka roztwór utrzymuje się w ciągu 8 godzin w temperaturze + 4°C, po czym przesącza przez warstwy filtracyjne (EKS II). W celu usunięcia soli, roztwór przeprowadza się kolejno przez wymiennicz kationowy (KPS 200) i wymiennicz anionowy (L 150), po czym za-

gęszcza w próżni w temperaturze do 40°C do zawartości 20% fruktozy.

Wydajność: 108 ml 20%-owego roztworu fruktozy.

Przykład II. Roztworem kultur do szczepienia otrzymanym w sposób podany w przykładzie I zaszczepia się 3,5 litra roztworu przeznaczonego do syntezy o następującym składzie:

210 g sacharozy

17,5 g peptonu

7,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

10,5 g NaCl

3,5 l wody z sieci wodociągowej

pH = $7,0 \pm 0,2$

I stopień procesu.

Kulturę fermentacyjną napowietrza się umiarkowanie do uzyskania wartości pH = 4,7 (0,3 objętości powietrza/objętość roztworu kultury/minutę) w ciągu około 40 godzin. Następnie kulturę fermentacyjną przeprowadza się w warunkach sterylnych do drugiego naczynia reakcyjnego.

II stopień procesu.

Roztwór przeznaczony do syntezy ma w drugim naczyniu reakcyjnym następujący skład:

875 g sacharozy

1,75 l wody z sieci wodociągowej

Po połączeniu roztworu z produktem z pierwszego naczynia wartość pH wynosi 5,1. Po obniżeniu się wartości pH do 4,1 podczas syntezy lewanu proces jest zakończony, co na ogół następuje po 40 godzinach.

Wydajność: 293 g lewanu.

Wydajność objętościowa: 5,6% (ciężar/objętość).

Tak otrzymany roztwór miesza się z 20 litrami metanolu w celu wytrącania lewanu, po czym dekantuje, a pozostały lewan rozpuszcza w 5 litrach destylowanej wody i ogrzewa do temperatury 50°C dodając 30 ml 1 n HCl. Po 20 minutach roztwór ciężbia się i przez dodanie ługu sodowego (0,1 n) doprowadza jego wartość pH do $5 \pm 0,5$. Roztwór odstawia się na noc w temperaturze $+8^\circ\text{C}$ i przez odsączenie uwalnia od wytrąconego osadu, po czym zagęszcza się w próżni do zawartości 70% fruktozy i po zaszczepieniu kilkoma kryształkami fruktozy odstawia do wykryszalowania. Ług macierzysty usuwa się przez odwirowanie.

Wydajność: 120 g krystalicznej fruktozy,

135 g fruktozy w ługu macierzystym.

Przykład III. Skład roztworu przeznaczonego do szczepienia i roztworów przeznaczonych do syntezy odpowiada podanym w przykładzie I, tylko stężenie sacharozy roztworu przeznaczonego do syntezy w I-szym stopniu procesu wynosi 15%, zaś w II-gim stopniu wynosi 60%. Przebieg fermentacji odbywa się w podobny sposób, jak w przykładzie II. Po osiągnięciu wartości pH 4,0 w II-gim stopniu procesu synteza jest zakończona, co następuje po łącznym czasie syntezy około 100 godzin.

Wydajność: 400 g lewanu.

Wydajność objętościowa: 7,6% (ciężar/objętość).

Roztwór zadaje się w trakcie mieszania 25 litrami etanolu i po wytrąceniu lewanu, dekantuje. Lewan rozpuszcza się w 5 litrach wody i dodaje 2,5 litra etanolu. Otrzymany lekko lepki roztwór ogrzewa się do temperatury 40°C i przepuszcza przez 1 metrową kolumnę silnego wymiennicza kationowego (KPS 200), zawierającego jony wodorowe. Temperaturę kolumny utrzymuje się przy 40°C, a czas przebywania roztworu w kolumnie wynosi 30 minut, po czym roztwór doprowadza się do wartości pH = 5 i uwalnia w próżni od etanolu.

Wydajność: 3 litry roztworu fruktozy (12%-owy).

Przykład IV. Wytwarzanie roztworu kultur do szczepienia prowadzi się sposobem podanym w przykładzie I z tą różnicą, że 100 ml roztworu kultur do szczepienia wprowadza się do 900 ml roztworu pożywki o takim samym składzie. Po 24-godzinny wstrząsaniu zaszczepia się tym roztworem 9 litrów roztworu przeznaczonego do syntezy (I stopień procesu) o następującym składzie:

1500 g sacharozy

10 g peptonu

10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

30 g NaCl

9 l wody z sieci wodociągowej

pH = $7,0 \pm 0,2$

I stopień procesu.

Po obniżeniu się wartości pH roztworu kultury fermentacyjnej do 5,5 wprowadza się roztwór przeznaczony do syntezy (I stopień procesu) w sposób ciągły w ilości 220 ml na godzinę z wyjąłowanego zasobnika napełnionego 40 litrami tego roztworu.

Taka sama ilość przepływa przez odpowiednio nastawioną rurę przelewową z tego zbiornika fermentacyjnego do drugiego zbiornika fermentacyjnego.

II stopień procesu.

Do drugiego zbiornika fermentacyjnego wprowadza się w sposób ciągły oprócz stałego dopływu ze zbiornika I, 50%-owy roztwór sacharozy ze zbiornika zapasowego w stosunku 1 część objętościowa roztworu sacharozy na 2 części objętościowe odcieku z pierwszego zbiornika.

Rura przelewowa w drugim zbiorniku fermentacyjnym jest tak umieszczona, że w zbiorniku tym znajduje się stale 23 litry roztworu fermentacyjnego. W ten sposób czas przebywania roztworu w zbiorniku fermentacyjnym wynosi 70 godzin. Wartość pH roztworu wpływającego z pierwszego zbiornika fermentacyjnego wynosi 4,5, a wartość pH roztworu wpływającego z drugiego zbiornika fermentacyjnego wynosi 4,0. Pierwszy zbiornik napowietrza się tak, że zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie wynosi 2–3 mg O₂ na litr. Drugiego zbiornika fermentacyjnego nie napowietrza się. Temperaturę w obu zbiornikach utrzymuje się na poziomie $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Wszystkie zabiegi robocze odbywają się w warunkach sterylnych. Po 180 godzinach przerywa się fermentację. Po upływie tego czasu z drugiego zbiornika fermentacyjnego odciekło łącznie 37 litrów. W pierwszym zbiorniku fermentacyjnym pozostaje 10 litrów roztworu fermentacyjnego, a w drugim — 23 litry. Te 23 litry spuszcza się. Roztwór kultury lewanu pochodzący z drugiego zbiornika fermentacyjnego (łącznie 37 litrów) wprowadza się w sposób ciągły z 200 litrami metanolu w trakcie mieszania do kotła do strącania. Następnie wprowadza się tam także z drugiego zbiornika pozostałość po zakońzonej fermentacji. Według tego przykładu adza się do dalszej przeróbki łącznie 0 litrów roztworu lewanu. Po zakończonym ącaniu roztwór nad wytrąconym lewanem iąga się. Wydajność: 3,8 kg lewanu.

Dalszy przebieg procesu jest analogiczny jak przykładzie I. Wydajność czystej glukozy: 158 kg.

Jeżeli zamiast szczepu *Pseudomonas* sp. stosować do syntezy lewanu inne szczepy wytwarzające lewan jak *Bacillus subtilis*, *Bacillus myxa*, *Aerobacter levanicus*, *Pseudomonas uorescens* i *Pseudomonas areofaciens*, to wa-

runki prowadzenia procesu według wynalazku będą miały zasadniczo taki sam wpływ na ich aktywność. Optimum pH, napowietrzanie, czas przebywania roztworu fermentacyjnego w zbiornikach fermentacyjnych, maksymalne stężenie sacharozy i stosunek objętościowy roztworów w obu stopniach procesu muszą być dostosowane do specyficznego zachowania się i zdolności produkcyjnych szczepów.

Czas przebywania roztworów w zbiornikach fermentacyjnych można na przykład łatwo obliczyć z doświadczalnie otrzymanej krzywej wydajności i wznostu (patrz wykres). Według wynalazku można także użyć do dalszej przeróbki roztworu lewanu z pierwszego zbiornika fermentacyjnego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania fruktozy, zwłaszcza do celów infuzyjnych, znamienny tym, że stosuje się lewan otrzymany na drodze mikrobiologicznej w sposób periodyczny lub ciągły, który oczyszcza się przez wytrącanie za pomocą hydrofilowych organicznych rozpuszczalników, a następnie hydrolizuje za pomocą substancji wydzielających jony wodorowe przy wartości pH poniżej 1–6, korzystnie przy pH powyżej 2 i w temperaturze 45–110°C, korzystnie poniżej 90°C i otrzymany roztwór fruktozy przerabia dalej w znany sposób.
2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że syntezę lewanu prowadzi się w procesie dwustopniowym, przy czym w pierwszym stopniu procesu zaszczenia się roztwór kultury, zawierający 1–20%, korzystnie 5–15% sacharozy i prowadzi fermentację przy napowietrzaniu aż do uzyskania optymalnych warunków tworzenia się lewanu, w drugim zaś stopniu procesu fermentację prowadzi się nadal przy dodatku sacharozy do uzyskania całkowitego jej stężenia 20–50%, korzystnie 25–30%.

V E B Serum — Werk Bernburg

Zastępca: inż. Józef Felkner
rzecznik patentowy

