



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209255
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/02

(22) Přihlášeno 12 09 68
(21) (PV 6395-68)

(40) Zveřejněno

(45) Vydáno 01 05 83

(75)

Autor vynálezu

KULHÁNEK MILOŠ ing., CSc. a TADRA MILAN ing. C., PRAHA

(54) Způsob výroby D-fruktosy

Vynález se týká způsobu výroby D-fruktosy, cukru, jehož význam v novější době značně stoupá. V čisté formě se používá v lékařství při léčbě různých chorobných stavů.

Ačkoliv je D-fruktosa velmi rozšířena v přírodě, je její průmyslová výroba značně obtížná. Tento cukr krystaluje totiž dobře pouze z roztoků nebo sirupů prostých organických i anorganických nečistot. Většina metod využívá při izolaci tvorby málo rozpustného fruktosátu (levulátu) vápenatého, v němž je jeden mol fruktosy vázán na jeden mol kysličníku vápenatého. Je možno ji získat též kyselou hydrolýzou inulinu, zásobního polysacharidu čekanky, topinamburu, jiřin, pampelišek apod., sestávajícího převážně z fruktosy (vedle asi 5 % glukosy). Nejpřístupnější zdroj fruktosy pro výrobu ve velkém je invertní cukr. Od glukosy se fruktosa odděluje srážením ve formě fruktosátu vápenatého. Tato metoda je však pracná, izolovaná fruktosa je v důsledku působení alkalického prostředí znečištěna produkty isomerizace a musí být čištěna rekrystalizací. Nejvýhodnější surovinou pro přípravu krystalické fruktosy je matečný louh po izolaci glukosy z invertního cukru krystalizací, tzv. fruktosový sirup, který obsahuje v sušině kolem 42 % glukosy a 58 % fruktosy a který byl použit k výrobě D-fruktosy způsobem podle tohoto vynálezu.

Podstata způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se ve fruktosovém sirupu, zředěném vodou na obsah sušiny 10 až 25 %, obsažená D-glukosa oxiduje za aerobních podmínek působením glukosooxidázy na kyselinu D-glukonovou, která se od přítomné D-fruktosy oddělí ve formě soli s kovem alkalických zemin, s výhodou soli vápenaté, a ze zbyvajících roztoku se po deionizaci izoluje krystalizací D-fruktosa.

Oxidace D-glukosy na kyselinu D-glukonovou se provádí účelně glukosooxidázou, obsaženou v enzymovém systému mikroorganismů, zejména plísni nebo bakterií, např. ze skupiny černých aspergilů nebo octových bakterií, popř. za přítomnosti inhibitoru enzymů, blokujícího disimilaci přítomné D-fruktosy, s výhodou azidu sodného, v koncentraci řádové 10^{-4} M.

Oxidaci D-glukosy v kyselinu D-glukonovou při plném zachování přítomné D-fruktosy je možno realizovat též specificky působící izolovanou glukosooxidázou, např. obchodním glukosooxidázovým preparátem. Postup podle vynálezu, využívající glukosooxidázy přítomné v enzymovém systému buněk vhodného mikroorganismu, aktivně oxidující glukosu v glukonovou kyselinu bez disimilace fruktosy ve větším rozsahu, se ukázal být výhodnější. Ze skupiny plísni je vhodný např. *Aspergillus niger*. Jako produkt oxidace se izoluje

kyselina glukonová, nejlépe ve formě vápenaté soli, která má po rekrystalizaci lékopisnou kvalitu. Narostlé mycelium plísň je možno použít pro oxidaci v další násadě. Při použití octových bakterií, např. *Acetobacter acetosum*, může být primárně vzniklá kyselina glukonová dále dehydrogenována v kyselinu 2-keto-, popř. i v 2,5-diketoglukonovou.

Mikrobiální oxidace se provádí v živném prostředí, které může obsahovat až 25 % sušiny fruktosového sirupu, za aseptických podmínek, za míchání a vzdušnění. Vznikající kyselina glukonová se neutralizuje přísadou nejméně ekvivalentního množství nerozpustného kovu alkalických zemin do živného prostředí, výhodně uhličitanu vápenatého, popř. postupným přidáváním roztoku nerozpustného uhličitanu nebo hydroxidu v takovém množství, aby pH prostředí bylo trvale udržováno ve slabě kyselé oblasti.

Aby byla snížena disimilace fruktosy v živném prostředí, k níž dochází zejména po dokončení oxidace glukosy, je účelné přidávat vhodný inhibitor enzymů, který blokuje disimilaci při použité koncentraci fruktosy, avšak neovlivňuje oxidaci glukosy. Vzhledem k tomu, že oxidace glukosy v kyselinu glukonovou probíhá bez fosforylace, zatímco disimilace fruktosy zpravidla probíhá přes fosforylované meziprodukty, jsou k tomuto účelu vhodné inhibitory blokující fosforylaci, jako např. již zmíněný azid sodný.

Některé možnosti realizace způsobu podle vynálezu jsou uvedeny v následujících příkladech provedení.

Příklad 1.

254 g fruktosového sirupu, obsahujícího 117 g D-fruktosy a 83 g D-glukosy, se smíchá s 1 g kukuřičného extraktu a 8 mg azidu sodného a doplní vodou na 1 litr. Po sterilizaci se asepticky přidá 30 g sterilního uhličitanu vápenatého. Půda se zaočkuje spory plísň *Aspergillus niger*, spláchnutými s kultury inkubované 4 dny na šikmém

sladinovém agaru při 30 °C a inkubuje se ve varné baňce obsahu 6 litrů na reciproké třepače při 30 °C. Po 3 dnech poklesne celkový obsah redukujících cukrů, počítáno jako fruktosa, na 116 g a chromatografickou analýzou lze v katexovaném vzorku roztoku zjistit fruktosu a kyselinu glukonovou. Roztok se zfiltruje a odpaří při nízké teplotě na řídký sirup. Přísadou malého množství methanolu vykřystaluje glukonan vápenatý, jehož výtěžek po izolaci a vysušení je 101 g. Filtrát se po odpaření methanolu ve vakuu a po zředění vodou deionizuje na katexu a pak na anexu až do dosažení pH 3,5, odbarví a odpaří na hustý sirup. Po rozmíchání s ethanolem a krystalizací v chladnici se izoluje 75 g fruktosy vyhovující kvality. Z matečného louhu lze obdobným způsobem získat ještě 22 g fruktosy. Druhý matečný louh váží po zahuštění 32 g, obsahuje chromatograficky čistou fruktosu, ale již nekřystaluje.

Příklad 2.

Mikroorganismus *Acetobacter acetosum* CCM 2363 se nejprve dvakrát pasáže v dvoudenních intervalech na šikmých agarech složení: 5 % glukosy, 12,5 % 20%ního kvasničného autolýzátu, 2 % uhličitanu vápenatého a 2,5 % agaru a této kultury se použije k zaočkování 100 ml půdy, obsahující 5 % glukosy, 0,5 % kukuřičného extraktu a 1,4 % uhličitanu vápenatého, sterilizovaného zvlášť. Po dvoudenní inkubaci na reciproké třepače při 30 °C se získanou kulturou zaočkuje jeden litr půdy obsahující 202 g fruktosového sirupu, 7,5 g kukuřičného extraktu a 16,5 g uhličitanu vápenatého, sterilizovaného zvlášť. Po dvoudenní inkubaci na třepače při 30 °C nebyla již v roztoku přítomna glukosa. Vyfermentovaná půda, obsahující fruktosu, glukonan vápenatý a malé množství 2-ketoglukonanu vápenatého, se zpracuje stejně jako v příkladu 1. Izoluje se celkem 86 g vápenatých solí a ve dvou frakcích celkem 59 g fruktosy. Druhý matečný louh váží po zahuštění 35 g, obsahuje fruktosu a již nekřystaluje.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby D-fruktosy z tzv. fruktosového sirupu, obsahujícího v sušině kolem 58 % fruktosy a 42 % glukosy, odpadajícího po izolaci krystalické D-glukosy z invertního cukru, vyznačující se tím, že se ve fruktosovém sirupu, zředěném vodou na obsah sušiny 10–25 %, obsažená D-glukosa oxiduje za aerobních podmínek působením glukosooxidázy na kyselinu D-glukonovou, která se od přítomné D-fruktosy oddělí ve formě soli s kovem alkalických zemin, s výhodou soli vápenaté, a ze zbývajících roztoku se po deionizaci izoluje krystalizací D-fruktosa.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se oxidace D-glukosy na kyselinu D-glukonovou provádí glukosooxidázou, obsaženou v enzymovém systému mikroorganismů, zejména plísni nebo bakterií, například ze skupiny černých aspergillů nebo octových bakterií.

3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se oxidace provádí za přítomnosti inhibitoru enzymů, blokujícího disimilaci přítomné D-fruktosy, s výhodou azidu sodného, v koncentraci řádově 10^{-4} M.