

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 144 926

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 85 02 12 /P. 251912/

Pierwszeństwo: 84 02 13 Republika
Federalna
Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 85 11 19

Opis patentowy opublikowano: 89 08 31

CIŚCIELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.⁴ C12P 19/24
C12N 11/14

Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: Kali-Chemie Aktiengesellschaft,
Hannover /Republika Federalna Niemiec/

SPOSÓB WYTWARZANIA IZOGLIKOZY

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania roztworu zawierającego glikozę i fruktozę przez poddanie reakcji roztworu zawierającego glikozę na wytworzonym na bazie nośnika SiO_2 katalizatorze z aktywnością glikozoizomerazy. Tego rodzaju sposób jest znany z opisu patentowego RFN DAS nr 3 148 603. Według tej pozycji literatury można znacznie zwiększyć produktywność znanych, wytworzonych na bazie nośnika SiO_2 katalizatorów na nośniku z aktywnością glikozoizomerazy, jeśli roztwór zawierający glikozę przed reakcją na katalizatorze na nośniku doprowadza się do zetknięcia z półproduktami z SiO_2 albo krzemianu glinu.

Zadaniem wynalazku jest dostarczenie innych możliwości zwiększenia produktywności znanych katalizatorów na nośniku SiO_2 z aktywnością glikozoizomerazy. Przez "wytworzone na bazie nośnika SiO_2 katalizatory z aktywnością glikozoizomerazy" lub "znane katalizatory na nośniku SiO_2 z aktywnością glikozoizomerazy" należy rozumieć takie katalizatory, w których w nośniku albo na nośniku na bazie SiO_2 , np. porowatym żelu krzemionkowym, jest wkomponowane glikozoizomeraza /np. przez koprecypitację/ albo naniesiona /np. przez adsorpcyjne albo kowalencyjne wiązanie albo usieciowanie enzymu/. Korzystnie należy tutaj rozumieć takie katalizatory, w których glikozoizomeraza jest związana z porowatym żelem krzemionkowym adsorpcyjnie albo kowalencyjnie albo jest naniesiona przez usieciowanie, przy czym można ewentualnie stosować również kombinacje tego rodzaju sposobów wiązania. W tym sensie korzystne katalizatory są znane np. z opisu patentowego RFN DAS nr 2 726 188.

Inna w sence postawienia zadania możliwość zwiększenia produktywności polega teraz według wynalazku na tym, że do roztworu zawierającego glikozę dodaje się SiO_2 . SiO_2 można przy tym dodawać w dowolnej postaci, jeśli tylko jest on wystarczająco rozpuszczalny w wodzie i ewentualnie wprowadzone razem z SiO_2 do roztworu glikozy obce jony nie zmniejszają aktywności enzymu. Jeśli otrzymany roztwór glikozy-fruktozy przed dalszym zastosowaniem go nie zostanie szczególnie oczyszczony, np. przez wymianę jonową, należy również uważać na to aby ewentualnie wprowadzone z SiO_2 obce jony nie pogorszyły późniejszego zastosowania roztworu glikozy i fruktozy. Szczególnie przydatne są krzemiany metalu alkalicznego. Dodawana ilość SiO_2 nie jest ściśle określona. W celu osiągnięcia zwiększenia produk-

tywności w rozmiarze odpowiadających sposobów według opisu patentowego RFN DAS nr 3 148 603 dodana ilość nie powinna być mniejsza niż 30 ppm. Korzystnie dodaje się do roztworu glikozy 30-80 ppm SiO_2 . Szczególnie łatwo i niedrogo przeprowadza się dodawanie SiO_2 wtenczas gdy stosuje się roztwór szkła wodnego, korzystnie roztwór szkła wodnego sodowego.

Pod względem zwiększenia produktywności uzyskuje się w sposobie według wynalazku wartości, jakie osiąga się również za pomocą sposobu według opisu patentowego RFN DAS nr 3 148 603. Nieoczekiwanie jednak dodanie SiO_2 zamiast wstępnego kontaktowania z półproduktami z SiO_2 albo krzemianu glinu ma korzystny wpływ na trwałość katalizatora w przypadku przestoju w eksploatacji. Okazało się mianowicie, że przy zastosowaniu znanych sposobów, bądź to według opisu patentowego RFN DAS nr 3 148 603 albo innych sposobów, aktywność katalizatora w przypadku zatrzymania eksploatacji, czy to z powodu przerwy w zasilaniu prądem czy z powodu innych zakłóceń, zostaje nieodwracalnie uszkodzona, jeśli nie zadba się o to, aby katalizator został możliwie szybko oziębiony do temperatury pokojowej. Wprawdzie wyłączając się np. w przypadku przerwy w dopływie prądu nie tylko pompy, lecz również ogrzewanie dla podgrzewania substratu. Zawarta w katalizatorze i w otaczającym go roztworze substratu pojemność cieplna uniemożliwia jednak potrzebne szybkie oziębienie i wystarcza do uszkodzenia katalizatora. W celu uniknięcia takich szkód trzeba np. za pomocą zespołów prądotwórczych awaryjnych podjąć starania aby w przypadku zatrzymania eksploatacji mógł być pompowany zimny roztwór substratu przez reaktor, aby osiągnąć w ten sposób potrzebne szybkie oziębienie wrażliwego katalizatora. W sposobie według wynalazku można jednak zrezygnować całkowicie z takich środków zabezpieczających.

Sposób według wynalazku przy metodzie ciągłej realizowany jest w ten sposób, że do wodnego roztworu glikozy o zawartości około 40-50% wagowych suchej substancji dodaje się SiO_2 , roztwór ustala się do wartości pH odpowiedniej dla związanej na nośniku glikoizomerazy i ogrzewa do temperatury izomeryzacji odpowiedniej dla związanej na nośniku glikoizomerazy. Tak przygotowany roztwór glikozy pompuje się przez reaktor, który jest napełniony katalizatorem na nośniku SiO_2 z aktywnością glikoizomerazy. Odpływający z reaktora roztwór glikozy-fruktozy bada się nieprzerwanie albo w regularnych odstępach na zawartość fruktozy, np. za pomocą analizy polarymetrycznej albo HPLC. Prędkość objętościowa v/v_h = objętość roztworu glikozy na objętość reaktora zajęta przez katalizator na godzinę/, z którą katalizator jest eksploatowany, ustala się przy tym tak, że odpływający roztwór, w odniesieniu do suchej substancji, zawiera w zakresie o niewielkich wahaniach np. $\pm 1\%$ fruktozę w ilości np. 42% wagowych.

Ponieważ w zależności od czasu eksploatacji i w szczególności od temperatury eksploatacji katalizator stale traci na aktywności, oznacza to, że prędkość objętościowa musi być stale cofana, aby osiągnąć niezmienny stopień izomeryzacji. Stopień izomeryzacji podaje przy tym, wyrażoną w procentach, liczbę cząsteczek fruktozy, które na 100 zawartych w roztworze wyjściowym cząsteczek glikozy po przepłynięciu reaktora i reakcji na katalizatorze są zawarte w odpływającym roztworze glikozy-fruktozy. Zależnie od czystości lub jakości glikozy zastosowanej do sporządzenia roztworu aby osiągnąć wymienioną wartość 42% wagowych fruktozy w suchej substancji odpływającego roztworu glikozy-fruktozy, katalizator musi być eksploatowany z prędkościami objętościowymi, które pozwalają uzyskać stopień izomeryzacji wynoszący około 44-47%.

Jeśli przy wytwarzaniu katalizatora na nośniku z aktywnością glikoizomerazy zastosowano glikoizomerazę *Streptomyces albus*, szczególnie dogodnie okazało się ustalenie roztworu glikozy na wartość pH około 7,0-8,5 i ogrzewanie roztworu glikozy do temperatury około 55-65°C. Oprócz tego okazało się w przypadku glikoizomerazy *Streptomyces albus*, że dodanie jonów Co/II/ i Mg/II/ do roztworu glikozy w ilościach około 0,1-2 ppm Co/II/ i około 10-200 ppm Mg/II/ , celowo w postaci ich soli rozpuszczalnych w wodzie jak np. chlorki albo siarczany, sprzyja izomeryzacji. Wreszcie korzystne jest jeszcze dodanie do roztworu glikozy stabilizującej ilości przeciwutleniacza, korzystnie SO_2 w ilości około 100-600 ppm w postaci siarczynu albo wodorosiarczynu metalu alkalicznego.

Zanim otrzymany roztwór glikozy-fruktozy zostanie doprowadzony do końcowego zastosowania, godne zalecenia jest usunięcie niepożądanych, gdyż np. pogarszających smak składników jonowych za pomocą wymieniaczy kationowych albo anionowych z roztworu glikozy-fruk-

toży. Ewentualnie można jeszcze zagęścić roztwór do konsystencji syropu. Na rynku występuje taki syrop pod takimi oznaczeniami jak izosyrop, izomeroza albo izoglikoza. Następujące przykłady służą do wyjaśnienia wynalazku.

P r z y k ł a d I. /przykład ogólny/. Dla wszystkich przykładów jako "wytworzony na bazie nośnika SiO_2 katalizator z aktywnością glikozoizomerazy" zastosowano katalizator wytworzony według opisu patentowego RFN DAS nr 2 726 188. Każdorazowo 5 g tego katalizatora napełniono do reaktora. Przez reaktor przepływał roztwór glikozy ogrzany do temperatury 60°C . Ustalenie prędkości objętościowej /w odniesieniu do objętości reaktora zawierającej katalizator/ przeprowadzono w ten sposób, że stopień izomeryzacji w ciągu całego czasu eksploatacji wynosił niezmiennie 46,5%. Stopień izomeryzacji wpływającego roztworu substratu mierzono polarymetrycznie.

Szczegółowo katalizator i sposób charakteryzują się następującymi zasadniczymi parametrami:

katalizator:

nośnik - SiO_2 ,
przyjęcie aktywności - 9000 μg ,
wielkość ziarna - 0,1-0,2 mm,
ciężar nasypowy /suchy/ - 0,45 kg/l,

proces:

substrat - 45% wagowych glikozy w roztworze wodnym,
współczynniki - 120 ppm Mg/II/, 1 ppm Co /II/, 200 ppm SO_2 /w postaci Na_2SO_3 /,
wartość pH - 7,5,
gęstość substratu - 1,2 kg/l,
temperatura wejściowa substratu - 60°C ,
stopień izomeryzacji - 46,5%,
początkowa prędkość objętościowa - $13,0 \text{ h}^{-1}$.

Oznaczenia aktywności roztworu glikozoizomerazy: aktywność użytego do sporządzenia katalizatora roztworu glikozoizomerazy oznaczono według metody Takasaki /por. Y. Takasaki: Agr. Biol. Chem. Vol. 30, nr 12, 1247-1253, 1966 i Z. Dische i E. Borenfreund: J. Biol. Chem. 192, 583, 1951/. Jednostka aktywności /U/ jest zdefiniowana jako ilość enzymu, która w warunkach inkubacji tworzy 1 mg fruktozy.

warunki inkubacji:

temperatura - 65°C ,
czas reakcji - 1 h,
substrat - 0,1 M glikozy x H_2O /Merck 8342/ w 0,05 M roztworu buforowego fosforanowego, pH 8,0 z 0,0004 M MgSO_4 .

Istotne kryteria dla jakości katalizatora lub procesu, przy których stosuje się katalizator, stanowi obok okresu połówkowego dla spadku aktywności, czasu eksploatacji aż do aktywności resztkowej wynoszącej 20% aktywności wyjściowej /20% aktywności resztkowej w odniesieniu do aktywności wyjściowej = 100% okazało się dolną granicą dającą się jeszcze ekonomicznie użytkować aktywności katalizatora/ przede wszystkim produktywność. Produktywność jest przy tym zdefiniowana jako ta ilość substratu, obliczona jako sucha substancja w kg, która może być przerabiana przy podanym stopniu izomeryzacji 1 kg katalizatora aż do aktywności resztkowej wynoszącej 20% aktywności wyjściowej.

P r z y k ł a d II. /przykład według wynalazku/. Ogólny przykład I wykonano z tym założeniem, że roztwór glikozy według wynalazku zawierał 50 ppm SiO_2 w postaci roztworu sodowego szkła wodnego. Otrzymano następujące wyniki:

okres połówkowy - 1300 h,
czas eksploatacji przy aktywności resztkowej 20% - 3800 h,
produktywność po 3800 h - 26000 kg suchej substancji z 46,5% wagowymi fruktozy/
/1 kg katalizatora

P r z y k ł a d III. /przykład porównawczy według opisu patentowego nr DE-C-3 148 603/. Ogólny przykład I wykonano z tym założeniem, że roztwór glikozy nie zawierał dodatku SiO_2 według wynalazku, jednak roztwór według opisu patentowego RFN DAS nr 3 148 603 przed podaniem do reaktora był pompowany przez podłączoną przed reaktorem kolumnę wstępną. Kolumna wstępna była wypełniona 5 g osiągalnego w handlu, kulistego,

wodoodpornego, porowatego krzemianu glinu /skład około 97% wagowych SiO_2 i 3% wagowych Al_2O_3 ; wielkość ziarna 1-2 mm; ciężar nasypowy, suchy, 0,7 kg/l; typ KCT-WS firmy Kali-Chemie AG/. Otrzymane wyniki /okres połówkowy, czas eksploatacji, produktywność/ były identyczne jak w przykładzie 1.1.

P r z y k ł a d IV. /przykład porównawczy/. Ten przykład odpowiada ogólnemu przykładowi I, to znaczy roztwór glikozy ani nie zawierał dodatku SiO_2 według wynalazku ani roztwór glikozy nie był prowadzony przez kolumnę wstępną wypełnioną półproduktami z SiO_2 albo krzemianu glinu. Wyniki są następujące:

okres połówkowy - 760 h,
 czas eksploatacji do reaktywności 20% - 1700 h,
 produktywność po 1700 h - 12500 kg suchej substancji z 46,5% wagowymi fruktozy/1 kg katalizatora.

P r z y k ł a d V. W celu stymulacji przestoju eksploatacyjnego powtórzono przykłady II, III i IV z tym założeniem, że po 300 godzinach eksploatacji przerwano przepływ roztworu glikozy bez zmiany temperatury reaktora na 3 godziny. Dało to następujące rezultaty:

P r z y k ł a d VI. W porównaniu z przykładem II nie wystąpiły żadne zmiany.

P r z y k ł a d VII. Po przywróceniu przepływu aktywność katalizatora spadła z 81% do 64% aktywności początkowej, co odpowiadało względnej utracie aktywności wynoszącej 21%. Poza tym uzyskano następujące wyniki:

okres połówkowy - 800 h,
 czas eksploatacji do aktywności resztkowej 20% - 2900 h,
 produktywność po 2900 h - 19200 kg suchej substancji z 4,5% wagowymi fruktozy/1 kg katalizatora.

P r z y k ł a d VIII. W tym przykładzie po wznowieniu przepływu aktywność katalizatora spadła z 75% do 59% aktywności początkowej, co odpowiada względnej utracie aktywności wynoszącej również 21%. Wyniki końcowe miały następujące wartości:

okres połówkowy - 480 h,
 czas eksploatacji do aktywności resztkowej 20% - 1300 h,
 produktywność po 1300 h - 9600 kg suchej substancji z 46,5% wagowymi fruktozy/1 kg katalizatora.

Przykłady wskazują, że sposobem według wynalazku można uzyskać tak samo dobry wzrost produktywności jak przy zastosowaniu sposobu według opisu patentowego RFN DAS nr 3 148 603, jednakże przy zastosowaniu sposobu według wynalazku przerwy w eksploatacji nawet przy zachowaniu niezmienniej temperatury reaktora nie powodują szkody dla aktywności katalizatora.

W celu uwidocznienia przykładów na załączonych wykresach przedstawiono spadek aktywności /fig. 1/ jak również rozwój produktywności /fig. 2 i 3/, każdorazowo w zależności od czasu eksploatacji. Na wszystkich wykresach na odciętej naniesiono czas eksploatacji. Na współrzędnej fig. 1 naniesiono aktywność w % i na współrzędnej fig. 2 i 3 produktywność w t /tonach/ suchej substancji na kg katalizatora. Wartości pomiarowe dla poszczególnych krzywych przedstawiono następująco:

przykłady II, III i VI	przez " • ————— • "
przykład IV	przez " x ————— x "
przykład VII	przez " . - - - - . "
przykład VIII	przez " x - - - - x "

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania roztworu zawierającego glikozę i fruktozę przez poddanie reakcji roztworu zawierającego glikozę na wytworzonym na bazie nośnika SiO_2 katalizatorze z aktywnością glikozoizomerazy, z n a m i e n n y t y m, że do roztworu glikozy dodaje się SiO_2 .

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że do roztworu glikozy dodaje się SiO_2 w ilości 30-80 ppm.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, z n a m i e n n y t y m, że do roztworu glikozy dodaje się SiO_2 w postaci szkła wodnego.



