



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr

Int. Cl.³ C12N 9/92

Zgłoszono: 20.03.80 (P. 222860)

Pierwszeństwo:

Zgłoszenie ogłoszono: 13.02.81

Opis patentowy opublikowano: 15.08.1983

Twórcy wynalazku: Maria Brzozowska, Tadeusz Gołębiewski, Janina Malanowska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Fermentacyjnego
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania enzymu izomerazy glukozowej

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania enzymu izomerazy glukozowej, mającego zastosowanie w przemyśle spożywczym, przy produkcji syropów fruktozowych. Enzym ten katalizuje odwracalne procesy izomeryzacji D-glukozy, D-fruktozy i D-ksylozy. Jego oficjalna nazwa, zgodnie z ustaleniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej, brzmi: katolo-izomeraza D-ksyloza 5.3.1.5.

Według znanych sposobów izomerazę glukozową wytwarza się na drodze hodowli drobnoustrojów mających zdolność syntetyzowania tego enzymu, jak na przykład: *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Microbispora*, *Thermopolyspora*, *Pseudonocardina*, w pożywkach, które obok ksylozy zawierają jako źródło węgla kwaśne, alkaliczne lub enzymatyczne wyciągi z otrębów, łusek kukurydzianych, miazgi ryżowej, a ponadto: ekstrakty drożdżowe, ekstrakty mięsne, namok kukurydziany oraz niezbędne sole azotowe, fosforowe i magnezowe. Niezależnie od wyżej wymienionych składników, do pożywek tych wprowadza się sole kobaltu, które są regulatorami procesu syntezy izomerazy glukozowej. I tak według sposobu przedstawionego w opisie patentowym RFN nr 2 209 041 izomerazę glukozową syntetyzuje się w drodze hodowli szczepu *Streptomyces* sp. ATCC—21175 w pożywce zawierającej 1% ksylozy, 4% namoku kukurydzianego, 1% sorbitu, 0,7% glukozy i 0,024% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Natomiast według opisu patentowego japońskiego nr 179 248 z 1976 r. szczep *Streptomyces albus* hoduje się w pożywce zawierającej 3% otrębów pszennych, 4% namoku kukurydzianego, 0,025% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oraz 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Wadą znanych i opisanych w literaturze pożywek jest to, że zawierają one sole kobaltu. Obecność bowiem kobaltu przyswajalnego przez komórki enzymu izomerazy glukozowej stawia pod znakiem zapytania możliwość stosowania tego enzymu w przemyśle spożywczym — ze względu na toksyczny charakter kobaltu.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu produkcji enzymu izomerazy glukozowej metodą aerobową w pożywkach pozbawionych soli kobaltu, opartych na łatwo dostępnych i tanich surowcach, oraz ustalenie warunków prowadzenia hodowli.

Stwierdzono, że cel ten można osiągnąć, stosując zamiast nieorganicznych soli kobaltowych witaminę B_{12} . Witamina B_{12} zawiera bowiem także związki kobaltu, który jest niezbędny do biosyntezy tego enzymu, w formie organicznej, przyswajalnej przez organizm ludzki bez ujemnych następstw.

Typowe podłoże do syntezy izomerazy glukozowej według wynalazku zawiera, oprócz witaminy B_{12} , enzymatyczny hydrolizat roślinnych surowców odpadowych, wyciąg namoku kukurydzianego, fosforan dwuamonowy, siarczan magnezu oraz odpowiedni węglowodan, jak na przykład glukozę, i w niewielkich ilościach ksylozę.

Według sposobu będącego przedmiotem niniejszego wynalazku czystą witaminę B₁₂ lub paszową, np. firmy La Roche, wprowadza się jałowo do tanku fermentacyjnego, zawierającego ochłodzoną pożywkę. Następnie szczepi się ją odpowiednim szczepem mikroorganizmu mającego zdolność syntetyzowania enzymu izomerazy glukozy. Proces hodowli prowadzi się w warunkach aerobowych, przy pH środowiska ustalonym w granicach 7. Ilość wytworzonej izomerazy glukozy uzależniona jest od stosowanego szczepu, odpowiedniego dobrania źródła węgla i pozostałych składników, w tym — ilości witaminy B₁₂, dodanej do pożywki.

Przykład I. Do wysterylizowanej pożywki o następującym składzie: enzymatyczny hydrolizat pyłów zbożowych, wyciąg namoku kukurydzianego, sole mineralne i niewielka ilość ksylozy, dodaje się czystą witaminę B₁₂ w ilości od 10 do 100 mg/100 ml. Tak przygotowaną pożywkę szczepi się bakteriami *Streptomyces olivaceus* i prowadzi się hodowlę w kolbach Erlenmayera na wstrząsarce w warunkach aerobowych, w temperaturze 27°C, w ciągu 48 godzin. Po zakończeniu hodowli bakterie odwirowuje się, a uzyskana biomasa stanowi produkt końcowy procesu.

Przykład II. Do wysterylizowanej pożywki, o składzie jak wyżej, dodaje się paszową witaminę B₁₂ w ilości od 0,010 do 0,10 g/100 ml, a następnie prowadzi się proces jak w przykładzie I.

Jak wykazały badania, aktywność enzymu izomerazy glukozy otrzymanej sposobem według wynalazku jest dużo wyższa od aktywności enzymów izomerazy glukozy uzyskanych w pożywkach syntetycznych z zawartością nieorganicznych soli kobaltu. Tak na przykład aktywność enzymów otrzymanych w pożywce syntetycznej, w skład której wchodzi czysty kobalt (opisanej w *Applied Microbiology* 1971, t. 21, nr 4, s. 588), wynosi 2700 J.I.G./j.ss. Natomiast aktywność enzymu otrzymanego sposobem według wynalazku przy zastosowaniu czystej witaminy B₁₂ wynosi 5160 J.I.G./j.ss., a przy zastosowaniu witaminy B₁₂ paszowej — 4600 J.I.G./j.ss.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania enzymu izomerazy glukozy metodą mikrobiologiczną w drodze aerobowej hodowli drobnoustrojów mających zdolność syntetyzowania tego enzymu, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w pożywce zawierającej witaminę B₁₂, która spełnia rolę induktora syntezy przy czym proces hodowli prowadzi się w ciągu 46–48 godzin, w temperaturze 27–30°C i przy pH środowiska hodowlanego około 7.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że witaminę B₁₂ dodaje się do pożywki w ilości 0,005–0,01% objętościowo.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że witaminę B₁₂ stosuje się w postaci proszku, roztworu lub wyciągu z naturalnych jej źródeł.