

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

99373

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 29.12.72 (159953)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.08.74

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1978

CZYTELNIA

Urzedu Patentowego
Państwa Rzeczpospolitej Ludowej

Int. Cl.²
C07B 29/02
C13K 11/00
C07G 7/028

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston Salem,
North Carolina (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób prowadzenia enzymatycznie katalizowanej przemiany substratu zawierającego węglowodany lub aminokwasy

Przedmiotem wynalazku jest sposób prowadzenia enzymatycznie katalizowanej przemiany substratu, zawierającego węglowodany lub aminokwasy.

Znane jest stosowanie enzymów, pochodzących z komórek mikroorganizmów, do prowadzenia reakcji chemicznych. Do prowadzenia takich przemian stosuje się zazwyczaj procesy okresowe, prowadzone przy użyciu preparatów bezkomórkowych. Enzymy uwalnia się z komórek zazwyczaj na drodze mechanicznej lub przez autolizę, jest to jednak proces kosztowny, stwarzający często dodatkowe problemy techniczne i natury ekonomicznej.

Różne trudności, związane z zastosowaniem całych komórek, jak również enzymów bezkomórkowych, doprowadziły ostatnio do wzrostu zainteresowania sposobami wytwarzania różnych unieruchomionych enzymów. Unieruchomione enzymy stosuje się w procesach okresowych i w procesach ciągłych, prowadzonych w kolumnach. Stosowanie unieruchomionych enzymów wymaga jednak oddzielania enzymu od mikroorganizmu, oczyszczenia i związania enzymu z nośnikiem, takim jak dekstran lub pochodne celulozy, żywice organiczne lub perełki szklane. Procesy ekstrakcji i oczyszczania są czasochłonne i towarzyszy im zwykle znaczna strata początkowej aktywności enzymu. Ponadto wiadomo, że substancje nierozpuszczalne, takie jak komórki, znacznie wydajniej usuwa się z cieczy przy użyciu polielektrolitów, żywic naturalnych lub ałunu amonowego. Np. w fermentacji za pomocą enzymów pozakomórkowych, w celu ułatwienia usuwania niepożądanych komórek i poprawienia klarowności przesączu, zawierającego enzym, zwykle stosuje się polielektrolity. Niektóre aspekty mechanizmu kłaczowania bakterii za pomocą polielektrolitu opisano w pracy P.L. Busch i W. Stumm „Environmental Science and Technology” 2, 40–53 (styczeń, 1968), jak również w pracy L.L. Gasnera i D.J.C. Wanga „Biotechnology and Bioengineering” 12, 873–887 (1970).

Jak wspomniano poprzednio, w ostatnich latach poświęca się znaczną uwagę kłaczowaniu komórek mikroorganizmów przede wszystkim w związku z biologiczną obróbką ścieków i klarowaniem ługów fermentacyj-

nych. Stwierdzono, że w wielu enzymatycznych procesach można stosować całe komórki mikroorganizmów lub agregaty bezkomórkowych preparatów enzymatycznych, otrzymane przy użyciu odpowiedniego środka kłaczującego.

Zgodnie z wynalazkiem, enzymatycznie katalizowaną przemianę substratu, zawierającego węglowodany lub aminokwasy przez działanie nań enzymem, zawartym w komórkach mikroorganizmu, otrzymanych w wyniku hodowli, w odpowiednich warunkach, mikroorganizmu zdolnego do wytworzenia tego enzymu. Cechą sposobu według wynalazku jest to, że na substrat działa się enzymem, zawartym w komórkach mikroorganizmu, stosując te komórki w postaci agregatu, otrzymanego przez uprzednie traktowanie całych komórek anionowym lub kationowym elektrolitem, stanowiącym środek kłaczujący.

Stwierdzono, że szczególnie korzystne wyniki osiąga się, jeżeli przed zastosowaniem do procesu enzymatycznie katalizowanej przemiany agregat komórek podda się odwadnianiu przez suszenie albo wymrażanie. Odwodniony agregat jest trwały i zachowuje aktywność enzymatyczną w ciągu dłuższego czasu w temperaturze pokojowej.

Proces według wynalazku może być korzystnie stosowany do przeprowadzania glikozy w fruktozę za pomocą enzymu, powodującego izomeryzację glikozy. W tym przypadku stosuje się komórki, pochodzące z mikroorganizmu, należącego do rodzaju *Arthrobacter* lub *Streptomyces*. Ciecz, zawierającą glikozę, można przepuszczać w sposób ciągły przez złożę, zawierające skłaczkowe komórki, utrzymując temperaturę złoża 50–90°C i korzystnie stosując ciecz o wartości pH = 6–10, przy czym wydajność przekształcenia glikozy we fruktozę wynosi 1–50% wydajności teoretycznej.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że zamrożenie agregatów, zawierających całe komórki mikroorganizmów lub umieszczenie ich w warunkach powodujących odwodnienie, nadaje skłaczkowym komórkom pewną sztywność lub integralność strukturalną bez pogorszenia aktywności enzymu, powodując tym samym to, że substancja taka nadaje się do stosowania w okresowych lub ciągłych procesach enzymatycznych. Na przykład, przez złożę skłaczkowanych komórek mikroorganizmów można wielokrotnie przepuszczać roztwory substratu i złożę to nie traci w ciągu dłuższego czasu aktywności enzymatycznej ani zdolności przepuszczania cieczy z dużą prędkością.

W celu przyspieszenia żądanej agregacji komórek stosuje się różne polielektrolitowe środki kłaczujące. Należą do nich polielektrolity anionowe, takie jak karboksy- podstawione poliakryloamidy, sulfonowany polistyren i kwasy wielokarboksylowe, polielektrolity kationowe, takie jak wieloaminy, polietylenoimina i kationowe poliakryloamidy, polikwasy, takie jak polilizyna i mineralne hydrokoloidy, takie jak aktywowana krzemionka. Dodatkowe przykłady polielektrolitów kationowych podano w publikacji M.F. Hoover, J. Macromol Sci. Chem. A3 (6), str. 1327–1417 (1970).

W celu osiągnięcia żądanej agregacji można stosować połączenie dwóch lub większej liczby środków kłaczujących. Wyboru odpowiedniego środka kłaczującego dla określonego przypadku dokonuje się łatwo, dodając niewielkie ilości różnych środków do małych próbek roztworu lub zawiesiny substancji, zawierającej enzym i porównując strukturę i wygląd powstałych agregatów komórek. W niektórych przypadkach korzystne jest stosowanie łącznie ze środkami kłaczującymi środków ułatwiających sączenie i polimerycznych adsorbentów. Np. polimeryczne adsorbenty amberlitowe, takie jak estry kwasu akrylowego i pomocnicze środki ułatwiające sączenie, takie jak ziemia okrzemkowa i azbest, wykazują skuteczne działanie, gdy dodaje się je do środowiska w czasie kłaczkania. Sposób według wynalazku nie jest jednak ograniczony do poprzednio wymienionych środków i stosując podobne substancje uzyskuje się równie zadowalające wyniki.

Środek kłaczujący dodaje się do substancji, zawierającej enzym, korzystnie w postaci roztworu lub zawiesiny. Niekiedy konieczne jest przed zmieszaniem nastawienie wartości pH roztworu środka kłaczującego i/lub środowiska, zawierającego enzym. Zależy to od stosowanego mikroorganizmu, trwałości enzymu i wartości pH, przy której środek kłaczujący jest najbardziej skuteczny. Kłaczkanie korzystnie prowadzi się w temperaturze pokojowej, a ilość potrzebnego środka kłaczującego, wynosi zazwyczaj 1–50% wagowych w stosunku do masy wilgotnych komórek lub preparatu enzymatycznego.

Środowisko, w którym prowadzi się kłaczkanie należy mieszać dość intensywnie, aby spowodować zetknięcie substancji, zawierającej enzym, ze środkiem kłaczującym. Należy unikać jednak nadmiernego mieszania, ponieważ stwarza to tendencje do pęknięcia świeżo powstałych agregatów i jest sprzeczne z celem kłaczkania. Dokładna regulacja mieszania daje trwałe agregaty, umożliwiając prawie całkowite odzyskanie substancji, zawierającej enzym przy użyciu typowych operacji, takich jak dekantacja, sączenie i odwirowywanie. Otrzymane agregaty można wprawdzie bez dalszej obróbki stosować w procesach enzymatycznych, jednakże na skutek upakowania i osadzania się tych agregatów w kolumnie maleje prędkość przepływu i czas pracy takiej kolumny, pracującej w sposób ciągły, jest znacznie krótszy.

W celu uniknięcia tego, przed zastosowaniem w procesach enzymatycznych, korzystnie wymraża się lub suszy skłaczkową substancję, zawierającą enzym. Obróbka taka nie tylko zwiększa prędkość przepływu roztworu substratu, lecz także ułatwia operowanie skłaczkowanym materiałem i umożliwia jego magazynowanie w ciągu dłuższego okresu czasu. Temperatura wymrażania nie ma decydującego znaczenia i wystarcza stosowanie temperatury 0°C lub niższej. Czas wymrażania zależy oczywiście od stosowanej temperatury i od masy wymrażanych agregatów. Otrzymana substancja skłaczkowana ma taką konsystencję, że daje się wytłaczać w różne kształty, odpowiednie do stosowania w procesach enzymatycznych. Wytłoczone agregaty stosuje się wraz z obojętną substancją nośną do przygotowania wypełnienia kolumn do pracy ciągłej, bądź też wymraża się je lub suszy przed użyciem.

Szczególnie korzystne jest suszenie skłaczkowanej substancji, gdyż umożliwia ono jej mielenie i przesiewanie według rozmiarów cząstek, co z kolei umożliwia wypełnianie kolumny produktem jednolitym. Suszenie skłaczkowanej substancji pozwala też na przechowywanie jej przez dłuższy okres czasu w temperaturze pokojowej. Suszy się w dowolny, dogodny sposób np. w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza lub pod zmniejszonym ciśnieniem w suszarni bębnowej, ale stosowana temperatura i czas suszenia nie powinny wpływać ujemnie na enzym. Czas suszenia jest różny, korzystnie jednak suszy się aż do otrzymania dostatecznej kruchości, umożliwiającej mielenie.

Skłaczkową substancję stosuje się w szeregu przemian katalizowanych enzymatycznie, takich jak izomeryzacja, utlenianie, odwodornianie, hydroliza i redukcja. Substancję dostosowuje się do procesu prowadzonego w sposób okresowy lub ciągły, ale przemiany, w czasie których następuje uwalnianie gazu, są nieco mniej odpowiednie do prowadzenia w kolumnach, pracujących w sposób ciągły. Ilość substancji zawierającej enzym, potrzebna w danym procesie, zależy od wielu czynników, takich jak właściwa aktywność enzymatyczna substancji, zawierającej enzym i jej dostępność dla substratu, jak również szybkość i pożądaný stopień przemiany. W operacjach prowadzonych w sposób ciągły w kolumnach, ilość potrzebnej substancji zawierającej enzym, zależy także od wymiarów kolumny i żądanej prędkości przepływu.

Substrat, korzystnie w postaci roztworu lub emulsji, poddaje się działaniu skłaczkowanej substancji w okresie czasu, wystarczającym do przeprowadzenia żądanej przemiany. Parametry procesu, takie jak temperatura, wartość pH i stężenie substratu, zależą od trwałości enzymu i warunków, w których przejawia on optymalną aktywność, odpowiednią dla danej przemiany. Produkt przemiany wyosobnia się w dowolny dogodny sposób lub ewentualnie poddaje go dalszej obróbce.

Sposób według wynalazku jest wyjaśniony w odniesieniu do określonych mikroorganizmów i enzymów. Na sterylnej pożywce, stanowiącej źródło węglowodanu, azotu i soli nieorganicznych, hoduje się wybrany szczep *Arthrobacter*, taki jak NRRL B-3724, NRRL B-3725, NRRL B-3726, NRRL B-3727, lub NRRL B-3728. W sposób, podany w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3645848, prowadzi się fermentację w temperaturze 30°C, aż do osiągnięcia maksymalnej aktywności izomeryazy, oznaczanej typowymi metodami. Wilgotne komórki w postaci zawiesiny w brzeczce stanowią wówczas zazwyczaj 4% wagowych całej brzeczki. Do brzeczki, której wartość pH doprowadzono uprzednio do 5,0, dodaje się w postaci 2% wodnego roztworu, poliwinylimidazolinę, taką jak produkt o nazwie handlowej Primaflor C-7 (kationowy środek kłaczujący produkcji firmy Rohm and Haas w Filadelfi). Ilość dodanego środka kłaczującego wynosi 0,25% wagowych w przeliczeniu na masę brzeczki. Dodawanie prowadzi się łagodnie, mieszając brzeczkę. Tworzenie się agregatów całych komórek kończy się zwykle w ciągu 10–15 minut. Przerywa się wówczas mieszanie i masa skłaczkowanych komórek osadza się na dnie kadzi fermentacyjnej. Komórki zbiera się, dekantując większość klarowanej brzeczki i odsączając skłaczkowane komórki pod zmniejszonym ciśnieniem.

Zebrane agregaty całych komórek zamraża się i utrzymuje w ciągu 8 godzin w temperaturze -5°C, po czym przygotowuje się z nich wypełnienie kolumny, stosując materiał w postaci rozmrożonej. Podczas przygotowywania wypełnionej kolumny agregaty szlamuje się w wodzie i zgina mechanicznie, otrzymując cząstki o bardziej jednolitej wielkości. Do tego celu nadaje się mieszalnik Waringa pod warunkiem, że mieszanie jest ograniczone do bardzo krótkiego okresu czasu. Szlam wlewa się do kolumny, wypełnionej częściowo wodą, w której następuje osadzanie się komórek. Przez wypełnioną kolumnę przepuszcza się roztwór glikozy o stężeniu do 50% wagowych, zawierający dostateczną ilość jonów Mg^{++} do uzyskania maksymalnej izomeryzacji, którego wartość pH wynosi 6–10.

W celu zwiększenia przemiany glikozy na fruktozę i zahamowania wzrostu mikroorganizmów, stanowiących zanieczyszczenia, kolumnę korzystnie ogrzewa się do temperatury 50–75°C. Szybkość przepływu strumienia odcieku reguluje się tak, aby uzyskać przemianę glikozy na fruktozę, wynoszącą 40–45% przemiany możliwej teoretycznie. Uzyskany sposobem według wynalazku stopień przemiany glikozy na fruktozę, wynosi do 50% lub więcej, zależnie od stosowanej temperatury izomeryzacji. W miarę potrzeby, dwie lub więcej kolumny

z wypełnieniem mogą pracować szeregowo, a z kolumn można odzyskiwać komórki, stanowiące wypełnienie i stosować je dalej do izomeryzacji glikozy. Aktywność izomerazy zostaje zachowana nawet wówczas, gdy przed ponownym użyciem materiał komórkowy odzyskuje się i chłodzi, wymraża lub suszy.

Izomeryzację glikozy na fruktozę prowadzi się również przy zastosowaniu różnych skłaczkowanych szczepów *Streptomyces*. Nadają się do tego celu i szczepy *S. albus*, *S. echinatur*, *S. achromogenes*, *S. phaeochromogenes*, *S. flavovirens* i *S. olivaceus*. Kłaczkovanie całych komórek lub enzymu bezkomórkowego, otrzymanych z hodowli różnych szczepów *Streptomyces*, prowadzi się analogicznie, jak opisano dla *Arthrobacter*. Podobnie prowadzi się też izomeryzację.

Przykład I. W wyjałowionej pożywce, zawierającej 2% dekstrozy, 0,3% białka mięsnego, 0,1% ekstraktu drożdżowego, 0,6% $\text{NK}_4/2\text{HPO}_4$, 0,2% KH_2PO_4 i 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, umieszcza się szczep *Arthrobacter* NRRL B-3728. Pożywka ta ma wartość $\text{pH} = 6,9$. W ciągu 60 godzin w temperaturze 28°C prowadzi się fermentację, ciągle mieszając pożywkę. Po tym okresie czasu wartość pH brzeczki wynosi 5,5. Do brzeczki dodaje się roztwór odpowiedniego polielektrolitu, takiego jak Primaflor C-7, o stężeniu 2% wagowo/objętościowych, otrzymując ostateczne stężenie polielektrolitu 0,25% wagowo/objętościowych. Wartość pH roztworu polielektrolitu nastawia się najpierw na 5 i dodaje się go do wolno mieszanej brzeczki fermentacyjnej. Ewentualnie do brzeczki o stężeniu 0,5% wagowo/objętościowych bezpośrednio przed dodaniem roztworu polielektrolitu dodaje się środki ułatwiające sączenie, takie jak celit i miesza łagodnie aż do powstania trwałych agregatów komórek (około 10 minut). Następnie przerywa się mieszanie i pozwala na aglomerację agregatów komórek, co umożliwia oddzielenie większości przezroczystej brzeczki od substancji komórkowej. Substancję komórkową odsącza się następnie pod zmniejszonym ciśnieniem lub w inny, dogodny sposób. Otrzymane agregaty komórek przed użyciem zamraża się w temperaturze -5°C albo suszy w temperaturze 55°C . Aktywność izomerazy w otrzymanych agregatach, określona typowymi metodami, jest porównywalna z aktywnością enzymatyczną komórek wydzielonych z brzeczki fermentacyjnej przed obróbką środkiem kłaczującym i środkiem ułatwiającym sączenie. Ponadto analiza oddzielonej brzeczki fermentacyjnej wykazuje brak aktywności enzymatycznej, wskazujący na całkowite oddzielenie izomerazy na drodze kłaczowania.

Przykład II. Przykład ten przedstawia ciągłą przemianę glikozy na fruktozę przy użyciu skłaczkowanych komórek, otrzymanych jak w przykładzie I i przechowywanych w ciągu kilku godzin w temperaturze -5°C . Zamrożone skłaczkowane komórki zanurza się w wodzie lub w syropie glikozowym. Masę komórkową pozostawia się do rozmrożenia i łagodnie kruszy mechanicznie lub za pomocą mieszania, otrzymując cząstki w przybliżeniu o jednolitych wymiarach. Otrzymany szlam utrzymuje się w ciągu 30 minut pod zmniejszonym ciśnieniem, aby z cząstek komórek usunąć zokludowane gazy. Odgazowany szlam wlewa się do kolumny o średnicy 4,54 cm, wyposażonej w płaszcz grzejny i częściowo wypełnionej wodą lub syropem glikozowym.

Aby otrzymać pożądaną stopień konwersji glikozy, wypełnioną kolumnę ogrzewa się do temperatury 60°C i przepuszcza się przez nią, regulując szybkość przepływu, 2M roztwór glikozy, zawierający 0,004 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Stopień przemiany wynosi do 50% przemiany teoretycznej.

Przykład III. Przykład ten przedstawia przygotowanie suszonych skłaczkowanych komórek i ich zastosowanie do ciągłej izomeryzacji glikozy na fruktozę, prowadzonej w kolumnie. Skłaczkovanie osiąga się dzięki łącznemu zastosowaniu anionowych i kationowych środków kłaczujących. 5 części świeżej hodowli *Arthrobacter* ($\text{pH} = 5,6$) zadaje się 1 częścią roztworu kationowego środka kłaczującego Primaflor C-7 o stężeniu 1% wagowo/objętościowy. Brzeczkę z dodatkiem środka kłaczującego miesza się powoli aż do powstania dużych skupień komórek. Następnie dodaje się 1 część roztworu anionowego środka kłaczującego Primaflor A-10 o stężeniu 1% wagowo/objętościowym i kontynuuje mieszanie aż do rozpadnięcia się dużych agregatów na drobne cząstki. Skłaczkowane komórki pozostawia się aż do agregacji, jak w przykładzie I, oddziela przezroczystą brzeczkę i skłaczkowane komórki oddziela przez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem. Przed dodaniem do brzeczki nastawia się przy pomocy wodorotlenków wartość pH obu roztworów środków kłaczujących. Wartość pH roztworu kationowego środka Primaflor C-7 doprowadza się do 5, a anionowego środka Primaflor A-10 do 7. Końcowa wartość pH hodowli poddawanej kłaczowaniu wynosi 5,6. Odsączone komórki wytłacza się przez odpowiednią matrycę i suszy w ciągu 24 godzin w suszarce w temperaturze 55°C . Otrzymaną suchą substancję granuluje się w młynie i przesiewa na sicie 20-40 mesh. Wyszuszone granulowane komórki umieszcza się w kolumnie jako wypełnienie i prowadzi izomeryzację glikozy, jak w przykładzie II.

Przykład IV. Na pożywce, zawierającej glikozę, fruktozę, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{NH}_4/2\text{HPO}_4$, mocznik i namokowy wyciąg z kukurydzy, hodzi się szczep *Aspergillus niger*. Pod koniec okresu fermentacji do pożywki dodaje się polielektrolit kationowy w ilości równoważnej 0,3% wagowych odniesionych do objętości brzeczki. Całość miesza się wystarczająco intensywnie, aby powstały agregaty komórek. Skłaczkowane komórki oddziela się i umieszcza w kolumnie o odpowiednich wymiarach, wyposażonej w płaszcz grzejny. Wypełnioną

kolumnę ogrzewa się do temperatury 40°C i przepuszcza się przez nią 5% roztwór cukru inwertowanego, otrzymując odciek, zawierający kwas glikonowy i fruktozę.

Przykład V. Na pożywce, zawierającej 0,7% ksylozy, 0,3% dekstrozy, 0,5% NaCl, 0,5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,024% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hoduje się szczep *Streptomyces olivaceus* NRRL B – 3583. Fermentacja przebiega w ciągu 24 godzin w temperaturze 28°C. Do brzeczki fermentacyjnej dodaje się roztwór polielektrolitu kationowego o stężeniu 2% wagowo/objętościowych w ilości odpowiadającej 0,05% wagowo/objętościowych suchego środka kłaczkującego. Brzeczke miesza się intensywnie, aby przyspieszyć agregację komórek. Następnie przerywa się mieszanie i skłaczkowaniem komórek pozwala się osiąść. Agregaty komórek oddziela się, jak w przykładzie I. Skłaczkowane komórki suszy się w ciągu 24 godzin w temperaturze 60°C, po czym produkt kruszy się łagodnie tak, aby nadawał się do pracy w kolumnie. Pokruszony materiał komórkowy umieszcza się w kolumnie z płaszczem, wypełnionej częściowo 1,0 M roztworem glikozy. Wypełnioną kolumnę ogrzewa się do temperatury 70°C i przepuszcza się przez nią 1,0 M roztwór glikozy, zawierający 0,04 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o wartości pH doprowadzonej do 8, powodując przemianę glikozy na fruktozę.

Przykład VI. Na pożywce zawierającej melasę hoduje się szczep *Saccharomyces cerevisiae*. Po odpowiednim okresie fermentacji do brzeczki dodaje się roztwór polielektrolitu i miesza wystarczająco intensywnie, aby doprowadzić do agregacji komórek. Skłaczkowane komórki oddziela się i stosuje w operacji przemiany sacharozy w cukier inwertowany, prowadzonej w sposób ciągły w kolumnie w temperaturze 60°C. Przechodzący przez kolumnę 0,5 M roztwór sacharozy ma wartość pH = 5.

Przykład VII. Na pożywce, zawierającej otręby pszenne, zmieszane z dodatkiem węglowodanów, substancji mineralnych i buforujących, hoduje się szczep *Aspergillus oryzae*. Fermentację prowadzi się w ciągu 48 godzin w temperaturze 30°C, po czym do bulionu dodaje się roztwór odpowiedniego polielektrolitu. Agregację skłaczkowanych komórek wspomaga się delikatnym mieszaniem. Następnie skłaczkowane komórki umieszcza się w kolumnie z płaszczem grzejnym i ogrzewa do temperatury 50°C. Przez kolumnę przepuszcza się obojętny 0,2 M roztwór acetylo-DL-metioniny, zawierający 5×10^{-4} M Co^{++} . Otrzymuje się odciek, zawierający L-metioninę.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób prowadzenia enzymatycznie katalizowanej przemiany substratów, zawierających węglowodany albo aminokwasy, obejmujący działanie na substrat aktywnym i zdolnym do przekształcania tego substratu enzymem, zawartym w komórkach mikroorganizmu, otrzymanych w wyniku hodowli, w odpowiednich warunkach, mikroorganizmu zdolnego do wytwarzania tego enzymu, z n a m i e n n y t y m, że na substrat działa się tym enzymem, zawartym w komórkach mikroorganizmu, stosując te komórki w postaci agregatu, otrzymanego przez uprzednie traktowanie całych komórek anionowym lub kationowym elektrolitem, stanowiącym środek kłaczkujący.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się agregat komórek, poddany suszeniu przed użyciem go w procesie enzymatycznie katalizowanej przemiany.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się agregat komórek, poddany wymrażaniu przed użyciem go w procesie enzymatycznie katalizowanej przemiany.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako substrat stosuje się ciecz, zawierającą glikozę i przeprowadza glikozę w fruktozę za pomocą enzymu izomeryzującego glikozę.

5. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się enzym, zawarty w komórkach mikroorganizmu, należącego do rodzaju *Arthrobacter*.

6. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się enzym, zawarty w komórkach mikroorganizmu, należącego do rodzaju *Streptomyces*.

7. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że ciecz, zawierającą glikozę, prowadzi się w sposób ciągły przez złożę, zawierające skłaczkowane komórki.

8. Sposób według zastrz. 7, z n a m i e n n y t y m, że utrzymuje się temperaturę złoża 50–90°C i stosuje ciecz, zawierającą glukozę o wartości pH = 6–10, przy czym 1–50% glikozy przekształca się w fruktozę.