



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 24.07.74 (P. 172981)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 14.02.76

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

MKP C13k 9/00
C07c 47/18

Int. Cl.²
C13K 11/00
C07H 3/02

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Corning Glass Works, Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania fruktozy z glikozy na drodze enzymatycznej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania fruktozy z glikozy na drodze enzymatycznej. Fruktoza jest około dwukrotnie słodszy izomerem glikozy. Ponieważ ten sam stopień słodkości daje ilość fruktozy równa około połowie ilości glikozy, fruktoza jest szczególnie użyteczna w przypadkach, wymagających słodzenia przy minimalnym wkładzie kalorii.

Znane jest, że glikozę można częściowo izomeryzować do fruktozy przez podgrzewanie roztworu glikozy w obecności katalizatora alkalicznego lub przez poddanie roztworu glikozy katalitycznemu działaniu pewnych enzymów. Enzymy, które można stosować pochodzą z różnych organizmów, ale ze względu na ich zdolność katalizowania procesu izomeryzacji glikozy do fruktozy nazywane są powszechnie izomerazą glikozy, bez względu na pochodzenie. Izomeraza glikozy odnosi się do którejkolwiek z tych enzymów.

Alkaliczna izomeryzacja glikozy do fruktozy nie dawała zadowalających wyników ze względu na to, że nieselektywne katalizatory alkaliczne mają tendencję do wytwarzania niekorzystnych produktów ubocznych, które trudno usunąć. Należą do nich różne związki barwne i produkty kwasowe, których usunięcie wymaga dodatkowego procesu.

Niektóre niedogodności, towarzyszące izomeryzacji alkalicznej, zostały usunięte dzięki niedawnemu odkryciu, że w procesie izomeryzacji glikozy można

2

stosować w środowisku alkalicznym subtelnie rozdrobiony tlenek glinowy, co przedstawia opis patentowy St. Zjedn. Amer. nr 3 431 253. Stwierdzono, że stosując tlenek glinowy o bardzo rozwiniętej powierzchni w środowisku alkalicznym o wartości $\text{pH} > 7$ można uniknąć powstawania produktów ubocznych. Kolejna korzyść, wynikająca z zastosowania cząstek stałego tlenku glinowego jest ta, że można łatwo usunąć go z mieszaniny reakcyjnej i użyć ponownie.

Stosowanie subtelnie rozdrobionego tlenku glinowego jako katalizatora wymaga jednak stosunkowo długiego czasu obecności glikozy, co uniemożliwia bardziej ekonomiczną reakcję ciągłą lub przepływową. Ponadto ze względu na przypuszczalnie istniejącą równowagę między glikozą i fruktozą optymalna przemiana glikozy w fruktozę jest bardzo ograniczona, w warunkach reakcji typu okresowego, opisanej w powyższym opisie patentowym.

Ze względu na ograniczenia, związane ze znanymi metodami izomeryzacji alkalicznej, zwrócono uwagę na metody izomeryzacji enzymatycznej. Enzymatyczna przemiana glikozy w fruktozę wymaga jedynie inkubowania roztworu, zawierającego glikozę z izomerazą glikozy w warunkach, umożliwiających izomeryzację takich, jak odpowiednia temperatura, pH , różne dodatki itp. Ponieważ izomeraza glikozy posiada bardzo specyficzne działanie

w typie reakcji, jaką wywołuje, czyli izomeryzacji oraz ze względu na nadzwyczaj wysoką zdolność katalityczną enzymów, zastosowanie izomerazy glikozy było badane przez wielu specjalistów w celu znalezienia ekonomicznego sposobu wytwarzania fruktozy na drodze enzymatycznej.

Jedno z najwcześniejszych ujawnień, opisujących enzymatyczną izomeryzację glikozy, można znaleźć w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 2 950 228. Stwierdzono, że produkt nawet wysoce specyficznej izomeryzacji enzymatycznej może w niektórych przypadkach nadal zawierać równe niepożądane barwniki. Jedną z metod uniknięcia lub przynajmniej ograniczenia do minimum powstawania takich związków przedstawia opis patentowy St. Zjedn. Amer. nr 3 623 953, gdzie ujawniono, że dodanie różnych soli siarczynowych do roztworu izomeryzacyjnego ogranicza tworzenie się barwników i równocześnie zwiększa stabilność izomerazy glikozy.

Stosowanie enzymów na dużą skalę jest jednak ograniczone głównie z powodu wysokich kosztów enzymów, które, będąc rozpuszczalne w wodzie, są trudne do usunięcia po wykorzystaniu, więc mogą być użyte tylko raz i często są częścią składową produktu końcowego ze względu na koszty związane z ich usunięciem.

W ostatnich latach opracowano technikę „unieruchamiania” czy też „nierozpuszczania” różnych enzymów przez adsorbowanie lub chemiczne przyłączenie ich do nierozpuszczalnych z zasady nośników, co umożliwia łatwe usunięcie powstałych w rezultacie układów enzymatycznych. Enzymy łączono z substancjami organicznymi takimi, jak różne pochodne celulozy, kulki poliaminopolistyrenowe itp. oraz z różnymi substancjami nieorganicznymi takimi, jak porowate szkło i kserożele krzemionkowe. W wielu przypadkach preferuje się nośniki nieorganiczne nad organiczne ze względu na ich większą sztywność, napężnienie i stabilność cieplną.

Metody adsorbowania enzymów na różnych nośnikach krzemionkowych można znaleźć w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 3556945, a metody chemicznego połączenia enzymów z nośnikami nieorganicznymi w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 3519538. Mimo że adsorbowanie enzymów na nośnikach nieorganicznych ma różne zalety, ma też wady, które przeszkadzają w stosowaniu tego procesu w przemyśle. Na przykład przygotowanie nośnika krzemionkowego takiego, jak porowate szkło, jest zwykle kosztowne. Ponadto porowate szkło podobnie, jak kserożele krzemionkowe, nie jest odporne na alkalia, co jest konieczne w długotrwałym procesie z zastosowaniem enzymu takiego, jak izomeraza glikozy, która posiada alkaliczne optimum pH. Dlatego włożono wiele wysiłku w znalezienie lepszego nośnika dla izomerazy glikozy, który miałby korzystne cechy nośników nieorganicznych, a równocześnie był pozbawiony charakterystycznych dla nich wad.

Sposób wytwarzania fruktozy polega na inkubowaniu roztworu, zawierającego glikozę z unieruchomionym układem enzymatycznym, zawierają-

cym izomerazę glikozy, zaadsorbowaną w porach tlenku glinowego o przeciętnej średnicy porów 100—1000 Å. Porowaty nośnik z tlenku glinowego korzystnie posiada cząstki o uziarnieniu 0,177—0,71 mm według normy St. Zjedn. Amer, a układ enzymatyczny, zawierający cząstki porowatego tlenku glinowego, korzystnie jest umieszczony w kolumnie przepływowej, przez którą przepuszcza się ciągle roztwór glikozy w warunkach izomeryzacji. Odpowiednia temperatura inkubowania wynosi 50°C—70°C. Reakcja przebiega dobrze w obecności różnych mieszanin buforowych, korzystnie w zakresie pH=7,2—8,2, przy czym szczególnie korzystna wartość pH wynosi 7,4—7,8. Ponieważ nośnik składa się z porowatego tlenku glinowego, otrzymany układ enzymatyczny wykazuje bardzo dobrą odporność na alkalia w zakresie wartości pH, w którym związana izomeraza glikozy wykazuje optimum aktywności.

W sposobie wytwarzania fruktozy bardzo istotną rolę odgrywa porowaty nośnik z tlenku glinowego, stosowany dla izomerazy glikozy. Nośnik musi mieć przeciętną średnicę porów 100—1000 Å, umożliwiającą maksymalne zaadsorbowanie enzymu. Dolna granica 100 Å określona jest największym rozmiarem cząsteczka izomerazy glikozy jest wydłużona. Tak więc bliżeniu 100 Å. Przeciętny wymiar porów musi wynosić przynajmniej 100 Å, aby umożliwić wejście cząsteczki w pory i masową dyfuzję enzymu głęboko w porowatą sieć przed końcowym zaadsorbowaniem na wewnętrznej powierzchni nośnika. Cząsteczka izomerazy glikozy jest wydłużona. Tak więc stosując nośnik z tlenku glinowego o średnicy porów, równej przynajmniej największemu wymiarowi cząsteczki — 100 Å, zapewnimy jej wejście w pory. Pozwala to na wykorzystanie w dużym stopniu powierzchni wewnętrznej do adsorbowania enzymu.

Z kilku powodów ważne jest, by przeciętna wielkość pora nośnika z tlenku glinowego nie przekraczała 1000 Å. Jeśli przeciętna wielkość pora nośnika nieorganicznego przekracza 1000 Å, zmniejsza się powierzchnia adsorpcyjna oraz adsorbowanie enzymu. Ponadto, jeśli przeciętny rozmiar porów przekracza 1000 Å, sztywna struktura wewnętrzna porów mniej chroni enzym przed wpływami otoczenia, co powoduje oderwanie się enzymu. Gdyby na przykład unieruchomiony układ enzymatyczny umieścić w kolumnie przepływowej, spadek ciśnienia w kolumnie stanowić będzie jeden z takich gwałtownych czynników, powodujących odrywanie enzymu, zaadsorbowanego w porach nośnika o przeciętnej średnicy większej, niż 1000 Å.

Ponieważ w procesie adsorpcji konieczna jest względnie duża powierzchnia, na przykład większa niż 5 m²/g i ponieważ konieczna jest ochrona zaadsorbowanego enzymu przed czynnikami zewnętrznymi, przeciętna średnica porów nośnika z tlenku glinowego nie powinna być większa, niż 1000 Å. Najbardziej korzystny przeciętny rozmiar porów nośnika z tlenku glinowego wynosi 140—220 Å. Właściwości fizyczne takiego nośnika opisano bardziej szczegółowo poniżej.

Po przygotowaniu lub otrzymaniu porowatego tlenku glinowego o przeciętnej średnicy pora 100—

1000 Å może okazać się konieczne sproszkowanie go do pożądanego uziarnienia, które będzie odpowiednie dla nośnika, stosowanego do unieruchomienia izomerazy glikozy. Kiedy układ enzymatyczny umieszcza się w kolumnie cylindrycznej, przez którą przepływa ciągle roztwór glikozy, najbardziej odpowiednia wielkość cząstek nośnika wynosi 0,074—4,76 mm według znormalizowanego sita amerykańskiego. Cząstki większe, niż 4,76 mm, wymagają więcej czasu na dyfuzję enzymu przed związaniem, dłuższego czasu przechowania substratu, utrudniają jego dyfuzję oraz powodują, że przemiana jest nieekonomiczna. Z drugiej strony, jeśli wielkość cząstki nośnika jest mniejsza, niż 0,074 mm, trudno posługiwać się układem i utrzymać go w kolumnie, a ponieważ w konsekwencji następuje ciśnieńsze załadowanie kolumny, wynikiem jest niepożądane duży spadek ciśnienia w kolumnie, co zwykle wymaga dodatkowego wyposażenia. Najbardziej korzystna wielkość cząstki nośnika wynosi 0,177—0,71 mm i nośniki o takiej przeciętnej wielkości cząstek stosuje się w opisanych niżej doświadczeniach.

Po sproszkowaniu i przesianiu porowatego tlenku glinowego do otrzymania cząstkopoządanej wielkości są one uwadniane i wstępnie przygotowane przy pomocy odpowiedniego buforu lub soli. Korzystne dla nośnika z tlenku glinowego jest uwodnienie przy pH o wartości 7,0. Następnie usuwa się mieszaninę buforową, znajdującą się na zewnątrz porów, ale porowate substancje z tlenku glinowego pozostają mokre przed adsorpcją. Do zwilżonego nośnika dodaje się roztwór izomerazy glikozy o takim stężeniu na jednostkę masy porowatego nośnika z tlenku glinowego, które umożliwia optymalną adsorpcję izomerazy glikozy.

Proces adsorpcji ułatwia się przez mieszanie, cykulację, odwracanie, użycie reaktora fluidyzacyjnego, zawierającego nośnik, albo innych znanych sposobów, odpowiednich do wytworzenia środowiska pobudzonego, powodującego masową dyfuzję enzymu przez pory. Czas optymalnej adsorpcji zależy od rozmiaru cząstek nośnika, wielkości enzymu, znajdującego się naprzeciw pora o przeciętnej średnicy i od innych czynników takich, jak temperatura i pH, ale powinien on wynosić przynajmniej 0,5 godziny. Stwierdzono, że okres od 1,5—5 lub 6 godzin jest wystarczający do uzyskania maksymalnej adsorpcji izomerazy glikozy w porach tlenku glinowego o przeciętnej średnicy 175 Å. Adsorpcja przebiega dobrze w zakresie wartości pH 6,9—9,0, korzystnie przy pH=7,1—8,5. Pozostałe po adsorpcji enzymy usuwa się przez płukanie układu w wodzie, roztworze soli np. 0,5 NaCl, lub w innych środkach płuczających, które nie mają szkodliwego wpływu na nośnik, czy przyłączony enzym.

W praktyce układ enzymatyczny może być umieszczony w kolumnie, reaktorze zbiornikowym z ciągłym mieszaniem, reaktorze fluidyzacyjnym, czy innym naczyniu, do którego lub przez które wprowadza się roztwór substratu w celu inkubowania. Podane niżej przykłady przedstawiają układ, zawierający izomerazę glikozy oraz nośnik, umiesz-

czony w kolumnach, przez które przepływa roztwór glikozy w warunkach inkubowania.

Ze względów ekonomicznych korzystny jest proces ciągły, a odpowiednim urządzeniem jest kolumna z regulowanym przepływem. Kolumna może być osłonięta płaszczem wodnym w celu utrzymania optymalnej temperatury inkubowania i/lub temperatury, w której półokres aktywności enzymu jest maksymalny. Temperatura inkubowania 50°C—70°C, korzystnie 60°C, nie tylko zapewnia efektywną inwersję glikozy do fruktozy, lecz także dopuszcza długi półokres aktywności enzymatycznego układu. Korzystnie roztwór substratu zawiera przynajmniej 45% wagowych glikozy.

Zakres pH inkubowania i stosowany bufor zależy od układu enzymatycznego i warunków reakcji. Dla opisanego wyżej enzymatycznego układu reakcja przebiega dobrze przy pH o wartości 7,2—8,2, szczególnie korzystnie przy pH=7,4—7,8. Wybór buforu zależy od stopnia kwasowości roztworu substratu, spowodowanej przez sam roztwór i/lub od obecności różnych aktywnych jonów, które mogą być dodane do substratu, oraz od środowiska wewnątrz porów. Na przykład podczas inkubowania 50% roztworu glikozy z układem, zawierającym izomerazę glikozy, niewielka ilość jonów kobaltu i magnezu może być dodana do substratu przed doprowadzeniem do zetknięcia z układem enzymatycznym. Odczyn tych jonów można usunąć przez dodanie soli siarczynowych, które zarazem zwiększają stabilność układu. Mieszaniny buforowe, stosowane w przypadku izomerazy glikozy, są znane i mogą być łatwo określone przez fachowców.

W podanych niżej przykładach do wytwarzania enzymatycznego układu stosuje się izomerazę glikozy, pochodzącą z dwóch różnych źródeł, a następnie porównuje się wyniki, dotyczące okresu stabilności i półokresu aktywności. Układy bada się w standardowych warunkach w reaktorze o działaniu okresowym. Wyniki podaje się w międzynarodowych jednostkach izomerazy glikozy IGIU, gdzie IGIU jest ilością enzymu, potrzebną do przekształcenia 1 μmola glikozy do fruktozy/minutę w temperaturze 60°C i przy pH o wartości 6,85. Nośnik i układ sporządza się niżej opisanym sposobem, określając równocześnie okres stabilizacji i półokres aktywności układu. Doświadczenia prowadzi się w celu porównania skuteczności układu z innymi, zawierającymi izomerazę glikozy chemicznie związaną z nieorganicznym nośnikiem. W celu określenia wpływu na proces izomeryzacji samego nośnika z tlenku glinowego, przeprowadzono dodatkowe doświadczenia.

Korzystny nośnik, zastosowany w podanych przykładach, posiada następujące własności, średni wymiar porów 175 Å, minimalny rozmiar porów 140 Å, maksymalny rozmiar porów — 220 Å, powierzchnia 100 m²/g, objętość porów 0,6 cm³/g, porowatość 62,5%, uziarnienie 0,25—0,71 mm. Rozkład wielkości porów określono powszechnie stosowanymi metodami i stwierdzono, że jest bardzo bliski przeciętnemu wymiarowi porów np. 90% w obrębie ±26% o wielkości 175 Å.

Przykład I. W procesie adsorpcji stosuje się surowy preparat izomerazy glikozy, zawierający około 444 IGIU/g, pochodzący z organizmu *Streptomyces*. Około 5 gram preparatu izomerazy glikozy dodaje się do 28,7 ml roztworu octanu magnezowego o stężeniu 0,1 mola, znajdującego się w 50 ml zlewce.

Zawiesinę miesza się przez 25 minut w temperaturze pokojowej, a następnie sączy przez bibułę filtracyjną. Pozostałość na sączku spłukuje się 14,3 ml octanu magnezowego o stężeniu 0,1 m i 4,3 ml NaHCO_3 o stężeniu 0,5 m. Popłuczyny zbiera się bezpośrednio na oryginalny filtr enzymatyczny. Całkowita objętość roztworu (przesącza) po przepłukaniu wynosi 50 ml.

500 mg porowatego tlenku glinowego umieszcza się w 50 ml kolbie okrągłodennej. Do kolby dodaje się następnie 10 ml roztworu izomerazy glikozy. Kolbę przytwierdza się do obrotowego aparatu wyparowego. W wyparce wytwarza się próżnię, a kolbę obraca się na łaźni w temperaturze 30–45°C przez 25 minut. Następnie do kolby dodaje się kolejne 10 ml roztworu izomerazy glikozy, a odparowanie kontynuuje się przez następne 35 minut w tych samych warunkach. Dodawanie roztworu i odparowywanie prowadzi się przez 4 godziny w tych samych warunkach. Proces ten powtarza się jeszcze dwukrotnie z oddzielnymi 10 ml roztworu izomerazy glikozy. Do kolby dodaje się następnie ostatnie 7 ml roztworu izomerazy glikozy i kontynuuje się odparowywanie przez godzinę i 10 minut w temperaturze 45°C. Kolbę z zawartością wyjmuje się z aparatu wyparowego i umieszcza się w chłodnym pokoju na okres 2 dni. Do tlenku glinowego dodaje się 47 ml roztworu izomerazy glikozy.

Do enzymatycznego układu dodaje się 50 ml roztworu buforowego (0,01 m maleinianu sodowego o wartości $\text{pH} = 6,8\text{--}6,9$, zawierającego 0,001 m chlorku kobaltu i 0,005 m siarczuanu magnezowego) i w ciągu następnej godziny pobiera się próbkę w temperaturze pokojowej. Próbkę o objętości 50 ml zachowuje się do analizy. Układ płucze się następnie 200 ml wody, a potem 10 ml chlorku sodowego o stężeniu 0,5 m. Końcowe płukanie 50 ml wody prowadzi się na lejku ze spiekanego szkła. Układ przenosi się następnie do 50 ml kolby Erlenmeyera i przechowuje w roztworze buforowym w temperaturze pokojowej, dokonując okresowych analiz całej próbki w ciągu 106 dni.

Wyniki:

Analiza 50 ml próbki — 39,8 IGIU/ml (aktywność enzymatyczna w próbce — 90%)

Analiza układu enzymatycznego — 130 IGIU/500 mg próbkę (aktywność enzymatyczna układu — 6%)

Przeciętna wartość adsorpcji — 260 IGIU/g

W celu oznaczenia trwałości przechowywania próbki w ciągu 106 dni przeprowadzono 21 okresowych analiz, z których 16 analiz tej samej próbki wykazało aktywność 100–150 IGIU/500 mg lub 200–300 IGIU/g.

Przykład II. W celu określenia okresu stabilności i półokresu aktywności enzymatycznego

układu przygotowuje się następną próbkę, umieszczoną w kolumnie przepływowej, przez którą przepływa roztwór, zawierający glikozę w warunkach przemysłowych.

Opisany powyżej nośnik z tlenku glinowego o średniej wielkości porów 175 Å, i uzłarnieniu 0,25–0,71 mm poddaje się następującej obróbce. 11 g porowatego tlenku glinowego umieszcza się w 100 ml szklanym cylindrze z doszlifowanym korkiem, do którego następnie dodaje się 100 ml octanu magnezowego o stężeniu 0,05 m, octanu kobaltowego o stężeniu 0,01 m, $\text{pH} = 7,5$. Cylinder zamyka się, a zawartość delikatnie miesza przez odwracanie i następnie umieszcza się na łaźni w temperaturze 60°C. Po 15 minutach cylinder odwraca się, a płyn dekantuje. Do cylindra dodaje się 100 ml świeżego octanu magnezowego i kobaltowego, cylinder odwraca się i pozostawia w temperaturze pokojowej przez 2,5 godziny.

Surowy roztwór izomerazy glikozy z opisanego wyżej źródła, zawierający 590 IGIU/ml w nasycy-
nym siarczanie amonowym o stężeniu 0,6 m oczyszcza się i poddaje reakcji z tlenkiem glinowym.

Do 40 ml roztworu izomerazy glikozy w zlewce dodaje się 1,4 g siarczuanu amonowego w celu wytrącenia enzymu, mieszając zawiesinę w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie próbkę wiruje się z szybkością 16000 obrotów na minutę w temperaturze 2°C przez 30 minut. Płyn sklarowany nad osadem wylewa się. Do osadu dodaje się 12 ml roztworu octanu magnezowego i kobaltowego, miesza się, a następnie do roztworu enzymatycznego dodaje się 3 ml wodorowęglanu sodowego o stężeniu 0,5 m i miesza się w celu rozpuszczenia enzymu. Roztwór umieszcza się na łaźni wodnej w temperaturze 60°C na 15 minut. Po usunięciu z łaźni roztwór wiruje się przez 15 minut z szybkością 16000 obrotów na minutę w temperaturze 2°C. Czysty, sklarowany nad osadem roztwór enzymatyczny zlewa się, a osad odrzuca. Stwierdzono, że roztwór enzymatyczny o objętości 28 ml ma pH o wartości 7,5. Jeśli w czasie oczyszczania nie nastąpiło obniżenie aktywności, roztwór ten powinien zawierać 23600 IGIU.

Roztwór octanu magnezowo-kobaltowego oddziela się od porowatego tlenku glinowego przez odwrócenie. Do porowatego tlenku glinowego umieszczonego w cylindrze dodaje się 28 ml roztworu enzymatycznego. Cylinder zatyka się korkiem, a zawartość miesza przez odwracanie cylindra i umieszcza się go na łaźni wodnej w temperaturze 60°C. Doprowadza się do reakcji enzymu z porowatym tlenkiem glinowym (11 g) w czasie 2 godzin 30 minut w temperaturze 60°C. W tym czasie cylinder odwraca się co 15 minut. Po usunięciu z łaźni o temperaturze 60°C reakcja przebiega dalej w temperaturze pokojowej, przy czym cylinder odwraca się co 30 minut przez następne 2 godziny. Reakcję kontynuuje się przez noc w temperaturze pokojowej już bez odwracania cylindra.

Roztwór enzymatyczny o objętości 28,5 ml i pH o wartości 7,1 zlewa się i zachowuje do analizy. Układ enzymatyczny płucze się 60 ml wody destylowanej, 40 ml roztworu chlorku sodowego o stę-

żeniu 0,5 m i 40 ml roztworu octanu magnezowego i kobaltowego. Trzy próbki w ilości 1 g pobiera się z porcji w celu dokonania analizy. Pozostałe 10 g umieszcza się w kolumnie termostатовanej w 60°C. Do kolumny wprowadza się roztwór, zawierający 50% glikozy i siarczan magnezowy o stężeniu 0,005 m buforowany siarczynem sodowym do pH o wartości 7,7–8,0. W czasie pierwszych 26 godzin do kolumny wprowadza się chlorek kobaltowy o stężeniu 0,001 m. Po 26 godzinach nie wprowadza się już kobaltu i jedynym środkiem aktywnym w pozostałym czasie pracy kolumny są jony magnezu. Początkowa szybkość przepływu w kolumnie wynosi w przybliżeniu 190 ml/godzinę.

Ilość wytwarzanej fruktozy utrzymuje się w granicach 80–85% ilości teoretycznej, zmniejszając szybkość przepływu w różnych odstępach czasu. Kolumna działała w przybliżeniu 31 dni. Po tym czasie ze względu na brak doprowadzania substratu, kolumna wyschła całkowicie i pozostała sucha przez około 15 godzin. Przybliżoną wartość półokresu aktywności układu enzymatycznego otrzymuje się przez obliczenie ilości zebranego produktu i przemianę produktu w naczyniu zbierającym. Stwierdzono, że planowany półokres aktywności układu wynosi około 42 dni.

Analiza układu przed użyciem go wykazała zdolność adsorpcyjną 381 IGIU/g. Stanowi to 17,8% aktywności całości IGIU poddanych działaniu nośnika. Analiza reakcyjnego roztworu enzymatycznego w ilości 28,5 ml wykazała 161 IGIU/ml, a aktywność w reakcyjnym roztworze enzymatycznym wynosiła około 19,4%. Wartość pH w kolumnie utrzymywana była w granicach 7,4–7,8 przez odpowiednie regulowanie pH substratu. Całkowite załadowanie kolumny wynosiło 3810 IGIU.

Przykład III—X. W celu określenia wpływu różnych buforów na półokres aktywności układu przeprowadza się badania w 8 kolumnach. W każdym przypadku izomeraza glikozy adsorbowana była na porowatym tlenku glinowym, o przeciętnej wielkości porów 175 Å i uziarnieniem 0,25–0,71 mm. Użyte enzymy pochodziły z dwóch źródeł. W przykładach III i IV podobnie, jak w przykładach I i II, stosuje się roztwór izomerazy glikozy, pochodzącej z organizmów *Streptomyces* (źródło A). W przykładach V—X stosuje się inny roztwór izomerazy glikozy, zawierający 1000 IGIU/ml, pochodzący z innego organizmu *Streptomyces* (źródło B). Proces adsorpcji prowadzi się według sposobu, opisanego w przykładzie II.

W każdej kolumnie umieszcza się 10 g układu enzymatycznego. 50% roztwór glikozy ze wskazanymi buforami przepuszcza się przez każdą kolumnę z zaznaczeniem początkowej prędkości przepływu, przy czym szybkość przepływu reguluje się okresowo tak, aby otrzymać około 84% stopień przemiany (przy teoretycznym 100%, lub końcowym produkcie glikoza-fruktoza 50–50). 84% przemianę prowadzi się przy zmniejszaniu szybkości przepływu. Wszystkie roztwory substratu i kolumny termostatuje się w 60°C utrzymując stałą wartość pH = 7,8. Ilość enzymu w każdej kolumnie w IGIU/g u-

kładu podano w wartościach średnich przy górnej i dolnej granicy tolerancji, wynoszącej 95%.

W każdym przykładzie podano wydajność adsorpcji enzymu przez nośnik, przy czym wydajność adsorpcyjna odnosi się do stosunku w procentach IGIU zaadsorbowanych na całkowitej ilości nośnika do początkowej liczby IGIU, użytych w procesie adsorpcji.

Uzyskane wyniki ilustruje tablica 1.

Przykład XI. Półokres aktywności enzymatycznego układu z przykładów II—X jest dłuższy od półokresu aktywności układu, składającego się z izomerazy glikozy, połączonej chemicznie z porowatym nośnikiem z powlekanego szkła, stosowanym w podobnych warunkach. Połączoną chemicznie izomerazę glikozy przygotowuje się zgodnie z danymi ujawnionymi w zgłoszeniu patentowym St. Zjedn. Ameryki na 227205 zatytułowanym „Ulepszone nośniki enzymatyczne”. Nośnikiem jest porowate szkło pokryte dwutlenkiem cyrkonu, do którego przyłączono chemicznie enzym ze źródła A. Układ poddano analizie w reaktorze o działaniu okresowym w standardowych warunkach i stwierdzono, że posiada aktywność 1068 IGIU/g. Analizowanym roztworem była glikoza o stężeniu 2 m, zawierająca 0,02 m $MgSO_4$ i 0,001 m $CoCl_2$.

Kolumna, zawierająca 10 g (wagi suchej) powyższego, chemicznie połączonego układu enzymatycznego, działała przez 18 dni w temperaturze 60°C. Przez kolumnę przepuszcza się 50% roztwór glikozy o stałej szybkości przepływu 124–131 ml/godz. Aktywność kolumny w danym okresie czasu oblicza się doświadczalnie przez porównanie ilości wytworzonej fruktozy w procentach przy danej szybkości podawania substratu w specyficznych warunkach kolumny w odniesieniu do aktywności, mierzonej za pomocą standardowej analizy.

Procent fruktozy mierzy się automatycznym polarymetrem Bendixa 12 razy w okresie od 3–431 godzin, notując spadek aktywności układu z 934 do 473 IGIU/g. Stwierdzono, że szacunkowy półokres aktywności wynosi 16,6 dnia z zakresem tolerancji 95 od 14,8–18,8 dnia. W okresie pierwszych 24 godzin substrat składał się z roztworu zawierającego 50% wagowych glikozy oraz 0,005 m $MgSO_4$, 0,004 m Na_2SO_4 i 0,001 m $CoCl_2$, przy pH o wartości 7,8, w następnym okresie czasu skład substratu zmieniono przez wyeliminowanie $CoCl_2$, przy równoczesnym utrzymaniu innych składników na poprzednim poziomie.

Z powyższego porównania widoczne są korzyści stosowania układu, zawierającego izomerazę glikozy, zaadsorbowaną na porowatym tlenku glinowym, ponieważ poza dłuższym półokresem aktywności przygotowanie układu, zawierającego zaadsorbowaną izomerazę glikozy, jest znacznie tańsze ze względu na niższy koszt substancji nośnych.

Przykład XII. Przeprowadzono badania w celu określenia wpływu samego tlenku glinowego na proces przemiany glikozy w fruktozę, ponieważ z opisu pantetowego St. Zjedn. Ameryki nr 3 431 253 wiadomo jest, że granulki tlenku glinowego mogą być stosowane w tym procesie. W badaniach tych

Tablica 1

Przykład	Źródło enzymu	Ilość enzymu w IGIU/g			Wydajność adsorpcji w %	Substraty dodatkowe w molach	Początkowa prędkość przepływu w ml/godz.	Półokres aktywności w dniach
		wartość dolna	wartość średnia	wartość górna				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
III	A	554	573	591	76,5	0,004 MgSO ₄ 0,001 CoCl ₂ 0,004 Na ₂ SO ₃	122	49,0
IV	A	510	563	616	70,8	0,005 MgCl ₂ 0,001 CoCl ₂ 0,004 NH ₄ HCO ₃	122	23,0
V	B	164	206	248	36,5	0,005 MgCl ₂ 0,001 CoCl ₂ 0,004 Na ₂ SO ₃	45	47,0
VI	B	176	192	209	32,3	0,005 MgCl ₂ 0,001 CoCl ₂ 0,004 NH ₄ HCO ₃	38	17,0
VII	B	179	204	229	39,9	0,005 MgCl ₂ 0,004 NH ₄ HCO ₃ Co ⁺⁺	48	18,0
VIII	B	372	407	441	49,2	0,005 MgSO ₄ 0,001 CoCl ₂ 0,004 Na ₂ SO ₃	74	38,0
IX	B	268	398	528	—	0,005 MgCl ₂ 0,004 NH ₄ HCO ₃ Co ⁺⁺	74	23,0
X	B	372	407	441	49,2	0,005 MgSO ₄ 0,001 CoCl ₂ 0,004 Na ₂ HPO ₃ 0,001 Na ₃ PO ₄	36	20,0

stosuje się tlenek glinowy z przykładów II—X. W kolumnie umieszcza się 11 g porowatego tlenku glinowego potraktowanego 0,05 m octanem magnezowym i octanem kobaltowym o stężeniu 0,01 m w temperaturze 60°C przez 15 minut, powtarzając zabieg, mający na celu przygotowanie nośnika przed adsorbcją.

Porowaty tlenek glinowy umieszcza się w kolumnie termostatowej w 60°C. Roztwór, zawierający 0,005 m MgSO₄, 0,004 m Na₂SO₃, 0,001 m CoCl₂ i 50% wagowych glikozy przy pH o wartości 7,8, przepuszcza się przez kolumnę ze stałą prędkością przepływu około 45 ml/godz. Układ, zawierający zaadsorbowaną izomerazę glikozy, analizowany przy 227 IGIU/g w identycznych warunkach, dawał 84% teoretycznej przemiany glikozy w fruktozę. Próbkę wycieku z kolumny, zawierającą tylko tlenek glinowy, pobiera się codziennie i oznacza polarymetrycznie w celu określenia w procentach przemiany glikozy w fruktozę przy użyciu roztworu substratu do nastawienia przyrządu na zero. Kontroluje się również wartość pH produktu. Uzyskane wyniki ilustruje tablica 2.

W celu określenia przemiany w %, spowodowa-

Tablica 2

Dzień	Prędkość przepływu w ml/godz.	Teoretyczny % fruktozy	pH produktu
Pierwszy	43,8	4,8	5,4
Drugi	47,0	0,0	6,4
Trzeci	47,0	0,0	7,5
Czwarty	47,0	0,0	7,5

nej podgrzewaniem wsadu uruchomiono następną kolumnę w 60°C o szybkości przepływu 45 ml/godz., nie zawierającą tlenku glinowego ani enzymatycznego układu. Stwierdzono, że przemiana wynosi 0,5% a pH produktu 7,45. Z powyższych przykładów wynika, że sam tlenek glinowy ewentualnie powoduje nieznaczną przemianę glikozy w fruktozę. Alkaliczna izomeryzacja glikozy do fruktozy przy użyciu rozrobnionego lub porowatego tlenku glinowego wymagałaby więc znacznie dłuższego czasu dla zaistnienia odpowiedniej przemiany.

Sposób przemiany glikozy w fruktozę z zastosowaniem unieruchomionego układu, zawierającego

izomerazę glikozy jest bardzo wydajny i można go stosować na dużą skalę.

Podane przykłady ilustrują sposób według wynalazku.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania fruktozy z glikozy na drodze enzymatycznej, **znamienny tym**, że roztwór glikozy inkubuje się z unieruchomionym układem enzymatycznym, zawierającym izomerazę glikozy, zaadsorbowaną w porach porowatego tlenku glinowego o przeciętnej średnicy porów 100—1000 Å.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór glikozy buforuje się do wartości pH = 7,2—8,2 przed inkubowaniem.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że roztwór glikozy utrzymuje się przy pH o wartości 7,4—8,0.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się układ enzymatyczny umieszczony w kolumnie przepływowej, do której ciągle wprowadza się roztwór glikozy.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że inkubowanie prowadzi się w temperaturze 50°C—70°C.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się izomerazę glikozy, zaadsorbowaną w porach tlenku glinowego o przeciętnej średnicy pora 140—220 Å oraz o uziarnieniu 0,25—0,71 mm.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się układ enzymatyczny, zawierający izomerazę glikozy, pochodzącą z organizmu *Streptomyces*.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się roztwór glikozy, zawierający więcej niż 45% wagowych glikozy.