



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

226164

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 1/00

(22) Přihlášeno 17 06 76
(21) (PV 4010-76)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 17 06 75
(25757/75) Velká Británie

(40) Zveřejněno 29 07 83

(45) Vydáno 15 03 86

(72) Autor vynálezu

BARKER SIDNEY ALAN, SOMERS PETER JOHN, WOODBURY ROBIN ROSS,
BIRMINGHAM, STAFFORD GEOFFREY HARRY, STOCKTON-ON-TEES
(Velká Británie)

(73) Majitel patentu

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, LONDÝN (Velká Británie)

(54) Způsob přeměny aldózy nebo jejího monofosfátu na ketózu nebo její monofosfát

1

Vynález se týká způsobu přeměny aldózy nebo aldózových derivátů na ketózu nebo ketó-zové deriváty v přítomnosti kyslíkatého aniontu, a to zejména přeměny glukózy na fruktózu. mannózy na fruktózu, glukózo-6-fosfátu na fruktózu-6-fosfát, maltózy na maltulózu, galaktó-ry na tagatózu a latózy na laktulózu a ostatních analogických reakcí, jako je přeměna xylózy na xylulózu. Způsob může být prováděn v přítomnosti nebo nepřítomnosti enzymů katalyzujících přeměnu.

Provádí-li se přeměna glukózy na fruktózu v přítomnosti enzymu, glukózoisomerázy, do-sáhne se velmi často rovnováhy, když 50 až 55 % glukózy v reakčním médiu se přemění na fruktózu. Dosud nebylo možné přeměnit glukózu na fruktózu neenzymatickou reakcí bez ved-lejších produktů. Existují četné publikace, například USA patenty č. 2 487 121, 3 432 345, 3 558 355 a 3 514 327 a NSR patent č. 1 163 307, týkající se neenzymatické přeměny glukózy na fruktózu, přičemž všechny popisují způsoby, kde fruktóza je provázena alkalickou degra-dací vznikajícími produkty a jinými nečistotami vznikajícími při čisté chemické a neenzyma-tické reakci.

Proto až do nynějška jakákoli velkovýroba fruktózy byla založena na enzymaticky kataly-zované reakci.

Při enzymatickém procesu přeměny tak, jak vzrůstá podíl fruktózy v enzymatickém reakčním prostředí, klesá rychlost, kterou je fruktóza produkována. Proto v komerčních způsobech pro přeměnu glukózy na fruktózu je fruktózový výtěžek optimalizován vyrovnáním ztráty v reakčním poměru, přičemž podíl fruktózy v reakčním médiu přibývá. Komerčně řízené způ-soby mohou být optimalizovány tak, že vzniká sirup, ve kterém obvykle 40 % glukózy bylo přeměněno na fruktózu. Při většině neenzymatických přeměn glukózy na fruktózu množství přítomné fruktózy po dosažení maxima klesá.

Zřejmě je výhodné zvyšovat podíl glukózy, který může být ekonomicky přeměněn v průběhu reakce na fruktózu.

Toho se může dosáhnout účinným odstraněním fruktózy z reakčního média vmísením činidla, které vytváří silnější komplex s fruktózou než s glukózou, ačkoli komplexační činidlo může mít přídatné vlastnosti, které zvyšují nebo snižují rychlost reakce. Činidly, jež byla navržena k tomuto účelu, jsou borátové sloučeniny, viz Y. Takasagi: Agr. Biol. Chem. 1971, 35/9 1 371 a 1 375 a USA patent č. 3 689 362 (enzymatické reakce) a J. F. Mendicino, J. Amer. Chem. Soc. 82, 1960, 4 975 (chemické reakce).

Také byly navrženy boráty S. A. Barkerem, P. J. Somersem a B. N. Hattem v britském patentu č. 1 369 185 jak pro chemické, tak pro enzymatické reakce. Nevýhodami v těchto předchozích návrzích je, že v případě borátových sloučenin se jedná o sloučeniny toxické, které mohou způsobovat zdravotní riziko, je-li výrobek míněn jako sladidlo v potravinách pro spotřebu lidmi. Nadto v případě benzenboronátu má tato látka omezenou rozpustnost, nemůže vytvářet komplexy v poměru 2:1 (cukr:borát) a vysoké koncentrace fruktózy ve výtěžku nemohou být dosaženy při vysokých hladinách glukózy S. A. Baker, B. W. Hatt a P. J. Somers, Carbohydrates Res, 26, (1973) 41 až 53.

Tak tyto komplexační reakce nevedly o sobě ihned k použití v komerčně vedených způsobech přeměny. Aby byly vyvinuty komerční způsoby, ve kterých je zvýšen podíl fruktózy ve vyráběném sirupu, je nezbytné nalézt komplexační činidlo bez takových nevýhod spojených s jeho použitím.

Předmětem vynálezu je tedy způsob přeměny aldózy nebo jejího monofosfátu na ketózu nebo její monofosfát tak, že se připraví vodný roztok aldózy nebo jejího monofosfátu a v tomto roztoku se podrobí chemické nebo enzymatické isomeraci při použití příslušné isomerázy aldóza nebo její monofosfát na odpovídající ketózu nebo její monofosfát při pH 6 až 10 a při teplotě 25 až 100 °C za přítomnosti komplexotvorného činidla, které vytváří silnější komplex s ketózou nebo jejím monofosfátem než s aldózou nebo jejím monofosfátem s následnou izolací ketózy nebo jejího monofosfátu, vyznačující se tím, že komplexotvorným činidlem je kyslíkatý aniont nebo smíšené komplexní kyslíkaté anionty, vznikající reakcí mezi kyslíkatým aniontem germania nebo cínu s iontem dalšího prvku ze skupiny IV nebo s prvkem ze skupiny V nebo VI. periodického systému.

Vynález je aplikovatelný na široký rozsah přeměn a zejména na ty konverze, jež byly svrchu specifikovány; je nejužitečnější použitelný při přeměně glukózy na mannózu a fruktózu. V průběhu přeměny může být přítomen enzymatický katalyzátor, tam, kde umožňuje použití mírnějších podmínek reakce, nebo mají další výhody, jako je selektivní působení použitého enzymu na pouze jediný isomer (D nebo L) aldózy nebo aldózového derivátu. Provádí-li se enzymaticky katalyzovaná přeměna, enzym může být přítomen v roztoku nebo v imobilizované formě na pevné matrici, kterou může být živá buňka, inaktivovaná buňka nebo další vhodná matrice. Enzym může rovněž být v roztoku. Isomerázový typ enzymu vhodný pro přeměny tohoto typu (příklady jsou vyjmenovány v tabulce A), na který je vynález aplikovatelný, může sestávat z jednoho nebo ze série enzymů zapojených do následných reakcí.

T a b u l k a A

Přeměna	Enzym	Odkaz
1. D-glukóza $\rightleftharpoons$ D-tagatóza	L-arabinóza-isomeráza (D-galaktóza-isomeráza)	J. Biol. Chem. 1971, 246, 5 102 až 5 106
2. L-arabinóza $\rightleftharpoons$ L-ribulóza	jako v 1	jako v 1
3. L-fukóza $\rightleftharpoons$ L-fukulóza	L-fukózo-isomeráza (D-arabinóza-isomeráza)	J. Biol. Chem. 1958, 230, 457

Tabulka A - pokračování

Přeměna	Enzym	Odkaz
4. L-rhamnóza $\rightleftharpoons$ L-rhamulóza	L-rhamnózo-isomeráza	Methods Enzymol., 2, 597 až 582 (1966)
5. L-mannóza $\rightleftharpoons$ L-fruktóza	L-mannózo-isomeráza	Carb Res, 1968, 8, 3 444
6. D-mannóza $\rightleftharpoons$ D-fruktóza	D-lyxózo-isomeráza (D-mannózo-isomeráza)	J. Biol. Chem. 218 (1956) 535
7. D-glukóza $\rightleftharpoons$ D-fruktóza	D-glukózo-isomeráza (D-xylozo-isomeráza)	Biochem. Biophys. Acta, (1969) 178, 376 až 379
8. D-glycero- $\rightleftharpoons$ D-sedoheptu- -D-manno- lóza oza	jako v 6	J. Biol. Chem. 218 (1956) 535
9. D-lykóza $\rightleftharpoons$ D-xyululóza	jako v 6	jako v 6
10. D-xyulóza $\rightleftharpoons$ D-xyululóza	jako v 7	jako v 7
11. L-xyulóza $\rightleftharpoons$ L-xyululóza	L-xyulózo-isomeráza	Fed. Proc. 19 (1960) 82
12. D-arabinóza $\rightleftharpoons$ D-ribulóza	jako v 3	jako v 3
13. D-ribóza- $\rightleftharpoons$ D-ribulózo- -5-fosfát -5-fosfát		J. Biol. Chem. 1957, 226, 65
14. D-arabinóza- $\rightleftharpoons$ D-ribulózo- -5-fosfát -5-fosfát	D-arabinózo-5- -isomeráza	Methods Enzymol., 2, 585 až 588 (1966)
15. D-glyceral- $\rightleftharpoons$ dihydroxy- dehyd-3-fosfát aceton-3-fosfát		Biochem. J. 1968, 107, 775
16. D-galaktózo- $\rightleftharpoons$ D-tagotózo- -6-fosfát -6-fosfát		Biochem. Biophys. Res. Comm, 1973 22, 641 až 647
17. D-glukózo- $\rightleftharpoons$ D-fruktózo- -6-fosfát -6-fosfát		J. Biol. Chem. 1973, 248, 2 219
18. D-mannózo- $\rightleftharpoons$ D-fruktózo- -6-fosfát -6-fosfát		J. Biol. Chem. 1968, 243, 5 410 až 5 419
19. D-glukosamin- $\rightleftharpoons$ D-fruktózo- -6-fosfát -6-fosfát		Adv. Enzymol., 43, 491 (1975)

V této příloze pod termínem ketóza se rozumí ketulóza, viz diskusi o nomenklatuře ketóz v "The Editorial Report on Nomenclature" Journal of the Chemical Society P 5110 (1952).

Komplexační činidlo může být zavedeno do procesu přeměny jakýmkoli vhodným způsobem, tj. jako komplex aldózy a kyslíkatého aniontu nebo jako derivát komplexu aldózy a kyslíkatého aniontu nebo jako sůl nebo jako sloučenina, jako je oxid, který tvoří kyslíkaté anionty nebo smíšené komplexní kyslíkaté anionty za podmínek procesu přeměny. Komplexační činidlo může být rovněž zavedeno jako kyslíkatý aniont, který byl předtím přechováván na polyolu nebo na iontoměničové pryskyřici nebo jiném nerozpustném nosiči, který tvoří chelát s komplexním činidlem nebo obsahuje komplexační činidlo.

Vhodným způsobem se smíšený komplexní kyslíkatý iont vytváří interakcí kyslíkatého aniontu s germaniem nebo cínem s iontem dalšího prvku IV. skupiny nebo s prvkem ze skupiny V. nebo VI. S výhodou kyslíkatý aniont nebo smíšený komplex kyslíkatého aniontu obsahuje germanium.

Zejména vhodnými komplexečními činidly jsou germanátové nebo poly-germanátové ionty, zahrnuté například jako germanát sodný nebo germanium dioxid a použité v roztoku jako imobilizované cheláty nebo jako protiionty iontoměničových pryskyřic. Smíšené ionty jako $[\text{GeO}_2(\text{SO}_4)_2]^{2-}$ nebo jako laktát-germaniová směs (str. 7) mohou být s výhodou v některých případech použity.

Je známo z práce Lindberga a Swana, Acta Chem. Scand. 14 (1960), 1 043 až 1 050, že když jsou elektroforeticky separovány při pH 10,7, fruktózo-germanátové komplexy se velmi liší od glukózo-germanátových, a že první mají více než dvojnásobnou mobilitu proti druhým při 40 °C.

V. A. Nazarenko a G. V. Fyantikova (Zh Neorgan Khim 8, (1963) 2 271, 1 370) citují ionizační konstanty pro glukózu s germanátem $8,3 \times 10^{-6}$ a $1,04 \times 10^{-4}$ pro fruktózu s germanátem. Dále uvádějí konstanty nestálosti pro glukózu s germanátem $3,54 \times 10^{-2}$ a pro fruktózu s germanátem $4,24 \times 10^{-5}$.

Je překvapující, že germanátové ionty mohou být užitečné jako činidla při přeměně glukózy na fruktózu z následujících důvodů:

1. Bylo dokázáno, že germanát existuje jako monogermanátová $\rightleftharpoons$ pentagermanátová $\rightleftharpoons$ heptagermanátová rovnováha, která je posunuta vpravo při zvyšování germaniové koncentrace a vlevo při zvýšení pH nad pH 9 (D. Everest a J. C. Harrison, J. Chem. Soc. 1959, str. 2 178 až 2 182). Pro ekonomické postupy je předností minimální hmotnost germanátové směsi a maximální rychlost přeměny a stejně tak vyhnutí se výrobě vedlejších produktů alkalické degradace.

2. Germaniumdioxid a germanát sodný mají velmi omezenou rozpustnost ve vodě, viz P. J. Antikainen (Suomen Kemistilehti, 33B (1960), 38 až 40). Gulzian a Muller, J. Amer. Chem. Soc. 1932, 54, 3 142 uvádí 31 až 33 mmol/l pro GeO_2 ve vodě. D. A. Everest a J. C. Harrison, J. Chem. Soc. 1959, 2 178 uvádí 870 mmol/l pro germanát sodný.

3. Magnesiové ionty jsou obvykle přítomné v reakčních médiích používaných pro enzymatickou přeměnu glukózy na fruktózu. Magnesium orthogermanát (Mg_2GeO_4) je extrémně nerozpustný ve vodě a používá se při analytickém určování germania, viz J. H. Muller, J. Amer. Chem. Soc., 1923, str. 2 493 až 2 498. Za níže citovaných podmínek neprecipituje z roztoku.

4. Glukózová isomeráza má sterické požadavky pro D-glukózu (K. J. Schray a I. A. Rose, Biochemistry 10 (1971), 1 058 až 1 062) a glukózogermanátový komplex, jenž, jak je známo, se vytváří a může interferovat s enzymatickou reakcí tím, že ji zcela nebo částečně inhibuje. Ve skutečnosti je 1,2-cis-glykol-alfa-D-glukózy vhodnější pro vytvoření komplexu s germanátem než alfa-D-glukóza.

5. Mannóza vytváří mnohem pevnější komplex s germanátem než glukóza (P. J. Antikainen, Acta Chem. Scand., 13, /1959/, 312).

Přeměna glukózy na fruktózu může být uskutečněna čistě chemickou reakcí s použitím germanátových sloučenin nebo cínčitánových komplexů, které posunují pseudoekvilibria popsaná S. A. Barker, B. W. Hatt a P. J. Somers (Carb. Res. 26, /1973/, 41 až 53). S výhodou se však provádí jako enzymaticky katalyzovaná reakce v přítomnosti glukózoisomerázy. Jakýkoli glukózoisomerázový enzym může být použit při přeměně, ale tyto enzymy se liší co do svého optima pro pH a teplotu.

Vhodné isomerázy zahrnují enzymy získané z rodu Aerobakter, Pseudomonas, Lactobacillus (K. Yamanaka, Agr. Biol. Chem. 27, 1963, 265 až 270), Streptomyces, Curtobacterium (jak je popsáno v britském patentu č. 1 328 970). Glukózové isomerázy z termofilních mikroorganismů rodu Thermoactinomyces, Thermopolyspora, Thermomonospora a Pseudomonocardia, jak jsou popsány

v japonském patentovém spisu č. 74/30 588, jsou rovněž vhodné. Některé ze svrchu uvedených glukózoisomeráz vyžadují ke své účinnosti kobaltové ionty.

Přeměna glukózy na fruktózu může být provedena kontinuálně průchodem roztoku s obsahem glukózy sloupcem, který obsahuje imobilizovaný enzym nebo jiný katalyzátor. S výhodou se enzym imobilizuje tak, že je obsažen ve flokulovaných celých buňkách způsobem, popsaným v britském patentu č. 1 368 650. Komplexotvorné činidlo, například sloučeniny germania nebo cínu, může být přítomno v roztoku, který prochází sloupcem nebo v imobilizovaném enzymu nebo jiném katalyzátoru ve sloupci. V tomto případě je výhodné plnit sloupec materiálem, v němž je činidlo dispergováno nebo jej plnit střídavě vrstvami imobilizovaného enzymu a reakčního činidla při použití sítí nebo mřížek k oddělení těchto vrstev. Je-li reakční činidlo přítomno ve sloupci, jde o jeho nerozpustnou formu, například gel jako zeolit nebo o anorganický nebo organický derivát polymeru.

Po přeměně glukózy ve fruktózu je možno fruktózu ze směsi obsahující komplexotvorné činidlo izolovat jako takovou nebo spolu s glukózou. Produktem je tedy glukóza, glukózo-fruktózový sirup nebo fruktóza i glukózofruktózový sirup. Komplexotvorné činidlo lze oddělit jako takové, spolu s glukózou nebo spolu s glukózou a komplexně vázaným podílem glukózy a vrátit do počáteční fáze postupu. Oddělení je možno provést jakýmkoli vhodným způsobem, zejména následujícími dvěma metodami:

a) Je možno nechat počáteční produkt konverze glukózy na fruktózu procházet sloupcem s obsahem iontoměniče spolu s ionty kovů II. skupiny periodické soustavy a s obsahem vodíku. Tím se rozdělí počáteční produkt na fruktózu, která se odvádí jako výsledný produkt a glukóza spolu s komplexotvorným činidlem se přivádí zpět. Kovem II. skupiny je s výhodou vápník.

b) Je možno nechat projít počáteční produkt přeměny glukózy na fruktózu nejprve sloupcem s obsahem kationtoměniče spolu s kationty I. a II. skupiny periodické soustavy, s výhodou s obsahem sodných iontů. Tím se počáteční produkt rozdělí na dvě části, a to na

- i) sirup s obsahem glukózy a fruktózy a na
- ii) fruktózu s komplexotvorným činidlem.

První podíl se odstraní a druhý podíl se nechá projít sloupcem stejně jako ve stupni a) k oddělení fruktózy od komplexotvorného činidla, které se přivádí zpět.

Při provádění způsobu a) i b) je pryskyřicí s výhodou na jádře sulfonovaný polystyrenový kationtoměnič s obsahem činidla pro tvorbu příčných můstků.

Je možno užít i jiných způsobů k oddělení fruktózy s komplexotvorným činidlem, například rozrušení komplexu s obsahem fruktózy použitím polymeru s obsahem dlouhého řetězce cis-hydroxylových skupin, vázaných terciárním atomem dusíku k polystyrendivynylbenzenové mřížce (Boratorb-Calbiochem. Ltd.). V případě, že se reakce provádí s komplexotvorným činidlem v roztoku v reakčním prostředí, může být toto reakční činidlo rovněž vráceno do výchozího stupně. Germanát, vázaný na Boratorb je možno vymýt zásadou nebo kyselinou. Všechny tyto stupně je možno vynechat v případě, že se komplexotvorné činidlo užíje v imobilizované formě.

Přeměna glukózy na fruktózu se s výhodou provádí enzymaticky a kontinuálně při použití sloupce vyvločkových celých buněk s obsahem enzymu, jak bylo popsáno svrchu. V případě, že je reakční činidlo přítomno v materiálu, přiváděném do sloupce, má koncentraci 200 až 800 mmol/l, s výhodou 500 až 600 mmol/l. Reakční prostředí, přiváděné do sloupce s výhodou obsahuje 30 až 50 hmotových % glukózy ve vodném roztoku a reakce se řídí tak, že koncentrace fruktózy ve vytékajícím roztoku je 40 až 85 %, s výhodou 75 až 80 %. Reakční prostředí má pH 6 až 10 s optimem při 8,0 a zejména při 7,8. Tato hodnota se poněkud mění podle typu enzymu, uvedené hodnoty se týkají enzymu z *Arthrobacter*. Teplota vhodná k provádění postupu

se pohybuje v rozmezí 50 až 100, s výhodou 45 až 80 °C. Eluát má obvykle nižší pH, protože vznikající fruktóza vytváří komplex s kyslíkatým aniontem.

Kromě glukózy a germanátových iontů může reakční prostředí s výhodou obsahovat ještě další složky, a to zejména ionty Mg^{++} v koncentraci 4 mmol/l s chloridovými ionty v ekvivalentní koncentraci a NaOH k úpravě pH.

Pro další enzymatické reakce, například při použití fosfoglukózoisomerázy, která převádí glukózo-6-fosfát na fruktózo-6-fosfát s nejvyššími výtěžky při teplotě 25 °C při použití germanátu, jsou reakční podmínky velmi odlišné a je nutno je stanovit zvlášť pro každý enzym. Glukózoisomerázu je možno užít také pro přeměnu D-xyulózy na D-xydulózu. Tato metoda je výhodná zejména pro dosažení vyšších výtěžků xydulózy, zvláště při použití germanátu.

Užití germanátových iontů jako komplexotvorného činidla je výhodnější než užití borátů proto, že germanát tvoří pevnější komplex s fruktózou a je selektivnější. Odpadají také obtíže, spojené s toxicitou sloučenin boru. Na rozdíl od organických sloučenin boru tvoří germanát s fruktózou chelát v poměru 1:2, takže je tento postup také levnější.

Normální optimální pH pro enzym nemusí být optimální pH i pro komplex enzymu a komplexotvorného činidla. Znamená to například, že schopnost snížit pH například glukózoisomerázy bude příznivá pro provádění tohoto postupu. To je neočekávaně pravdivé právě v případě glukózoisomerázy z *Arthrobacter* a u některých dalších důležitých enzymů. Příznivá je i schopnost snižovat teplotu při současně schopnosti zvýšit nebo udržet procentuální výtěžek. To sice není pravdivé v případě glukózoisomerázy z *Arthrobacter*, v tomto případě však hraje úlohu jiná příznivá okolnost. Přidání germanátu totiž značně zvyšuje počáteční reakční rychlost přeměny glukózy na fruktózu, takže se dostatečné přeměny dosáhne v kratší době a tím i levněji. Mimoto germanát nijak nenarušuje stálost uvedené glukózoisomerázy, neboť zmírňuje pokles pH, k němuž při postupném hromadění glukózy za přítomnosti germanátu dochází.

Na obr. 1 je graficky znázorněn vztah procenta glukózy v eluentu ze sloupce s imobilizovanou glukózoisomerázou proti době, kterou přiváděný roztok stráví v minutách ve sloupci.

- Křivka 1: přivádí se roztok fruktózy, obsah germanátu je 600 mM
Křivka 2: přivádí se roztok glukózy, obsah germanátu je 600 mM
Křivka 3: přivádí se roztok glukózy, který neobsahuje germanát
Křivka 4: přivádí se roztok fruktózy, který neobsahuje germanát.

Z grafického záznamu získaných výsledků na obr. 1 je zřejmé výhodnost použití germanátu jako komplexotvorného činidla při provádění způsobu podle vynálezu.

Na obr. 2 je znázorněna změna optické otáčivosti v % jako výsledek tvorby komplexu v závislosti na pH.

- Křivka 1: komplex s fruktózou
Křivka 2: komplex s glukózou
Křivka 3: komplex s mannózou

Jak je zřejmé, bylo u fruktózového komplexu zjištěno nižší pH než pro glukózový a mannózový komplex.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

Enzymatická přeměna glukózy na fruktózu

Byl připraven sloupec o délce 32 cm a vnitřním průměru 0,4 cm, naplněný neporušenými vyvločkovými buňkami s obsahem glukózoizomerázy. Tímto sloupcem procházely vodné roztoky glukózy s různou koncentrací glukózy, hořčičkových iontů a germanátových iontů. Odpovídající roztoky bez germanátu byly užity jako kontrolní roztoky. Procentuální přeměna glukózy na fruktózu v eluátu ze sloupce byla měřena na přístroji Autoanalyser při použití resorcinolové metody. Reakce byla prováděna při počátečním pH 8,5 a teplotě 60 °C a při koncentraci 0,004 mol/l chloridu hořečnatého ve vodných roztocích glukózy.

Při přípravě glukózových roztoků o koncentraci 100 mmol/l bylo nutno zabránit, aby germanátové ionty nezpůsobily vysrážení hořečnatých iontů z roztoku. Z tohoto důvodu byly germanátové ionty vždy přidány ke glukózovým roztokům těsně před vstupem do sloupce, ale ještě před přidáním chloridu hořečnatého, protože hořčík se nevysráží v přítomnosti komplexu glukózy a germanátových iontů, který je již v roztoku vytvořen. Roztoky s obsahem germanátových iontů byly připravovány tak, že byl uveden v suspenzi ve vodě kysličník germaničitý, načež byl přidán koncentrovaný roztok zásady až do dosažení pH 10,5 a pak teprve roztok glukózy a nakonec chlorid hořečnatý. Nakonec byl roztok upraven na pH 8,5, čímž současně došlo k jeho vyčeření.

V případě přípravy roztoků s obsahem 200 molů germanátových iontů nebo s ještě vyšším obsahem těchto iontů byl postup prováděn tak, že kysličník germaničitý byl přidán k roztoku glukózy o koncentraci 1 mol/l, přičemž byla přerušovaně přidávána zásada až do pH 8,5, takže germanát pomalu přecházel do roztoku. Po přidání chloridu hořečnatého se roztok slabě zakalil, avšak eluát ze sloupce byl naprosto čistý.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce I.

T a b u l k a 1

Koncentrace glukózy (mmol/l)	Koncentrace germanáto- vých iontů (mmol/l)	% přeměny glukózy na fruktózu	pH eluátu	Rychlost průtoku ml/min
0,528	0	59	n.a.	0,12
0,528	25	75	n.a.	0,12
4,65	0	57	8,3	0,10
4,58	25	82	8,1	0,10
122	0	47,5	7,0	0,11
118	25	80,5	6,8	0,11
337	0	44,5	6,8	0,11
270	25	63	6,7	0,11
259	0	46 ⁺	6,5	0,11
265	25	53	6,3	0,11
300	50	52	6,0	0,11
284	100	59,5	6,4	0,11
275	200	72,5 [*]	7,2	0,11

⁺ 55,5 % při rovnovážném stavu

^{*} 82 % při rovnovážném stavu (koncové pH 6,5)

Jak je zřejmé z tabulky 1, došlo za přítomnosti germanátových iontů vždy k vzestupu koncentrace fruktózy ve srovnání s obdobnými roztoky bez přítomnosti germanátových iontů.

Příklad 2

Enzymatická přeměna glukózy na fruktózu

Byl opakován postup podle příkladu 1 při použití sloupce s obdobnými rozměry, tj. 30 cm délky a 0,4 cm vnitřního průměru, přičemž byl sledován vliv stoupající koncentrace glukózy. V tomto případě byla rychlost průtoku snížena na 0,03 ml/min. tak, aby roztok zůstal ve sloupci 125 minut, takže bylo dosaženo rovnovážného stavu po dobu několika hodin a bylo možno stanovit podmínky, které vedou ke vzniku tohoto rovnovážného stavu. Po vzniku směsi byla vždy stanovena koncentrace glukózy, aby bylo možno provést opravu na přítomnost zásady a hořčnatých solí.

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Počáteční koncentrace glukózy g/100 ml roztoku	Koncentrace germanátových iontů (mmol/l)	Koncentrace fruktózy g/100 ml roztoku	% přeměny
47,4	0	25,6	54,0
45,6	364	32,0	70,0
43,7	524	35,0	80,0
43,5	696	36,5	84,0
50,0	800	39,7	79,4

Jak je zřejmé z tabulky 2, zvyšují germanátové ionty podstatným způsobem přeměnu glukózy na fruktózu.

Množství fruktózy bylo stanoveno Chaplin-Kennedyho metodou (Carbohydrate Res., 1975, 40, 22 až 33). Při tomto způsobu provedení se získají o něco vyšší výsledky než při resorcinolové metodě, která byla ke stanovení fruktózy užita ve všech následujících příkladech.

Další pokus byl proveden při použití resorcinolové metody (Carbohydrate Res., 1975, 26, 41) a při použití sloupce týchž rozměrů při teplotě 60 °C a pH 8,5. Při různých průtokových rychlostech byly získány následující výsledky.

Rychlost průtoku (ml/min)	Přiváděný materiál (vždy s 4 mmol/l $MgCl_2$)	
	51,2 g/100 ml glukózy	47,8 g/100 ml glukózy + 800 germanátu
0,015	53	74
0,030	42,5	69
0,050	36	50

Produkt při počáteční koncentraci glukózy 43,5 % ze svrchu uvedené tabulky 2 byl frakcionován na aniontoměniči Jeol v borátové formě při použití gradientové eluce borátovými pufrý (0,13 mol/l borát o pH 7 a 0,35 mol/l borát o pH 9,8), čímž bylo dosaženo oddělení glukózy

a fruktózy. Totéž dělení bylo prováděno po oddělení germanátu I na sloupci přípravku BORA-SORB. Poměr glukózy a fruktózy se pohyboval v rozmezí 3,31:1 bez předchozího odstranění germanátu. Fruktóza a glukóza byly stanoveny metodou s užitím cysteinu a kyseliny sírové.

Příklad 3

Chemická přeměna glukózy na fruktózu

Čistě chemická přeměna glukózy na fruktózu za přítomnosti germanátových iontů byla sledována tak, že byl zahříván roztok s obsahem 50 % glukózy, 4 mmol/l hořečnaté soli a 600 mmol/l germanátových iontů na 60 °C při pH 8,5. Bylo dosaženo následujících koncentrací fruktózy po různých reakčních dobách.

Čas (min)	% fruktózy
90	3,3
135	4,6
180	5,7

Pokus byl opakován při teplotě 90 °C a při koncentraci glukózy 48,8 až 50 % a koncentraci germanátových iontů 600 až 582 mmolu. Procentuální přeměna glukózy na fruktózu po různých reakčních dobách je uvedena v tabulce 3. Fruktóza byla stanovena resorcinolovou metodou. V průběhu pokusu byl přítomen v zahříváném sirupu dusík. Ve všech případech došlo k poklesu počátečního pH, měřeného při teplotě 310 °C a bylo nutno pH vyrovnávat.

Tabulka 3

48,4 (g/100 ml roztoku) glukózy, počáteční pH 7,0 bez $MgCl_2$ 582 mmol/l germanát		50 (g/100 ml roztoku) glukózy počáteční pH 7,5 bez $MgCl_2$ 600 mmol/l germanát		50 (g/100 ml roztoku) glukózy, počáteční pH 8,0 bez $MgCl_2$ 600 mmol/l germanát	
čas h	% přeměny na fruktozu	čas h	% přeměny na fruktozu	čas h	% přeměny na fruktozu
0,5	2,0	0,5	4,3	0,5	9,1
1,0	3,8	1,0	8,2	1,0	12,5
1,5	4,7	1,5	9,7	1,5	14,4
2,5	6,8			2,0	15,2
3,0	7,4	3,0	12,6	3,5	15,4
3,5	7,8	3,5	12,6	3,5	15,4
				(pH 6,74)	
4,0	8,3			4,0	18,3
4,5	8,7	6,0 (koncové pH 6,37)	12,2	4,5	18,3

Podobné pokusy byly provedeny za přítomnosti $MgCl_2$. Výsledky, dosažené resorcinolovou metodou jsou uvedeny v tabulce 4.

Následující výsledky, získané za přítomnosti 1,245 mmol/l glukózy, 600 mmol/l germanátu a 4 mmol/l chloridu hořečnatého ukazují důležitost poměru mezi glukózou a germanátovými ionty.

čas (h)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	(pH 7,48)
% přeměna na fruktózu	19,8	31,6	36,2	38,6	38,6	
čas (h)	3,66	4,33	6	6,5		
% přeměna na fruktózu	46,1	48,5	48	45		

Produkt, který byl získán v průběhu několika hodin, byl rozdělen na borátovém sloupci po předchozím odstranění germanátových iontů i bez tohoto odstranění. Byl získán v obou případech týž výsledek 39,7 % fruktózy.

T a b u l k a 4

50 g/100 ml glukózy, počáteční pH 8 0,004 mol/l MgCl ₂ 600 mmol/l germanátu		50 g/100 ml glukózy, počáteční pH 8,5 0,004 mol/l MgCl ₂ 600 mmol/l germanátu		50 g/100 ml glukózy počáteční pH 9,0 0,004 mol/l MgCl ₂ 600 mmol/l germanátu	
čas hod	% přeměna na fruktózu	čas hod	% přeměna na fruktózu	čas hod	% přeměna na fruktózu
		0,5	19,5	0,5	30,3
		1,0	28,5	1,0	35,2
2,17	16,9			2,0	35,7
2,83	19,0	2,83	29,8	2,33	36,7
3,33	18,8	3,33	27,2	2,67	
		(pH 6,42)		(pH 6,98)	
4,0	18,0			3,33	35,8
(pH 6,37)					
4,5	22,1	4,5	34,3	3,67	36,2
4,83	23	5,0	35,5		
5,33	22,7				

Při použití roztoku s obsahem glukózy 55 g/100 ml roztoku, 600 mmol/l germanátu, 0,004 mol/l MgCl₂ při zahřátí na teplotu 90 °C a při počátečním pH 7,5 po 6 hodinách bylo dosaženo přeměny glukózy na fruktózu v rozsahu 13,7 %, jak bylo zjištěno resorcinolovou metodou.

Chemická přeměna glukózy na fruktózu probíhá velmi pomalu při nízkých koncentracích germanátových iontů a při teplotě 90 °C a pH 8,5 bez přidání chloridu hořečnatého.

100 mmol/l glukózy 10 mmol/l germanátu		20 mmol/l glukózy 10 mmol/l germanátu		20 mmol/l glukózy 20 mmol/l germanátu	
čas	% přeměny	čas	% přeměny	čas	% přeměny
0,5	3,5	0,5	4,3	0,5	4,3
1	7,6	1	8,5	1	8,5
1	10,7	1,5	11,7	2	15,5
2,67	18,2	2,5	18,7		
3 ⁺	18,8	3 ⁺	19,8		
(pH 8,16)		(pH 7,78)			
3,5	21,5	3,5	25,3	3 ⁺ pH 8,22	19,8
4	24,2	4	29,1	3,5	20,4
				4	25,6
4,5	25,6				

T a b u l k a - pokračování

100 mmol/l glukózy 10 mmol/l germanátu		20 mmol/l glukózy 10 mmol/l germanátu		20 mmol/l glukózy 20 mmol/l germanátu	
čas	% přeměny	čas	% přeměny	čas	% přeměny
5	27,5	5 ⁺ (pH 7,8)	33,4	5	29,7
5,5	29,1			5,8 (pH 8,0)	32,2
6	30,3	6	36,8	6	33,5
7	31,8			7	37,3
7,5 ⁺ (pH 7,82)	31,9	7,5	39,7		
8,5	33,4	8	40,6	8	39,4
9	34,6	9	40,6	9	38,9

⁺ pH 8,5

P ř í k l a d 4

Přeměna glukózy na fruktózu při použití rozpustné glukózoisomerázy

Počáteční reakční rychlost při použití 200 mikrolitrů glukózoisomerázy v rozpustné formě při teplotě 60 °C a pH 8,5, přičemž substrátem byla D-glukóza v koncentraci 0,5 mM při přidání 4 mmol/l chloridu hořečnatého a 0,5 mmol/l chloridu kobaltnatého v sérii roztoků po 25 ml s obsahem různého množství germanátu. Roztoky byly analyzovány automatizovanou resorcinolovou metodou. Bylo užito následujících typů roztoků:

1. bez germanátu, 6,25 mikrogramů fruktózy/min/ml enzymu.
2. 0,5 mmol germanátu, 8,75 mikrogramů fruktózy/min/ml enzymu.
3. 25 mmol germanátu, 15 mikrogramů fruktózy/min/ml enzymu.

Bylo stanoveno i procentuální množství přeměny v průběhu 21 hodin. V roztoku 1 - přeměna 43 %, v roztoku 2 - 51 % a v roztoku 3 - 62 %.

P ř í k l a d 5

Přeměna mannózy na fruktózu

Roztok s obsahem 50 g/100 ml mannózy, 4 mmol/l chloridu hořečnatého a 600 mmol/l germanátu byl zahříván na teplotu 90 °C při pH 8,5. Koncentrace fruktózy při stanovení resorcinolovou metodou byly následující:

Tabulka 5

Čas (min)	% přeměna na fruktózu
30	3,44
60	6,42
120	13,4
150	15,4
170 (pH 7,25, upraveno na pH 8,5)	15,9
260	20,4
280	20,6

Příklad 6

Přeměna glukózo-6-fosfátu na fruktózo-6-fosfát

Způsobem podle příkladu 1 byla provedena řada pokusů při použití 0,5 mmol/l roztoku glukózo-6-fosfátu s různým množstvím germanátu. Pokusy byly prováděny při teplotě 25 °C při různém pH. Použitý enzym byl enzym Sigma Grade III z kvasnic ve formě krystalické suspenze a byl ředěn 200x a dialyzován proti destilované vodě k odstranění pufru těsně před použitím. Získaný fruktózo-6-fosfát byl stanoven resorcinolovou metodou.

Procentuální přeměna je uvedena v tabulce 6.

Tabulka 6

Koncentrace germanátových iontů mmol/l	% přeměny (pH)							
	10,5	10,0	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0
200	84	86	84	63	56	48	36	30
100	81	81	77	68	48	40	36	32
50	82	81	77	62	48	40	33	29
25	89	81	78	60	50	39	29	23
12,5	76	69	64	56	40	29	25	22
6,25	62	55	48	40	32	25	23	22
0					23			22

Z tabulky je zřejmé, že procento přeměny stoupá s množstvím germanátových iontů.

Příklad 7

Stabilita enzymatické přeměny glukózy na fruktózu

Sloupcem, obdobným sloupci z příkladu 1, se nechá projít roztok s obsahem 41,2 % glukózy, 600 mmol/l germanátu a 4 mmol/l chloridu hořečnatého při počátečním pH 7,0. Koncové pH a % přeměny na fruktózu se měří v různých časových intervalech. Pokus byl rozdělen na tři časové úseky.

Po prvním úseku trvajícím 43 hodin byl roztok vyčištěn k odstranění slabého zákalu, který se tvoří po delší době v roztoku glukózy a germanátu. Po druhém období, které trvalo od 43 do 102 hodin, bylo pH roztoku zvýšeno na 7,8 s velmi dobrým výsledkem. Po delším

průchodu sloupcem pokleslo významně pH eluátu. Je zřejmé, že je možno udržet % přeměny vyšší než 70 % po delší dobu v případě, že se pH eluátu udržuje na hodnotě alespoň 7,0 nebo jen o málo nižší. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7A.

T a b u l k a 7A

Čas hod	Počáteční pH	Koncové pH po průchodu enzymem	% přeměny na fruktózu
2	7,0	6,6	67,2
17	7,0	5,6	61,5
43	7,0	5,5	60,8*
54	7,0	5,8	64,9
102	7,0	5,7	65,5**
126	7,8	6,9	76,5
150	7,8	6,9	78,3
174	7,8	6,9	76,5
198	7,8	6,8	71,6

* na konci prvního časového úseku - následovalo vyčerení převáděného roztoku

** na konci druhého období - došlo ke vzestupu počátečního pH

Vliv teploty na stabilitu reakce v delším časovém úseku je uveden v tabulkách 7B a 7C při použití obdobného sloupce jako v příkladu 1. V tabulkách jsou uvedeny reakční podmínky. V tabulce 7B bylo přeměny dosaženo až po rovnovážném stavu, kdežto v tabulce 7C od počátku. V obou případech je zřejmý kumulativní efekt.

T a b u l k a 7B

44 g/100 ml glukózy + 4 mmol/l $MgCl_2$ + 600 mmol/l germanátu pH 7,1
Rychlost průtoku 0,05 ml/min enzymem

Teplota °C	Datum	% přeměny na fruktózu (enzym byl promyt před 2 dny)
55	26. 11. 75	69,2
60	26. 11. 75	73,4
65	26. 11. 75	75,1
70	27. 11. 75	71,5
75	27. 11. 75	72,1
80	27. 11. 75	75,0
85	27. 11. 75	60,5

T a b u l k a 7C

44 g/100 ml glukózy + 4 mmol/l $MgCl_2$ + 600 mmol/l germanátu pH 7,1
rychlost průtoku 0,16 ml/min sloupcem enzymu

Teplota °C	Datum	% přeměny na fruktó- zu (enzym byl promyt před 14 dny)	Průchod sloupcem při určité teplotě (hod)	Celková doba prů- chodu roztoku sloupcem (hod)
55	8. 12. 75	22,7	1 1/2	1 1/2
60	9. 12. 75	30,1	1 1/2	3
65	9. 12. 75	31,8	1 1/2	4 1/2
70	9. 12. 75	34,1	1 1/2	6
75	9. 12. 75	35,8	2 1/2	8 1/2
80	9. 12. 75	32,4	2	10 1/2
85	9. 12. 75	25,6	1 1/2	12

P ř í k l a d 8

Chemická přeměna cukrů

a) Přeměna glukózy na fruktózu

Roztok glukózy o koncentraci 55 až 60 % byl připraven s přísadou 600 mM germanátu nebo bez této přísady. Okamžitě po přípravě byly odebrány podíly o velikosti 50 mikrolitrů, tyto podíly byly ředěny na 5 ml a pak byly skladovány při teplotě $-20^{\circ}C$ do analýzy.

Sirupy pak byly uloženy do zezátkovaných lahví do lednice při teplotě $4,5^{\circ}C$. Pak byly láhve denně protřepávány v časových intervalech, uvedených v tabulce 8A. Všechny roztoky byly analyzovány dělením na iontoměniči s boritanovými ionty a získané vrcholy byly podrobeny stanovení s automatizovanou metodou při použití cysteinu a kyseliny sírové. (Anal. Bioch., 26, 219, 1968). Bylo zjištěno, že roztoky s obsahem germanátu měly bělavou barvu, a to v průběhu celého období, uvedeného v tabulce 8A, kdežto roztoky bez obsahu germanátu rychle zezelenaly a toto zbarvení se prohlubovalo v průběhu skladování.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8A.

T a b u l k a 8A

Doba skla- dování (dny)	Roztok s obsahem germanátu		Roztok bez germanátu	
	fruktóza g/100 ml	glukóza zbytek g/100 ml	fruktóza g/100 ml	glukóza zbytek g/100 ml
0	2,1	51,8	2,2	48,7
14	17,8	40,3	8,9	44,6
23	25,0	34,2	11,1	35,2
27	-	-	11,1**	35,6
31	31,9*	26,9	-	-

* ekvivalentní 54% přeměny ze přítomnosti pouze 3,1 % mannózy,

** bylo přítomno 5 % mannózy.

b) Byl sledován i vliv inkubace při pH 12 a teplotě 5 °C za přítomnosti a v nepřítomnosti germanátových iontů při použití celé řady cukrů. Výsledky získané při zásaditém pH jsou uvedeny pro fruktózu, mannózu, maltózu a 3-O-methyl-D-glukózu v tabulkách 8B, 8C a 8E. Ve všech těchto případech měl germanát dva účinky, a to a) oddaluje rozpad cukrů a b) mění rovnovážný stav směsi. V tabulkách nedávají údaje dohromady 100 %, protože dochází k rozkladu.

Tabulka 8B

Počáteční koncentrace	52,1 g/100 ml		50,5
D-fruktózy s germanátem	0		g/100 ml 600 mmol/l
složky (%)	17 dní	30 dní	17 dní
D-glukóza	36,4	42,3	18,1
D-mannóza	22,8	24,3	26,7
D-fruktóza	27,8	21,2	51,2
neznámá složka a	+++	+++	+
neznámá složka b	++++	++++	+

Tabulka 8C

Počáteční koncentrace	51,14 g/100 ml		53,3 g/100 ml	
D-mannózy s germanátem	0		600 mmol/l	
složky (%)	17 dní	30 dní	17 dní	30 dní
D-mannóza	79,3	53,4	60,2	27,45
D-fruktóza	13,65	18,3	32	44,4
neznámá složka 1	+	++	-	-
neznámá složka 2	+	+++	-	-
D-glukózy	7,2	18,8	7,1	13,36

Tabulka 8D

Počáteční koncentrace	59 g/100 ml		58,7 g/100 ml	
maltózy s germanátem	0		358 mmol/l	
složky (%)	15 dní	27 dní	15 dní	27 dní
maltóza	38,3	26,5	48,5	13,9
maltulóza*	24,5	21,5	51,9	67,9
fruktóza	2,4	4,39	-	++
glukóza	22,1	22,8	stopa	9,3

* počítáno přes molekulovou hmotnost s 0,5 moly glukózy + 0,5 moly fruktózy

T a b u l k a 8E

Počáteční koncentrace	41,8	58,7
3-O-methyl-D-glukózy*	g/100 ml	g/100 ml
s germanátem	0	464 mmol/l
složky	15 dní	15 dní
3-O-methylfruktóza**	18,5	29,7
3-O-methylglukóza	36,1	46

* nestálá v alkalickém prostředí

** s ohledem na fruktózu

P ř í k l a d 9

Enzymatická přeměna xylózy na xylulózu

Roztok xylózy obsahoval 44 g/100 ml xylózy a 4 mmoly chloridu hořečnatého. Tento roztok byl po úpravě pH na 7,0 nanesen na sloupec s obsahem glukózoisomerázy, tj. téhož enzymu, který byl užít v předchozím příkladu pro enzymatickou přeměnu glukózy na fruktózu.

Teplota sloupce byla 60 °C a rychlost průtoku 0,05 ml za minutu. Obdobným způsobem byl týmž sloupcem při pH 7,0 proháněn roztok, který obsahoval 44 % xylózy, 4 mmoly/l chloridu hořečnatého a 600 mmolů/l germanátových iontů.

Po 2 hodinách byly odebírány frakce a tyto frakce byly dále děleny na sloupci iontoměničové pryskyřice v borátové formě. Pro srovnání byl obdobným sloupcem dělen i roztok xylózy, který byl užít jako standard. Eluát ze sloupce byl automaticky analyzován na pentózy metodou s použitím cysteinu a kyseliny sírové. Tento roztok reaguje také s pentulózami a z tohoto důvodu byl zřejmý i podíl xylulózy.

Protože standardní roztok xylulózy pro kalibrační účely není dosud dostupný, byl stupeň reakce posuzován srovnáním ploch pod jednotlivými vrcholy. Tímto způsobem byl proveden odhad, že poměr xylulózy k celkovému množství xylózy a xylulózy byl 41:100, v případě germanátových iontů 58:100.

P ř í k l a d 10

Přeměna glukózy na fruktózu při použití iontů cínu

Na vrchol sloupce s obsahem glukózoisomerázy byly stejně jako v předchozích příkladech naneseny dva roztoky, které obsahovaly 44,6 % glukózy a 4 mmoly/l chloridu hořečnatého při pH 8,5. Jeden z těchto roztoků neobsahoval ionty cínu, druhý roztok obsahoval 600 mmolů/l $\text{Na}_2\text{SnO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9

Čas hod	% přeměny na fruktózu bez cíníčitenu	% přeměny na fruktózu (600 molů/l cíníčitanu)	
		a	b
1	-	-	59,4
2	-	-	56,6
3	42,6	53,3	-
4	-	-	56,1

Vzorky odebrané ze sloupce po smíšení s dalším podílem glukózy již nebyly schopny převádět glukózu na fruktózu, což znamená, že se aktivní glukózoisomeráza nevymývala ze sloupce.

Příklad 11

Enzymatická přeměna glukózy na fruktózu

Vliv pH a množství germanátu

a) Byly provedeny dvě série pokusů, přičemž byl užit sloupec s obsahem glukózoisomerázy o délce 31 cm a vnitřním průměru 4 cm, obdobný sloupci z předchozích příkladů. V každé sérii byly porovnávány výsledky, které byly získány při použití roztoků s obsahem glukózy a 4 mmolů chloridu hořečnatého bez germanátu a za přítomnosti 600 mmolů/l germanátu. Rychlost průtoku sloupcem byla 0,05 ml za minutu a teplota enzymu 60 °C. Počáteční pH roztoku se pohybovalo u různých pokusů na různých hodnotách, přičemž bylo měřeno koncové pH eluátu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10

Série pokusů	Počáteční pH	Pořadí analýzy	Počáteční koncentrace glukózy g/100 ml	Koncentrace germanátu (mmol/l)	% přeměny na fruktózu	Koncové pH eluátu
1	7	3	48	0	48,2	-
1	6,9	8	47	0	49,6	7,2
1	8,5	1	49,2	0	49,2	-
1	8,5	2	49,3	0	49,2	-
1	7	5	40,2	600	76,5	7,0
1	7	6	40,0	600	70,3	6,9
1	8,5	4	38,2	600	74,6	7,2
1	8,3	7	40,0	600	72,5	6,6
1	8,3	9	37,0	600	71,2	7,0
2	7,0	2	42,0	0	54,0	6,8
2	8,4	1	41,6	0	49,3	7,1
2	8,5	4	44,6	0	54,9	7,0
2	7,1	5	53,4	600	67,4	6,8
2	8,6	3	50,0	600	66,7	6,8

b) Byly provedeny dvě série pokusů při použití obdobného sloupce jako v předchozích příkladech. Na vrchol sloupce byl nanášen roztok s obsahem 50 % glukózy, 4 mmolů/l chloridu hořečnatého a 200 nebo 600 mmolů/l germanátu. Pokusy byly prováděny při různém pH.

Srovnávací pokusy byly prováděny bez přítomnosti germanátových iontů. Ve všech pokusech byly použité roztoky proháněny sloupcem s obsahem imobilizovaného enzymu při průtokové rychlosti 0,05 ml za minutu, doba pobytu roztoku ve sloupci byla 75 minut. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

T a b u l k a 11

pH	Složení eluátu (% fruktózy)		
	bez germanátu	200 mmolů/l germanátu	600 mmol/l germanátu
9,0	51		68
8,5	51	64	69
8,0	49	59	70
7,5	50	60	70
7,0	50	60	70
6,5	39	59	69
6,0		58	
		50	

P ř í k l a d 12

Enzymatická přeměna glukózy na fruktózu - reverzibilita

Byly připraveny roztoky glukózy a fruktózy, které měly koncentraci z tabulky 12. Tyto roztoky byly v případě, že měly obsahovat germanát, připraveny tak, že bylo rozpuštěno odvážené množství kyslíčnicku germaničitého mícháním v malém množství 50% hydroxidu sodného a tento roztok byl pak přidán do roztoku, určeného k rozpuštění cukru. Pak byl k roztoku přidán chlorid hořečnatý do konečné koncentrace 4 mmoly/l a pH roztoků bylo upraveno na 8,5 při teplotě 25 °C.

Roztoky byly potom proháněny rychlostí, uvedenou v tabulce sloupcem s obsahem enzymu o rozměrech 30x0,4 cm při teplotě 60 °C. Po zředění byla stanovena hladina fruktózy v eluátu. Pro kalibraci byly připraveny roztoky o koncentraci 0,55 %, které procházely celým analytickým systémem. Aby bylo možno kontrolovat počáteční hladinu glukózy v nanášeném roztoku, bylo prováděno ředění vzorků i standardů v poměru 2×10^4 ručně a tyto roztoky byly pak analyzovány běžným způsobem, při použití cysteinu a kyseliny sírové. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12 a graficky znázorněny na obr. 1.

Z těchto údajů je zřejmé, že bez přítomnosti germanátových iontů je rovnovážný stav mezi 52 a 53 % fruktózy, a to bez ohledu na to, zda se vychází z roztoků s obsahem glukózy nebo fruktózy. Za přítomnosti 600 mmolů/l germanátu je však rovnovážný stav za týchž podmínek mezi 74 až 79 %, a to opět bez ohledu na to, zda se vychází z roztoku glukózy nebo fruktózy.

T a b u l k a 12

Rychlost průtoku	% uhlohydrátu v roztoku bez germanátu	% uhlohydrátu v roztoku s germanátem	Doba pohybu (min)	Složení eluátu bez ger- manátu	600 mmol/l germanátu	Přiváděný cukr
0,1	54,6	50,5	38	22,5	31,0	glukóza
0,05	51,2	47,8	75	36,0	49,5	
0,03	51,2	47,8	125	42,5	68,5	
0,015	51,2	47,8	251	53,0	74,0	
0,1	55,0	48,2	38	71,0	79,0	
0,05	55,0	48,2	75	55,5	77,5	fruktóza
0,03	55,0	48,2	125	53,5	77,0	
0,015	55,0	48,2	251	52,0	77,0	

P ř í k l a d 13

Enzymatická přeměna glukózy na fruktózu - závislost na koncentraci

Sloupcem glukózoisomerázy, podobným jako v předchozím příkladech, byla při teplotě 60 °C proháněna řada roztoků, z nichž všechny obsahovaly 600 mmolů/l germanátu a 4 mmoly/l chloridu zinečnatého, avšak různé koncentrace glukózy. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

T a b u l k a 13

Koncentrace glukózy v %	% přeměny na fruktózu	Koncové pH
20,6	92,7	7,8
30,0	80,0	7,8
40,0	72,5	7,5
53,4	67,4	6,8*
60,0	65,0	7,5

* z předchozího pokusu

P ř í k l a d 14

Chemická přeměna melibiózy

Chemická přeměna melibiózy (6-O-alfa-D-galaktopyranosyl-D-glukózy) byla studována za přítomnosti a v nepřítomnosti germanátových iontů při pH 12,0 a teplotě 4 °C. Koncentrace melibiózy v počátečním roztoku 51,6 %, koncentrace germanátu 324 mmolů/l. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 14.

T a b u l k a 14

Sloučenina	% cukru po uvedeném počtu dnů				Germanát
	0	15	29	42	
melibióza	92,2	55,5	57,5	49,6	
6-O-alfa-D-galakto- pyranosyl-D- -fruktóza	3,2	9,8	12,8	11,0	-
galaktóza	-	9,9	11,9	12,3	
výtěžek identifi- kovaných produktů	95,4	75,2	82,2	72,9	
melibióza	-	42,7	35,0	25,2	
6-O-alfa-D-galakto- pyranosyl-D- -fruktóza	-	37,8	42,5	31,1	+
galaktóza	-	-	7,9	12,8	
výtěžek identifi- kovaných produktů	-	80,5	85,4	69,1	

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přeměny aldózy nebo jejího monofosfátu na ketózu nebo její monofosfát tak, že se připraví vodný roztok aldózy nebo jejího monofosfátu a v tomto roztoku se podrobí chemické nebo enzymatické isomeraci při použití příslušné isomerázy aldóza nebo její monofosfát na odpovídající ketózu nebo její monofosfát při pH 6 až 10 a při teplotě 25 až 100 °C za přítomnosti komplexotvorného činidla, které vytváří silnější komplex s ketózou nebo jejím monofosfátem než s aldózou nebo jejím monofosfátem s následnou izolací ketózy nebo jejího monofosfátu, vyznačující se tím, že komplexotvorným činidlem je kyslíkatý aniont nebo smíšené komplexní kyslíkaté anionty, vznikající reakcí mezi kyslíkatým aniontem germania nebo cínu s iontem dalšího prvku ze skupiny IV. nebo s prvkem ze skupiny V. nebo VI. periodického systému.

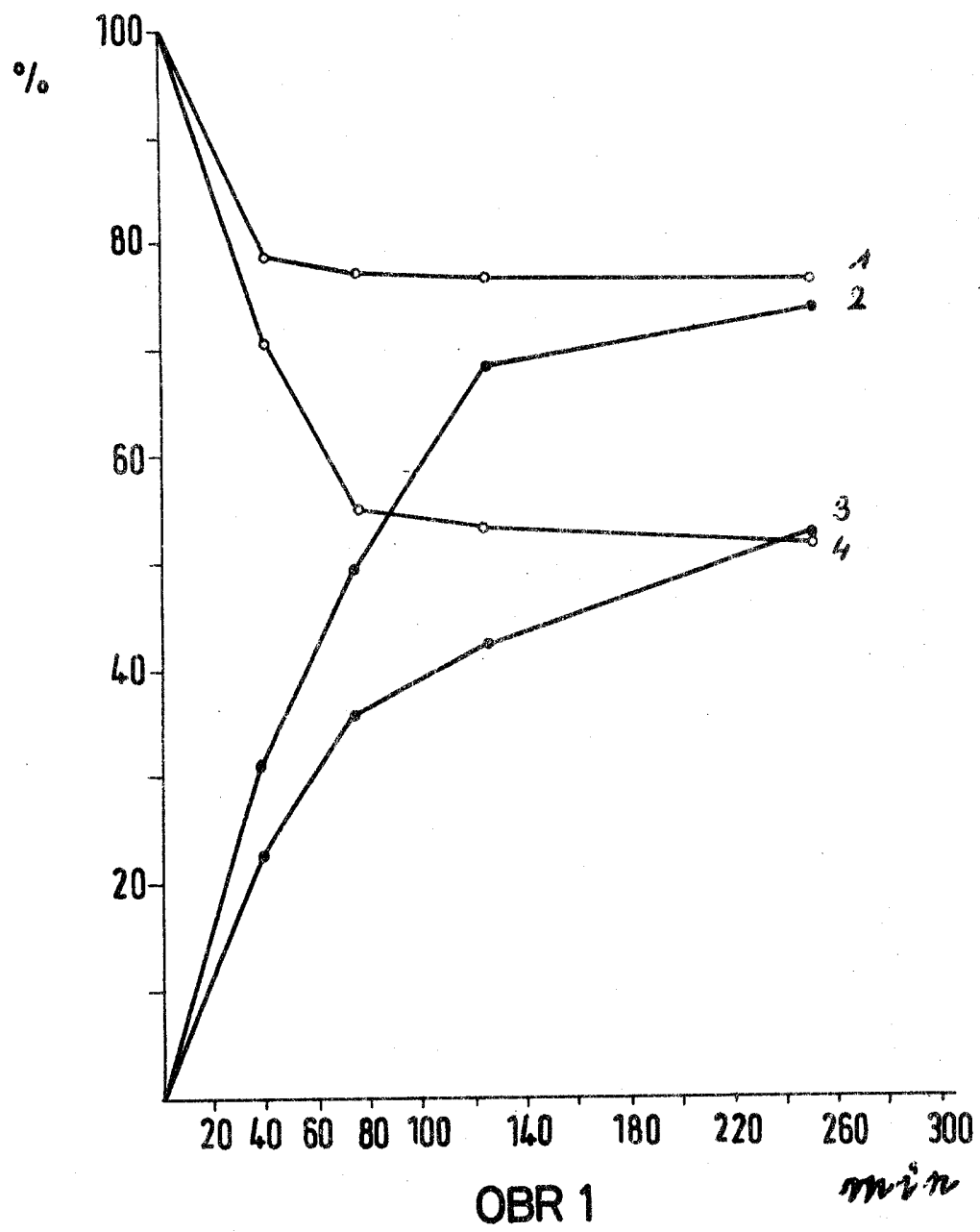
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se užívá komplexotvorného činidla, které je kyslíkatým aniontem, nebo smíšeným komplexním kyslíkatým aniontem germania.

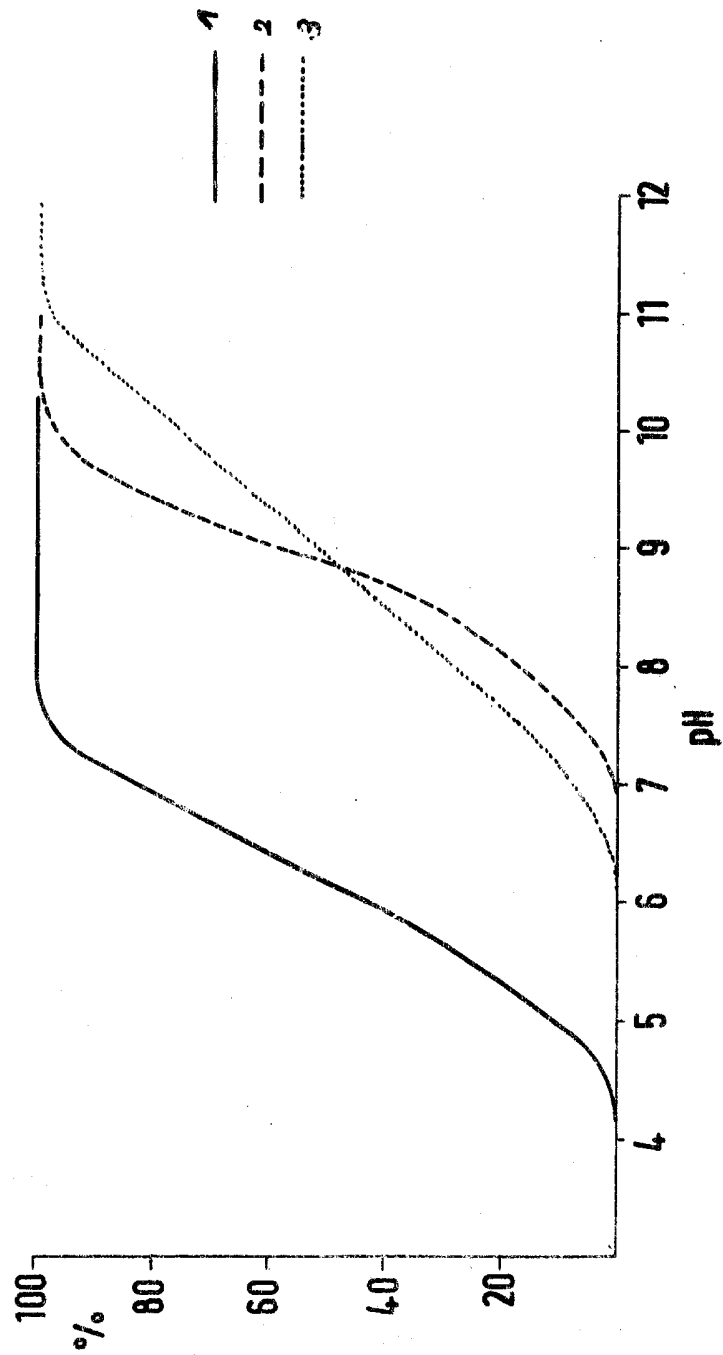
3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se komplexotvorné činidlo uvádí do reakce jako komplex aldózy a kyslíkatého aniontu nebo jeho derivát komplexu aldózy a kyslíkatého aniontu nebo jako sůl nebo kysličník jiné sloučeniny, která tvoří kyslíkaté anionty nebo smíšené komplexy kyslíkatých aniontů za reakčních podmínek.

4. Způsob podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se komplexotvorné činidlo přivádí do reakce ve formě kyslíkatého aniontu, předběžně vázaného na polyol nebo na iontoměničovou pryskyřici nebo na jinou nerozpustnou podložku, která tvoří chelát s komplexotvorným činidlem nebo toto činidlo obsahuje.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že komplexotvorné činidlo je přítomno v roztoku v koncentraci 200 až 800 mmolů/l.

226164





obc 2