

(19) DANMARK



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) PATENTSKRIFT

(11) 169587 B1

(21) Patentansøgning nr.: 0769/94

(51) Int.Cl.5

C 12 N 9/92

(22) Indleveringsdag: 28 jun 1994

C 12 N 9/96

(24) Løbedag: 24 jun 1985

(41) Alm. tilgængelig: 28 jun 1994

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 12 dec 1994

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 2857/85

(30) Prioritet: 25 jun 1984 FI 842549

(73) Patenthaver: *Stabra AG; Baarerstrasse 2; P.O. Box 157; CH-6301 Zug, CH

(72) Opfinder: Kalevi J. *Visuri; FI

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til krystallisation af glucoseisomerase

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

769-94

Ved en fremgangsmåde til krystallisation af glucoseisomerase
gås der frem på den måde, at

(a) pH-værdien af et delvist rensat glucoseisomerasepræparat
justeres til et interval fra 5,7 til 8,0,

(b) præparatet afkøles til ca. 16°C eller derunder,

(c) ammonium- og/eller magnesiumsulfat tilsættes i en koncen-
tration fra ca. 50 til ca. 170 g pr. liter præparat, og

(d) der afkøles til nær frysepunktet for blandingen for at
lette krystaldannelsen.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til krystallisation af glucoseisomerase, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne. Hensigtsmæssige udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er angivet i krav 2-6.

Anvendelse af glucoseisomerase til isomerisering af glucose til fructose er en kendt industriel metode, ved hvilken enzymet ofte anvendes i immobiliseret form. Ved mange af de kommercielle metoder, som er i anvendelse, fremstilles det immobiliserede enzympræparat ved en separat proces, ved hvilken enten enzymet immobiliseres på bæreren ved hjælp af adsorptionsteknik, eller hele den mikrobielle cellemasse med enzymet immobiliseres, således at der fås en matrix. Reaktorkolonnen fyldes med færdigt, immobiliseret enzym. Når enzymet er opbrugt, tømmes kolonnen og fyldes igen med frisk, immobiliseret enzympræparat.

Det er kendt, at et rensset enzym adsorberes langt bedre på en bærer end et ikke-renset råpræparat (US patentskrift nr. 4.347.322). Problemet har været at fremstille et sådant stabilt, let håndterligt enzympræparat, der er let at opbevare, og som kan anvendes til immobilisering af enzymet på bæreren i en kolonne.

Et bundfald eller en krystalmasse, der fås ved glucoseisomeraserensningsprocesser, der er baseret på fældning eller krystallisation, indeholder mindst 60 vægt% vand, der ikke kan fjernes uden at ødelægge enzymstrukturen. Krystalmassen er i sig selv ikke mikrobiologisk stabil, og den er vanskelig at håndtere og dosere. En alternativ metode er at opløse krystalmassen til en opløsning, hvis koncentration fortrinsvis skal være så høj som mulig med henblik på opbevaring, stabilitet og transport. En nærliggende metode ville være at opløse enzymkrystallerne i vand eller i en fortyndet saltopløsning. Det har imidlertid vist sig i praksis, at det på grund af glucoseisomerasens forholdsvis ringe opløselighed ikke er muligt at fremstille en tilstrækkelig koncentreret opløsning af isomerasen ved at opløse krystaller

i vand. Den fortyndede vandige isomeraseopløsning er yderst ustabil og mister sin aktivitet på grund af mikrobiologisk og kemisk forringelse i løbet af få dage.

Det har også været foreslået, at enzymet kunne opløses
5 i et organisk opløsningsmiddel (US patentskrift nr. 4.077.842). Det er imidlertid ikke tilrådeligt at anvende organiske opløsningsmidler i en fremgangsmåde til fødevarerfremstilling, og derfor er denne teknik kun dårlig egnet til et enzym, der anvendes direkte til fremstilling af næringsmidler. Hvis derimod enzymet ikke skulle anvendes til
10 fødevarer, kunne de stoftyper, der kunne anvendes til opløsning, udvides.

Der findes en righoldig litteratur vedrørende fremstilling, rensning og anvendelse af glucoseisomerase, fordi
15 glucoseisomerase er et af de vigtigste enzymer, der anvendes for øjeblikket. Imidlertid er alle de kendte rensningsprocesser ret komplicerede og giver som regel temmelig lave udbytter.

Rensning af enzymer og proteiner ved hjælp af krystallisation er i og for sig kendt, og f.eks. i håndbogen Enzymes (M. Dixon og E.,C. Webb, Enzymes, 3. udg., Longman Group Ltd., Bungay 1979, side 1116) vises 192 fotografier af enzymkrystaller. Det er desuden kendt, at ammoniumsulfat i mange tilfælde er egnet som middel til at fremkalde krystallisation, og det nedsætter opløseligheden. Desuden kan ammoniumsulfatkrystallisation ofte udføres ved hjælp af et
25 andet salt eller organisk opløsningsmiddel, såsom acetone eller alkohol. Inden for dette område af kemien medgives det i reglen, at det aldrig er indlysende, at et bestemt
30 enzym eller et andet protein eventuelt kan krystalliseres ved hjælp af et eller andet, i og for sig kendt, fældningsmiddel. Der kendes talrige proteiner og enzymer, som indtil nu ikke har kunnet krystalliseres, selv om rensningsprocesser inden for biokemien har undergået en voldsom udvikling.
35 Læren om enzymkrystallisation (som faktisk måske snarere er en kunst) er således yderst empirisk, og blot fordi visse

metoder har vist sig at være resultatrige til krystallisering af ét enzym, betyder det ikke, at de samme metoder kan anvendes i bred almindelighed til krystallisation af andre enzymer.

5 Anvendelsen af fraktioneret sulfatfældning (ammonium- og/eller magnesiumsulfat) som rensningsmetode til glucose-isomerase eller som en del af en sådan fremgangsmåde er kendt fra flere publikationer [US patentskrifterne nr. 4.237.231 og 4.077.842, Agr. Biol. Chem. 45, 619-627 (1981),
10 id. 28, 1123-1128 (1965), id. 34, 1795-1804 (1970), id. 29, 1129-1134 (1965), og Biochem. Biophys. Acta. 151, 670-680 (1968)].

De sulfatkoncentrationer, der anvendes ved disse rensningsmetoder til isomeraser, har været forholdsvis høje.
15 Således fældes ved fremgangsmåden ifølge US patentskrift nr. 4.237.231 først de unødvendige proteiner ud fra isomeraseopløsningen ved en mætningsgrad på 40% ammoniumsulfat, og derpå fældes isomerasen selv ved en højere mætningsgrad (op til 60%).

20 Når der anvendes høje ammoniumsulfatkoncentrationer til fraktioneret fældning, udfældes der altid sammen med isomerasen en overflod af andre proteiner, og jo højere ammoniumsulfatkoncentration der anvendes, jo flere yderligere proteiner vil der udfældes, medmindre isomerasen allerede
25 er blevet rensset på en eller anden måde ved hjælp af en anden metode.

Ved rensningsprocesser baseret på fraktioneret fældning er resultatet i reglen et amorft bundfald, som er meget vanskeligt eller direkte umuligt at fraskille fra modervæsken
30 i godt udbytte ved hjælp af centrifuger eller separatorer beregnet til industriel brug.

Det amorfe bundfald er som regel en blandet udfældning, som foruden isomerasen også indeholder andre proteiner, især hvis råmaterialet er en mikrobiel cellevæske, som ikke
35 er blevet rensset i forvejen. Et sådant amorft bundfald er vanskeligt at adskille fra modervæsken, og udfældningen giver

ikke den ønskede rensningsvirkning for isomerasens vedkommende.

Krystallisation af glucoseisomeraser ved hjælp af ammoniumsulfat, andre salte eller organiske opløsningsmidler er beskrevet i flere publikationer [Biochem. Biophys. Acta 151, 670-680 (1968), Agr. Biol. Chem. 34, 1795-1804 (1970), id. 45, 619-637 (1981), og id. 33, 1527-1534 (1969)]. Karakteristiske træk ved de i disse publikationer beskrevne krystallisationsmetoder er lavt udbytte, meget lang krystallisationstid eller forholdsvis stort forbrug af kemikalier. I alle disse tilfælde har formålet været at fremstille en lille mængde ren isomerase til grundforskningsformål. Isomerasen er således først blevet rensset ved hjælp af en eller anden metode (ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel, DEAE-"Sephadex®"-søjlechromatografi, ammoniumsulfatfældning, dialyse), hvorefter der er udført krystallisation af den rensede isomerase ud fra ren vandopløsning med ammoniumsulfat, phosphatpuffer eller acetone.

Ingen af de i ovennævnte publikationer beskrevne metoder har været anvendt i industriel målestok på grund af deres ringe økonomi.

Et stabilt glucoseisomerasekoncentrat indeholder glucoseisomerase opløst i en koncentreret vandig opløsning indeholdende sukker eller sukkeralkohol.

Det har vist sig, at dette koncentrat er både kemisk og mikrobiologisk stabilt og er særlig anvendeligt til fremgangsmåder, ved hvilke glucoseisomerasen immobiliseres på et bærermateriale. Egnede sukkerarter og sukkeralkoholer er alle sådanne forbindelser, der er let opløselige i vand. Sukkerforbindelser, glycerol, polypropylen eller ethylenglycol er også egnede. Særligt egnede er sukkerforbindelser, som anvendes som næringsmidler i sig selv, samt sukkeralkoholer, der er tilladte fødevareradditiver. Eftersom isomeriserings Slutproduktet er en glucose-fructose-sirup, er blandingen af disse sukkerforbindelser, dvs. invertsukker, yderst egnet til formålet.

Det samlede tørstofindhold i koncentratet bør være et sådant, at det i sig selv er mikrobiologisk stabilt, dvs. tørstofindholdet bør være fra ca. 60 til ca. 70 vægt% (dvs. vandets aktivitet skal være tilstrækkelig lav).

5 Glucoseisomerasekoncentratet indeholder 5-20 vægt% glucoseisomerase, fortrinsvis 5-15 vægt% glucoseisomerase, 30-60 vægt% af en i vand opløselig sukker eller sukkeralkohol, såsom glucose, maltose, fructose, saccharose, sorbitol, xylitol eller en blanding heraf, f.eks. invertsukker,
10 glucosesirup eller isomeriseret glucosesirup, ikke over 15 vægt% af et egnet salt, såsom ammonium- og/eller magnesiumsulfat, og/eller en puffer (pH-værdi 5,0-8,0), f.eks. natrium-kalium-phosphatpuffer, carbonatpuffer eller en puffer fremstillet af et organisk salt (f.eks. et salt af en amino-
15 syre) eller en blanding af puffere, og resten vand.

Koncentratets pH-værdi er 5,0-8,0, og enzymaktiviteten er 500-10.000 GIU/g koncentrat, pH-værdien fortrinsvis 6,0-8,0 og enzymaktiviteten fortrinsvis 2000-5000 GIU/g koncentration (GIU = glucoseisomeraseenheder).

20 I det følgende er anført nogle eksempler på egende enzymkoncentrater af den nævnte art:

1. 50 vægt% glycerol,
 30 vægt% vand,
 15 vægt% enzym,
25 5 vægt% ammoniumsulfat.
2. 50 vægt% invertsukker,
 30 vægt% vand,
 15 vægt% enzym,
30 1 vægt% puffer (Na-K-phosphat),
 4 vægt% ammoniumsulfat.
3. 50 vægt% sorbitol,
 40 vægt% vand,
35 10 vægt% enzym.

4. 50 vægt% saccharose,
30 vægt% vand,
15 vægt% enzym,
5 vægt% puffer (natriumphosphat).

5

Sammensætningen af konzentratet kan imidlertid varieres efter behov, idet der drages omsorg for, at den samlede koncentration er tilstrækkelig høj, men at opløsningen alligevel i flydende form er let at håndtere.

10 Glucoseisomerasekoncentrater af den her omhandlede art er rene, stabile og lette at håndtere og dosere. Enzymaktiviteten kan justeres. Alt efter anvendelsen ligger et passende aktivitetsinterval fra 2000 til 10.000 GIU/g præparat.

15 Sukkerforbindelserne, sukkeralkoholerne og saltene, der skal anvendes, er fortrinsvis af fødevarekvalitet (f.eks. Food Chemicals Codes-standard). Enzymet skal renses passende ved krystallisation eller ved hjælp af en anden metode.

Et egnet bæreremateriale til adsorption af glucoseisomerase er et materiale med ionbytterkapacitet, f.eks. glasperler, ionbytterharpiks eller en bærer baseret på siliciumoxid. Særlig egnede er diethylaminoethyl-(DEAE)-derivater, som vides at adsorbere proteiner, såsom DEAE-cellulose og DEAE-dextran. Der er beskrevet et stort antal bærerematerialer
25 i litteraturen.

Når der anvendes DEAE-cellulose som bærer, er det let at opnå en aktivitet på over 1000 IGIU/g immobiliseret enzym. (IGIU = immobiliseret glucoseisomeraseaktivitet).

En fremgangsmåde til fremstilling af det ovenfor
30 beskrevne stabile glucoseisomerasekoncentrat udføres som følger:

(a) tilsætning af et egnet salt til en delvis rensed glucoseisomeraseopløsning, der er opnået ved fermentering, så at glucose-isomerasen krystalliseres,

35 (b) afkøling af opløsningen for at fremme glucoseisomerasens krystallisation og fraskillelse af den dannede

krystalmasse og derefter, eventuelt en eller flere omkrystallisationer, og

(c) tilsætning af en sukker eller en sukkeralkohol eller en koncentreret vandig opløsning deraf til den fremstillede krystalmasse, som opløses, hvorved der fås et stabilt glucoseisomerasekoncentrat.

Ifølge den foreliggende opfindelse kan glucoseisomerase-enzymet renses yderst effektivt ved at krystallisere det ud fra en saltopløsning. Egnede salte er alle sådanne ikke-toksiske salte, der ikke inaktiverer enzymet. Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse anvendes ammonium- og/eller magnesiumsulfat.

Fældning af glucoseisomerase ved hjælp af et salt er i og for sig en gængs metode, der er beskrevet i f.eks. Agr. Biol. Chem. 29, 1129-1134 (1965) (Isumre og Sato). Imidlertid har der ikke tidligere været beskrevet en fremgangsmåde, ved hvilken dannelsen af krystaller finder sted. Ved ovennævnte kendte fremgangsmåde dannes et amorft bundfald.

Afhængigt af betingelserne kan der fås enten et amorft bundfald eller et krystallinsk bundfald ud fra isomerasen ved anvendelse af det samme kemiske ammoniumsulfat eller magnesiumsulfat. Det er almindelig kendt, at talrige enzymer opfører sig på samme måde.

Et karakteristisk og overraskende træk ved fremgangsmåden er, at glucoseisomerasen udfældes som et krystallinsk stof og før alle andre stoffer, der eventuelt udfældes. Ved fremgangsmåden anvendes nøje udvalgte betingelser og en så lav ammoniumsulfatkoncentration, at ingen andre stoffer udfældes fra opløsningen. I denne henseende afviger fremgangsmåden væsentligt fra det, der er beskrevet i litteraturen på dette område. Tidligere blev glucoseisomerase ikke krystalliseret direkte og alene som eneste fældningskomponent fra en cellevæske eller et cellevæskkoncentrat fra en produktionsmikrobe. Fremgangsmåden giver også et meget højt udbytte, der afviger væsentligt fra det, der tidligere har været anført i litteraturen.

Det er almindelig kendt, at enzympræparaters opbevaringskvalitet og -stabilitet kan forøges, f.eks. ved hjælp af glycerol, polyalkoholer og sukkerforbindelser. Sådanne enzympræparater fremstilles i reglen ved at tilsætte det
5 nævnte stof til en koncentreret enzymopløsning.

Det har overraskende vist sig, at når der blandes vandfri polyalkohol eller sukker (fortrinsvis glucose) i en koncentreret isomerase-krystalsuspension eller i en fast krystalmasse med den højest mulige aktivitet på ca. 10.000
10 GIU/g, opløses isomerasekrystallerne, og der fremstilles en ægte klar opløsning. En sådan opløsning er stabil, når dens vandkoncentration er tilstrækkelig lav, og når dens isomeraseaktivitet er tilstrækkelig høj. Opløsningen kan indeholde salte afledt ud fra krystallisationsmetoden eller salte,
15 som er blevet tilsat bagefter, og som i sig selv har en virkning, der forøger den mikrobiologiske stabilitet. Polyalkoholen eller sukkeret har imidlertid en væsentlig betydning med hensyn til opløsningen af isomerasekrystallerne, for at der kan opnås en så høj isomeraseaktivitet i opløsningen som muligt.
20

I den kendte teknik findes der ingen eksempler på isomerase-opløsninger med en enzymatisk aktivitet, der er så høj som det ovenfor beskrevne glucoseisomerasekoncentrat, og der er heller ikke beskrevet fremgangsmåder til fremstilling af sådanne opløsninger.
25

Fremstillingen af glucoseisomerasekoncentratet foretages fortrinsvis på følgende måde hvoraf trin b) - g) illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen:

(a) Der fremstilles en cellevæske ud fra organismen
30 *Streptomyces rubiginosus* ved hjælp af lyse (USA patentskrift nr. 4.410.627) og ud fra cellevæsken fremstilles ved ultrafiltrering et koncentrat indeholdende isomerase som råmateriale til krystallisationsprocessen; en foretrukket isomerasekoncentration i koncentratet er 200-800 GIU/g.

35 (b) Isomeraseopløsningens pH-værdi justeres til intervallet 5,7-8,0, fortrinsvis 7,0.

(c) Opløsningen afkøles til ca. 16°C eller derunder.

(d) Der sættes ammonium- og/eller magnesiumsulfat til opløsningen i en koncentration fra ca. 50-170 g pr. liter opløsning. Den mængde sulfat, der skal tilsættes, afhænger af den oprindelige isomerasekoncentration og af krystallisationens sluttemperatur. Den mest foretrukne mængde sulfat, der tilsættes, er sådan en mængde, ved hvilken kun isomerasen krystalliseres, medens de øvrige proteiner endnu ikke begynder at udfældes.

10 (e) Tilsætningen af sulfaterne sker fortrinsvis gradvis, således at tilsætningen af hele mængden varer 2-4 timer, selv om der også kan opnås et acceptabelt resultat ved at tilsætte hele mængden på én gang, men i så tilfælde forbliver størrelsen af isomerasekrystallerne ugunstigt lille.

15 (f) Opløsningen afkøles fortrinsvis i flere timer, fortrinsvis til nær den pågældende blandings frysepunkt, hvilket ved de lavest afprøvede sulfatkoncentrationer er ca. -2°C og ved de højeste -6°C. Afkølingen kan påbegyndes, enten samtidig med at sulfattilsætningen påbegyndes, eller
20 først når sulfattilsætningen er afsluttet; ved hjælp af gradvis afkøling opnås en afkøling-krystallisationsvirkning, som forøger størrelsen af isomerasekrystallerne på en gunstig måde, og desuden har køling en opløselighedssænkende virkning, hvilket igen forøger udbyttet.

25 (g) Isomerasekrystallerne fraskilles fra opløsningen, ved at de får lov at bundfælde sig på bunden af beholderen, ved at de frafiltreres, eller i stor skala bedst ved at de fracentrifugeres ved hjælp af en kontinuerlig separator.

(h) Den fraskilte krystalmasse opløses ved, at der
30 tilsættes et tørt carbonhydrat eller en koncentreret vandig opløsning heraf, hvorved isomerasekrystallerne opløses, og der fås et stabilt glucoseisomerasekoncentrat.

Om ønsket kan krystallisationen gentages, og i så fald bør krystalmassen opløses efter fraskillelsen (trin
35 (g)) i en rigelig mængde vand ved en forholdsvis høj temperatur (20-30°C). I denne forbindelse er en passende vandmængde

en sådan, at opløsningens isomeraseaktivitet er 500-2000 GIU/ml, med andre ord, vægten af den vandmængde, der bruges, er i reglen 4-10 gange krystallmassens vægt.

Som udtrykket anvendes her, er GIU forkortelsen for
5 glucoseisomeraseenhed og er den mængde enzym, der omdanner
1 μ mol glucose til fructose pr. minut i en opløsning, der
til at begynde med indeholder 2 mol glucose pr. liter, 0,02
mol MgSO_4 og 0,001 mol CoCl_2 pr. liter ved pH-værdien 6,84-
6,85 (0,2 molært natriummaleat) målt ved omgivelsernes tem-
10 peratur og ved en temperatur på 60°C. Glucoseisomerasemålin-
gerne er udført ved hjælp af den metode, der er beskrevet
af N.E. Lloyd m.fl. i Cereal Chem. 49, nr. 5, side 544-553
(1972).

Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere belyst
15 ved hjælp af eksempler.

Eksempel 1

Et bad på ca. 40 m³ af mikroorganismen *Streptomyces*
rubiginosus fermenteres som beskrevet i US patentskrift nr.
20 4.410.627. Cellemassen lyseres på kendt måde (samme referen-
ce). Celleresterne og andet tørstof fjernes ved filtrering
ved hjælp af et gængs tromlefilter med kiseljord, hvorved
der fås 32 tons isomeraseholdigt filtrat. Dette filtrat
filtreres ved hjælp af et "PCI"-ultrafilter (Patterson-Candy,
25 Inc.), hvorved der fås 3000 kg isomeraseholdigt koncentrat,
hvis aktivitet er 960.000.000 GIU. Permeatet, der har pas-
seret ultrafiltreringsmembranen, fjernes.

Der sættes 120 kg magnesiumsulfat og 300 kg ammonium-
sulfat ($(\text{MgSO}_4)7\text{H}_2\text{O}$ og $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fødevarekvalitet) til
30 koncentratet. Blandingen afkøles til 10°C for at fremme
krystallisation. De dannede krystaller skilles fra ved dekan-
tering, og krystallisationen gentages ved at tilsætte 411 kg
ammoniumsulfat. Krystallerne fraskilles atter ved dekanter-
ring. Krystallmassen opløses ved tilsætning af 402 kg vand,
35 og opløsningens pH-værdi justeres ved hjælp af en 1 molær
ammoniakopløsning til 6,5. Opløsningen filtreres med et

pladefilter, og krystallisationen gentages endnu en gang ved hjælp af 16 kg magnesiumsulfat og 40 kg ammoniumsulfat.

Der fås et udbytte på 90 kg krystalmasse, hvoraf 29 kg er enzym, 3,7 kg salte (MgSO_4 , $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$) og resten vand.

5 Til krystalmassen sættes 45 kg glucose og 45 kg fructose samt 20 kg invertsukker med et tørstofindhold på 70 vægt%. På denne måde fås 200 kg af et enzympræparat, hvis sammensætning er følgende:

29,2 vægt% vand,
10 52,0 vægt% sukkerforbindelser,
14,5 vægt% glucoseisomerase,
4,3 vægt% salte (magnesium-ammoniumsulfat).

Enzymkoncentratets glucoseisomeraseaktivitet er 4500 GIU/g.

15

Eksempel 2

Der fremstilles et ultrafiltreret fermentat på den i eksempel 1 beskrevne måde. Til 4000 kg ultrafiltreret fermentat sættes 244 kg krystallinsk ammoniumsulfatopløsning, hvori der er opløst 600 kg salt i 900 kg vand. Opløsningen afkøles til 13°C og holdes på denne temperatur i 20 timer. Den dannede krystalmasse fraskilles ved hjælp af en "Westfalia® NA 7"-separator. Krystallerne opløses i vand, og opløsningen filtreres. Filtratetmængden er på 2000 liter.

25 Krystallisationen gentages ved hjælp af 122 kg krystallinsk ammoniumsulfat og ammoniumsulfatopløsning, der indeholder 300 kg ammoniumsulfat opløst i 460 liter vand. Den opnåede krystalmasse fraskilles igen ved hjælp af en separator. Til krystalmassen (525 kg) sættes samme mængde krystallinsk

30 fructose, hvorved massen opløses, og fructosen isomeriseres delvis til glucose. På denne måde fås et stabilt enzymkoncentrat, hvis sammensætning er følgende:

50,0 vægt% sukkerforbindelse (glucose og fructose),
11,2 vægt% enzym,
35 3,5 vægt ammoniumsulfat,
35,3 vægt% vand.

Koncentratets glucoseisomeraseaktivitet er 3000 GIU pr. g.

5 Eksempel 3

Et ultrafiltreret fermentat fremstilles på samme måde som beskrevet i eksempel 1. Til krystallisationen af glucoseisomerasen anvendes 4000 liter ultrafiltreret fermentat med en aktivitet på 2.400.000.000 GIU. Opløsningens pH-værdi justeres ved hjælp af en 5%'s NaOH-opløsning til pH 7,0, og opløsningens temperatur justeres til 12°C. Til krystallisationen af glucoseisomerasen sættes 500 kg ammoniumsulfat opløst i 750 liter vand til opløsningen i løbet af to timer med jævn tilledningshastighed. Derpå afkøles opløsningen til -2°C, og opløsningen omrøres i 24 timer. Glucoseisomerasekrystallerne fraskilles ved hjælp af en "Westfalia® NA-7"-separator. Udbyttet er 390 kg krystalmasse med et tørstofindhold på 23,6 vægt% og en aktivitet på 2.300.000.000 GIU. Der sættes 30 kg natriumchlorid og 180 kg glucose til krystalmassen, og det opnåede enzymkoncentrats pH-værdi justeres ved hjælp af en 5%'s NaOH-opløsning til 7,0. Under disse omstændigheder isomeriseres glucosen delvis. Herved fås 600 kg stabilt enzymkoncentrat, hvis sammensætning er følgende:

- 25 49,7 vægt% vand,
 30,0 vægt% sukkerforbindelser (glucose/fructose),
 12,8 vægt% enzym,
 2,5 vægt% ammoniumsulfat,
 5,0 vægt% natriumchlorid.
- 30 Enzymkoncentratets glucoseisomeraseaktivitet er 3400 GIU/g.

Eksempel 4

Der fremstilles et ultrafiltreret fermentat på den i eksempel 1 beskrevne måde. Til krystallisation af glucoseisomerasen anvendes 4000 liter ultrafiltreret fermentat med en

aktivitet på 2.400.000.000 GIU. Opløsningens pH-værdi justeres ved hjælp af en 5%'s NaOH-opløsning til pH 7,0. Opløsningens temperatur indstilles på 12°C. Til krystallisation af glucoseisomerasen sættes 500 kg ammoniumsulfat opløst i 750 liter vand til opløsningen i løbet af to timer med jævn tilledningshastighed. Derpå afkøles opløsningen til -2°C og omrøres i 24 timer. Glucoseisomerasekrystallerne fraskilles ved dekantering. Udbyttet er 230 kg krystalmasse med et tørstofindhold på 40,0 vægt% og en aktivitet på 2.300.000.000 GIU. Til krystalmassen sættes 115 kg glucose og 115 kg fructose samt 50 kg invertsukker med et tørstofindhold på 70%. På denne måde fås 510 kg enzympræparat, hvis sammensætning er følgende:

30,0 vægt% vand,
 52,0 vægt% sukkerforbindelser (glucose, fructose),
 15,1 vægt% enzym,
 2,9 vægt% ammoniumsulfat.
 Enzymkoncentratets glucoseisomeraseaktivitet er 4500 GIU/g.

20

Eksempel 5

Der fremstilles et ultrafiltreret isomerasekoncentrat på den i eksempel 1 beskrevne måde. Der sættes 50 g ammoniumsulfat til 0,95 liter af et isomerasekoncentrat med en aktivitet på 600 GIU/ml og en temperatur på 25°C. Der dannes intet bundfald i opløsningen på dette stadium. Opløsningen afkøles i løbet af 16 timer til 0°C og holdes på denne temperatur under svag, konstant omrøring.

Isomerasen begynder at krystallisere i løbet af 2 dage, og krystallisationen fortsætter, således at 97,5 vægt% af isomerasen foreligger i krystallinsk form i modervæsen efter 5 dages forløb. Krystallerne skilles fra opløsningen ved hjælp af en laboratoriecentrifuge. Herved udvindes 56 g våd krystalmasse.

Ifølge dette eksempel er det muligt at krystallisere isomerasen med en meget lav ammoniumsulfatkoncentration i

forhold til de typiske mængder, der er kendt fra litteraturen. Samtidig er det et eksempel på ren kølekrystallisation. På baggrund af dette eksempel er det let at forstå, at isomer-
rasen, hvis fældningen ved hjælp af ammoniumsulfat udføres
5 hurtigt, og bundfaldet derpå fraskilles straks ved hjælp af
en centrifuge, f.eks. i løbet af 15 minutter, hvilket er
tilfældet ved fremgangsmåden ifølge US patentskrift nr.
4.237.231, forbliver fuldstændig i opløsningen, når ammonium-
sulfatkoncentrationen er lav, og der vil, hvis den udfældes,
10 ikke iagttages krystallisation, og fordelene herved forbliver
uudnyttede. En krystalmasse fremstillet ifølge det forelig-
gende eksempel kan opløses nøjagtig på samme måde som i de
andre eksempler.

Koncentrater fremstillet som her beskrevet har vist
15 sig at være stabile over for mikrobiel og kemisk inaktivering
i tidsrum på op til 10 måneder.

20

25

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til krystallisation af glucoseisomerase, k e n d e t e g n e t ved, at

(a) pH-værdien af et delvist rensset glucoseisomerase-
5 præparat justeres til et interval fra 5,7 til 8,0,

(b) præparatet afkøles til ca. 16°C eller derunder,

(c) ammonium- og/eller magnesiumsulfat tilsættes i
en koncentration fra ca. 50 til ca. 170 g pr. liter præparat,
og

10 (d) der afkøles til nær frysepunktet for blandingen
for at lette krystaldannelsen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at den yderligere omfatter, at krystallerne
skilles fra opløsningen.

15 3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g-
n e t ved, at krystallisation gentages ved at opløse de
fraskilte krystaller i en vandmængde, der er fra ca. 4 til
ca. 10 gange vægten af krystalmassen, ved en temperatur på
fra ca. 20 til ca. 30°C, og trinnene i krav 1 gentages.

20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at trin (c) udføres gradvis, og der tilsættes
ammonium- og/eller magnesiumsulfat i fast og/eller flydende
form.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
25 n e t ved, at trin (d) udføres sideløbende med trin (c).

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til krystallisation
af glucoseisomerase, k e n d e t e g n e t ved, at glucose-
isomerasepræparatet er opnået ud fra lyserede celler efter-
fulgt af ultrafiltrering,

30 (a) pH-værdien justeres til ca. 7,0,

(b) præparatet afkøles til ca. 16°C eller derunder,

og

(c) ammonium- og/eller magnesiumsulfat tilsættes i
en mængde fra ca. 50 til 170 g pr. liter præparat i løbet
35 af ca. 2 til ca. 4 timer, i hvilket tidsrum

(d) blandingen afkøles til nær dens frysepunkt for
at lette krystaldannelsen.