

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y PATENTU TYMCZASOWEGO

113 309

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

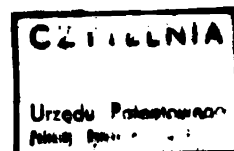
Zgłoszono: 22.06.79 (P.216549)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 05.05.80

Opis patentowy opublikowano: 27.02.1982

Int. Cl².
C07G 7/02



Twórcy wynalazku: Stefania Bachman, Zbigniew Gasyňa, Lidia Gębicka
Uprawniony z patentu tymczasowego: Politechnika Łódzka, Łódź (Polska)

Sposób unieruchamiania izomerazy glukozowej

Przedmiotem wynalazku jest sposób unieruchamiania izomerazy glukozowej, stosowanej przy wytwarzaniu syropu wysokofruktozowego, nadającej się do użytku w ciągłym procesie izomeryzacji glukozy do fruktozy.

Dotychczas znanych jest szereg sposobów unieruchamiania enzymu izomerazy glukozowej, zezwalających na ponowne użycie enzymu w procesie ciągłym, z czego część dotyczy unieruchomienia izomerazy glukozowej wyodrębnionej z macierzystego mikroorganizmu i częściowo oczyszczonej. Sposoby prowadzone z zastosowaniem rozpuszczalnych preparatów izomerazy glukozowej, zezwalają wprowadzić na uzyskanie wysokiej aktywności preparatu, jednakże wyodrębnianie izomerazy glukozowej z komórek macierzystego organizmu i oczyszczanie go jest procesem pracochłonnym i kosztownym. Nadto w operacji tej zachodzi częściowa inaktywacja enzymu.

Inne znane sposoby, zmniejszające wyżej wymienione niedogodności, dotyczą unieruchamiania całych komórek zawierających izomerazę glukozową. Najprostszy sposób, opisany w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3788945, polega na unieruchomieniu izomerazy glukozowej w komórkach macierzystego mikroorganizmu. Inny opis patentowy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3838007 podaje sposób unieruchomienia komórek zawierających izomerazę glukozową poprzez okluzję w żelatynie, natomiast w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3758396 opisano sposób unieruchomienia komórek na kolagenie. Znany jest także sposób unieruchamiania komórek zawierających izomerazę na włóknach celulozowych opisany, w czasopiśmie „Proces Biochemistry”, 12/7-8/, 14, 1977.

We wszystkich znanych sposobach unieruchamiania komórek zawierających aktywną izomerazę glukozową odzysk aktywności enzymu w preparacie nie przekracza 60%.

Stwierdzono, że zgodnie z wynalazkiem komórki bakteryjne, zawierające izomerazę glukozową, można unieruchomić sposobem radiacyjnej polimeryzacji akryloamidu w stanie zamrożonym, uzyskując preparat charakteryzujący się wysokim odzyskiem aktywności enzymu.

Sposób według wynalazku polega na tym, że do zawiesiny komórek zawierających aktywną izomerazę glukozową, dodaje się roztwór zawierający akryloamid, N,N'-metylenobisakryloamid i dekstran, po czym po dokładnym wymieszaniu składników, całość poddaje się szybkiemu zamrożeniu, korzystnie w ciekłym azocie.

Tak otrzymany układ poddaje się w stanie zamrożonym, korzystnie w temperaturze -196°C napromieniowaniu dawką 1–5 kGy z szybkością dawkowania 1–2 kGy/godzinę. Następnie przechowuje się uzyskany preparat w temperaturze od -10 do -20°C w czasie do 24 godzin w celu zainicjowania polimeryzacji poradiacyjnej, po czym rozmraża się preparat powoli do temperatury pokojowej, zaś otrzymany żel homogenizuje się, przemywa dokładnie wodą destylowaną w celu usunięcia monomerów, suszy i rozdrabnia do żądanej średnicy ziaren, korzystnie 0,1–0,5 mm.

W sposobie według wynalazku na 1–3% wagowych komórek zawierających aktywną izomerazę glukozową stosuje się mieszaninę zawierającą 15–25% wagowych akryloamidu, 0,5–2% wagowych N,N'-metylenobisakryloamidu oraz 1–4% wagowych dekstranu.

Dodatek w sposobie według wynalazku monomeru dwufunkcyjnego N,N'-metylenobisakryloamidu, jako czynnika sieciującego, oraz dekstranu, generującego aktywne ośrodki polimeryzacji, zezwala na obniżenie dawki promieniowania niezbędnej do zainicjowania polimeryzacji. Prowadzenie polimeryzacji w bloku, w układzie zamrożonym, zezwala na stosowanie dowolnej skali procesu.

Komórki zawierające izomerazę glukozową unieruchomione sposobem według wynalazku wykazują dużą trwałość fizyczną, bardzo dobrą stabilność i wysoki odzysk aktywności, wynoszący 85–95%. Jest to szczególnie korzystne, gdyż odzysk aktywności w znanych dotychczas sposobach nie przekracza 60%.

Komórki zawierające izomerazę glukozową unieruchomione sposobem według wynalazku, znajdują szczególne zastosowanie w procesie izomeryzacji glukozy prowadzonym w systemie kolumnowym.

Sposób według wynalazku zilustruje bliżej, podany niżej przykład nie ograniczający jego zakresu.

Przykład. Do 20 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH = 7,0 dodano 2,5 g komórek *Actinoplanes missouriensis* zawierających aktywną izomerazę glukozową. Zawiesinę komórek mieszano szybko z roztworem zawierającym 20 g akryloamidu i 1 g N,N'-metylenobisakryloamidu rozpuszczonych w 70 ml wody destylowanej oraz 2 g dekstranu rozpuszczonego w 10 ml wody destylowanej, po czym natychmiast zamrożono w ciekłym azocie w temperaturze -196°C . Zamrożony blok napromieniono w temperaturze -196°C dawką 4 kGy z szybkością dawkowania – 2 kGy/h. Napromieniony preparat przechowywano w temperaturze -15°C w czasie 24 godzin, po czym rozmrożono go do temperatury pokojowej. Otrzymany w wyniku powyższych operacji żel, rozdrobniono w homogenizatorze oraz przemyto wodą destylowaną. Przemyte ziarna wysuszone w temperaturze pokojowej na powietrzu, a następnie rozdrobniono i przesiano przez sita o średnicy otworów 0,44 mm.

Otrzymano preparat, który wykazywał 90% początkowej aktywności komórek oraz wykazywał odporność na wymywanie enzymu.

Unieruchomioną sposobem według wynalazku izomerazę glukozową, wykorzystano w procesie izomeryzacji glukozy prowadzonym w systemie kolumnowym. W tym celu 10 g unieruchomionego enzymu umieszczono w kolumnie 2,5 x 15 z płaszczem grzejnym utrzymującym temperaturę 60°C . Do reakcji użyto 40% roztwór glukozy oczyszczonej na węglu aktywnym z dodatkiem 10^{-2}M jonów Mg^{2+} w postaci $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 10^{-3}M jonów Co^{2+} w postaci $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o pH = 7,0. Roztwór substratu pompowano przez kolumnę od dołu ku górze z szybkością 15 ml/h. Osiągnięty stopień konwersji glukozy do fruktozy określony metodą polarymetryczną wynosił 42%. W miarę trwania procesu, celem utrzymania stałego stopnia konwersji, zmniejszano szybkość przepływu roztworu substratu przez kolumnę wypełnioną unieruchomionym enzymem. Wyznaczono czas, po którym aktywność unieruchomionej izomerazy glukozowej spadła do połowy. Czas ten wynosił 300 godzin.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób unieruchamiania izomerazy glukozowej, z n a m i e n n y t y m, że do zawiesiny komórek, zawierających aktywną izomerazę glukozową dodaje się roztwór, zawierający akryloamid, N,N'-metylenobisakryloamid i dekstran, po czym, po dokładnym wymieszaniu składników, całość poddaje się szybkiemu zamrożeniu, korzystnie w ciekłym azocie i w stanie zamrożonym poddaje się napromieniowaniu dawką 1–5 kGy z szybkością dawkowania 1–2 kGy/h, następnie przechowuje się uzyskany preparat w temperaturze od -10 do -20°C , w czasie nie przekraczającym 24 godziny, po czym rozmraża się preparat powoli do temperatury pokojowej, a otrzymany żel homogenizuje się, przemywa wodą destylowaną, suszy i rozdrabnia do żądanej średnicy ziaren, korzystnie 0,1–0,5 mm.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że na 1–3% wagowych komórek zawierających aktywną izomerazę glukozową stosuje się roztwór zawierający w procentach wagowych 15–25% akryloamidu, 0,5–2,0% N,N'-metylenobisakryloamidu oraz 1–4% dekstranu.