

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

206 134 B

(21) A bejelentés száma: 2393/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 05. 12.
(30) Elsőbbségi adatok:
882 249 1988. 05. 13. FI

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 11/00

C 12 N 9/92

(40) A közzététel napja: 1990. 08. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 08. 28. SZKV 92/08

(72) Feltaláló:

Visuri, Kalevi, Kantvik (FI)

(73) Szabadalmas:

STABRA AG., Zug (CH)

(54)

Eljárás keresztkötéses, vízoldhatatlan, kristályos glükóz-izomeráz előállítására

(57) KIVONAT

A találmány értelmében vízoldhatatlan, keresztkötéses, kristályos izomeráz enzimet úgy állítják elő, hogy

(a) glutáraldehidet adnak a kristályos glükóz-izomeráz-szuszpenzióhoz, amelyhez a glutáraldehid hozzáadása előtt, vagy a térhálósítási reakció során egy vagy több aminosoportot tartalmazó vegyületet (például ammóniumsót vagy aminosavat) adnak, majd

(b) a reaktánsok maradékát vízzel kimossák a térhálósított kristályokból.

A találmány az így kapott, térhálósítással vízoldhatatlanná tett enzimkészítmény alkalmazására is vonatkozik, fruktóz előállítására glükóz izomerizálása útján.

A találmány tárgya eljárás új, vízben oldhatatlan kristályos glükóz-izomeráz előállítására, kristályos enzim térhálósításával, valamint eljárás fruktóz előállítására glükóz izomerizálásával a furfi glükóz-izomerázzal.

Az immobilizált – azaz szilárd hordozóhoz kötött – enzimek alkalmazása folyamatosan működő reaktorokban egyre inkább kedvelt módszer, mivel ezáltal mind az enzimek költségei, mind a végtermék tisztításából adódó költségek csökkenthetők. A glükóz fruktózzá alakítása immobilizált glükóz-izomeráz segítségével olyan eljárás, amelyben ezt a módszert általánosan alkalmazzák.

Az enzimek általában vízoldhatók, így a folyamatos eljárásokban immobilizálási módszerek alkalmazására szükség van. Az enzimet olyan módszerrel kell egy szilárd fázishoz kötni, hogy az enzim vizes fázisban oldhatatlan legyen, ugyanakkor enzimatisztikus aktivitása megmaradjon. Az enzimek szilárd hordozókhoz való kötésére különféle eljárásokat használnak, amikor is az enzimet abszorbeálják, kovalensen kötik, térhálósítják vagy mikrokapszulázzák. Az enzimet termelő teljes mikroorganizmust is köthetik a szilárd fázishoz. A fenti módszereket összefoglalóan például a Moo-Young M. (szerk.) *Comprehensive Biotechnology* 2, Pergamon Press, London, 191–211. oldal (1985) irodalmi helyen ismertetik.

Az ismert eljárásokban az enzimet egy külön előállított hordozóanyaghoz kötik, ami maga is előnyösen befolyásolhatja a szubsztát kémiai kinetikáját vagy áramlási módját. A hordozóanyag azonban a legtöbb esetben drágább, mint a katalizátorként működő enzim, különösen az ipari léptékű eljárásokban, például a cukoriparban alkalmazott eljárásokban. Az enzim úgy is immobilizálható, hogy inert komponenssel, például zselatinnal térhálósítják. Minden ismert módszernél azonban a katalizátorként működő enzim az egyes eljárásokban alkalmazott anyagnak csak egy részét, általában 5, rendszerint 1–2 tömeg- vagy térfogat%-át képezi.

Módszerét tekintve a glutáraldehiddel való térhálósítás nagy jelentőségű, például a glükóz-izomeráz immobilizálására. Ismeretes, hogy a glutáraldehid használata megengedett az élelmiszer-ipari eljárásokban alkalmazott enzimek immobilizálására.

Az egyéb alkalmazható eljárások közül megemlíthetjük az ioncserélőkhöz való kötést és a szilárd hordozóban való abszorbeálást (például 4699882 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, amelynek címe: Stabilizált glükóz-izomeráz, feltalálója Visuri, K.). Azonban a fenti ismert eljárásban használt hordozóanyag meglehetősen drága, és az eljáráshoz nagyméretű reaktor kell.

Az immobilizált enzimek ipari alkalmazása olyan költségekkel jár, amelyek nem szükségszerűen az alkalmazott enzimmel kapcsolatosak; ide tartoznak a berendezés konstruálásával kapcsolatos költségek, a hordozóanyag beszerzési (újrabeszerzési) költségei, a reaktorok kiürítésével és betöltésével járó munka költségei (vagy a hordozó regenerálási költsége), és a reaktorok lassú működéséből adódó másodlagos költségek. A

hosszú retenciós idők miatt gyakran végbemennek nem enzimatisztikus, nemkívánatos mellékreakciók is, különösen a fruktóz előállítása során.

A szakirodalomban található néhány példa kristályos enzimek glutáraldehiddel való térhálósítására. Ezekben a tanulmányokban a kristályos enzim kereszt-kötését alapkutató célból hozták létre. Az enzimkristályok szerkezete gyakran olyan gyenge, hogy a kristályok nem ellenállók röntgendiffrakciós vizsgálatokban a sugárzással szemben; azonban glutáraldehiddel térhálósítva a fenti célra általában stabilizálhatók. Az enzimkristályok kereszt-kötését stabilitási és katalízis kinetikai vizsgálatok céljából is végezhetik. Azokban az esetekben, amikor a kristályok kereszt-kötése sikeres volt, csak glutáraldehidet használtak, és a közeg olyan oldat volt, amelyben minden egyes enzim kristályos formában maradt. Úgy tűnik, hogy az oldhatatlan kristály közvetlenül a glutáraldehid és az enzimprotein közötti reakcióban keletkezik. Quiocho és Richards [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 833 (1964), és Biochemistry 5, 4062 (1966)] voltak az elsők, akik a glutáraldehidet karboxipeptidázok kereszt-kötésére használták. Bishop és Richards [J. Mol. Biol. 33, 415–421 (1968)] kristályos β -laktoglobulint térhálósítottak glutáraldehid 1%-os vizes oldatával, szobahőmérsékleten. A kristályokat az enzim elektromos tulajdonságainak tanulmányozására használták. Haas [Biophys. J. 8, 549–555 (1968)] lizozimkristályokat térhálósított 4%-os nátrium-nitrát-oldat (pH 8) jelenlétében, 12%-os glutáraldehid-koncentráció alkalmazása mellett.

Dyer, Phillips és Townsend tanulmányozták a glutáraldehiddel térhálósított kristályos karboxipeptidáz hőstabilitását [Thermochimica Acta 8, 456–464 (1974)]. Azt tapasztalták, hogy a kereszt-kötés fokozott hőstabilitáshoz vezet. Tuechsen és Ottesen nátrium-szulfát-oldatban glutáraldehiddel térhálósított kristályos szubtilizin kinetikai tulajdonságait tanulmányozták [Carlsberg Res. Commun. 42, 407–420 (1977)]. Kismolekulájú szubsztátokkal a kristályok aktivitása igen nagy volt, míg nagymolekulájú szubsztátokkal, például proteinekkel vagy polipeptidekkel (amelyek nem tudnak a kristályokba diffundálni) az aktivitás elenyésző.

Wong és munkatársai ammónium-szulfát-oldatban glutáraldehiddel térhálósítottak mikrobaeredetű savas proteázt. Az ammónium-szulfát jelenlétét technikailag hátrányosnak találták [Biochem. and Biophys. Research Communications 80, 886–890 (1978)].

Morozov és Morozova kristályos lizozimet, hemoglobint és mioglobint térhálósítottak, 2–6%-os glutáraldehid-oldatot és 2–10 nap reakcióidőt alkalmazva, szobahőmérsékleten [Biopolymers 20, 451–467 (1981)]. Lee és munkatársai alkohol-dehidrogenáz kristályokat térhálósítottak glutáraldehiddel, 2-metil-2,4-pentándiol (25%) jelenlétében [Bioorganic Chemistry 14, 202–210 (1986)].

Ismeretes, hogy glutáraldehiddel gyakran nehéz oldhatatlan enzimet előállítani, különösen akkor, ha a protein lizintartalma viszonylag alacsony. Ezt a problémát gyakran úgy küszöbölik ki, hogy az enzimhez egy olyan proteint – például albumint – kevernek, amely

térhálósítható, és így állítanak elő oldhatatlan formát [Broun G. B.: *Methods in Enzymology* 44, 263 (1976)]. Azonban az ilyen idegen protein nem adható az enzimhez akkor, ha a térhálósítandó enzim kristályos. Jelenleg nem ismeretes térhálósítási eljárás azokban az esetekben, amikor csak glutáraldehiddel nem lehetséges egy kristályos enzimet keresztkötéssel oldhatatlan formává alakítani.

Amint azt már említettük, a glükóz-izomeráz glutáraldehiddel való immobilizálása ismert. Az izomerázt ezáltal egy hordozóanyaghoz keresztkötik. Ilyen eljárásokat iparilag széles körben alkalmaznak. Azonban nem ismeretes olyan eljárás, amelyben a glükóz-izomeráz kristályokat térhálósítással alakítanak oldhatatlan formává.

Azt tapasztaltuk, hogy a kristályos glükóz-izomerázban létrehozhatók keresztkötések úgy, hogy az eredeti kristályos állapot fennmarad, és az enzim aktivitása igen magas marad, a legjobb kiviteli módokkal az enzim aktivitása azonos marad az eredeti enzimével. A találmány szerinti eljárással előállított termék egyetlen olyan oldószerben sem oldódik, amely az enzim alkalmazása során előfordulhat. A térhálósított kristályos enzimet önmagában alkalmazhatjuk az izomerizációs oszlop töltetként, ipari izomerizációs eljárásban. Az új keresztkötéses kristályos enzim segítségével folyamatos izomerizációs eljárás valósítható meg sokkal kisebb méretű oszlopokon és sokkal hatékonyabban, mint korábban. Szakember számára nyilvánvalóan előnyös, hogy a találmány szerinti eljárás lehetővé teszi, hogy az oszlopot tiszta enzimmel töltsük meg, és nem inert hordozóhoz kötött enzimmel, amely inert hordozó az oszlop nagy részét elfoglalja, és az eljárási költség lényeges hányadát képezi.

A találmány szerinti eljárás értelmében a kristályos glükóz-izomeráz glutáraldehiddel és egy legalább egy aminosavtartalmú tartalmazó vegyülettel – például egy ammóniumvegyülettel vagy aminosavval, előnyösen a lizin egy ammóniumsójával – térhálósítjuk, majd a reaktsókat többszöri vízes mosással eltávolítjuk.

Számos aminosav alkalmazható a találmány szerinti eljárásban.

A találmány szerinti eljárással előállított szilárd, kristályos enzim aktivitása igen magas, vagy gyakorlatilag azonos a szabad enzimével. A szilárd kristályos enzimet önmagában alkalmazhatjuk folyamatos eljárásokban oszloptöltetként. A találmány szerinti eljárással előállított anyag igen stabil és mechanikai igénybevételel szemben ellenálló.

Kívánt esetben a térhálósított kristályok fizikai-kémiai módszerekkel nagyobb testekké, például gömb alakú, lapszerű, szalagszerű vagy hasonló formájú testekké alakítható. Az így kapott enzimkészítmények különféle mechanikai igénybevételekkel szemben ellenállók.

Szakemberek számára kézenfekvő, hogy a találmány szerinti térhálósítási eljárás bármely kristályos enzim oldhatatlan formává alakítására alkalmas, amely – általában aminosav-összetétele miatt – korábban nem volt alkalmas keresztkötések kialakítására.

A találmány szerinti eljárást részletesen az alábbiakban ismertetjük.

Kiindulási anyagként használt kristályos glükóz-izomeráz előállítása

Száraz proteintartalma alapján 1–10 tömeg%-os glükóz-izomeráz-oldatban kb. 10 tömeg% ammónium-szulfátot oldunk. Az oldatot lassan, állandó keverés mellett kb. 1–2 °C-ra hűtjük, eközben az izomeráz lényegében teljesen kristályosodik (kristályosodás mértéke nagyobb, mint 95%). Ammónium-szulfát helyett például magnézium-szulfátot vagy nátrium-szulfátot is használhatunk kristályosítószerként. Az alkalmazott sók koncentrációja széles határok között változtatható, például 5–25 tömeg% lehet. A kristályosításhoz szükséges idő is tág határok között változhat, például 1 óra és néhány nap között lehet. Nagy kristályok előállítása érdekében előnyös, ha fokozatos hűtést alkalmazunk, és az izomeráznak a lehető legtisztábbnak kell lennie. A kristályosítást a 4699882 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Visuri) ismertet.

A kristályosítás befejeztével a kristályos masszát ülepítéssel vagy centrifugálással választjuk el az anyalúgtól. Kívánt esetben a kristályos masszát tiszta ammónium-szulfát-, magnézium-szulfát-oldattal, vagy a kristályosításhoz használt egyéb anyag oldatával mosuk. A térhálósítást olyan kristályos masszával végezzük, amely nem tartalmaz szabad anyalúgot, és amelyet ülepítéssel vagy centrifugálással tömörítettünk. Az ilyen kristályos massa aktivitása jellemzően 10000 GIU/g. Szárazanyag-tartalom meghatározása alapján 20–30 tömeg% tiszta enzimproteint tartalmaz. Megjegyezzük, hogy az enzimkristályok elvesztik szerkezetüket, ha kiszáradnak.

Térhálósítás

A kristályos masszát sóoldatban szuszpendáljuk úgy, hogy abban a kristályok nem oldódnak. Az enzimkristályok koncentrációja az oldatban széles határok között változhat, például a szárazanyag-tartalom alapján 2–17% lehet.

Abban az esetben, ha a sóoldat eredetileg nem tartalmaz ammóniumsót, az oldathoz ammóniumsót, vagy egy megfelelő aminosavat, például lizint adunk. Az elegy pH-ját 5–9 pH-értékre, előnyösen pH 6–8-ra állítjuk be, például nátrium-hidroxid-oldattal. A pH-t foszfátpufferrel, például 0,05 mól/l koncentrációjú nátrium-foszfát-pufferrel, vagy lúgoldattal (például nátrium-hidroxid-oldattal) végzett automatikus pH-beállítással szabályozzuk. Az alkalmazott aminosav koncentrációja tág határok között változhat, az egyéb komponensek koncentrációjától függően. A találmány szerinti eljárás terméke magas hozammal keletkezik, ha az aminosavat 1–15 tömeg% végkoncentrációban tartalmazza az elegy.

A térhálósítási reakció megindítására ezután az elegyhez glutáraldehidet adunk. A glutáraldehid mennyisége tág határok között változtatható, a kristályos enzim nedves tömegére vonatkoztatva 1 és 45 tömeg% között. A glutáraldehid előnyös koncentrá-

ciója például az elegyben lévő amin koncentrációjától függ. Általában a glutáraldehid koncentrációja előnyösen 3–4,5 g/3 g száraz enzimnek megfelelő izomeráz. A reakció alatt az oldatot folyamatosan keverjük; a reakció-hőmérséklet 2 és 25 °C között változhat. Noha a reakció-hőmérséklet nem kritikus, előnyösen alacsony hőmérsékleten dolgozunk. A reakció igen gyorsan, néhány perc alatt lejártszódik, különösen magasabb hőmérsékleten. Alacsonyabb hőmérsékleten a reakció 20 órát is igénybevehet.

A reakció lejártszódása után az oldhatatlan kristályokat ülepítéssel vagy centrifugálással választjuk el az elegyből. A kristálytömeget vízben vagy megfelelő sóoldatban szuszpendálva, majd újracentrifugálva mossuk. A mosást többször megismételjük, míg a kristályos massa megfelelő tisztaságú lesz ahhoz, hogy katalizátorként alkalmazhassuk. A mosással kapcsolatosan előnyös az is, ha a finomszemcsés csapadékot leöblítjük.

Ha a kapott kristályos masszát enzimreakcióban katalizátorként kívánjuk alkalmazni, nem tanácsos azt kiszáritani. A nedves kristályos massa legalább hat hónapon keresztül megtartja teljes aktivitását, minden különösebb elővigyázat nélkül.

Végtermék jellemzése

A találmány szerinti eljárással előállított, térhálósított kristályok a kiindulási anyagként használt kristályokhoz hasonlóak megjelenésüket és méretüket tekintve. A kristályok mérete nem kritikus. Gyakorlati szempontból különösen megfelelők a 100–200 mikrométer átmérőjű, vagy ennél nagyobb kristályok, egészen 1 mm-es átmérőig.

A találmány szerinti eljárással előállított kristályok legfontosabb tulajdonsága, hogy vízben, sóoldatokban és cukoroldatokban oldhatatlanok. Különösen fontos, hogy az izomeráz kristályok még magasabb hőmérsékleten sem oldódnak tömény glükóz- és fruktózoldatban. Az ipari eljárásokban általában 60 °C-ot és 45 tömeg% cukorkoncentrációt alkalmaznak. A térhálósított kristályok ezen körülmények között oldhatatlanok, sőt még magasabb cukorkoncentrációk és magasabb hőmérsékletek (100 °C-ig) esetén is. A térhálósított kristályok aktivitása az eredeti enzimmével azonos nagyságrendű. Gyakorlati szempontból előnyös és jelentős, hogy aktivitásuk többszöröse az inert hordozóanyagon immobilizált enzimének.

Az enzim kristályos formában való térhálósításának további előnye, hogy az enzimet jelentős mértékben olyan erők stabilizálják, amelyek a kristályban működnek, és a kristályt természetes módon összetartják.

A kiindulási anyag és végtermék jellemzésére használt módszerek

Az izomeráz aktivitását nemzetközi glükóz-izomeráz-egységben határozzuk meg (rövidítése: GIU), a száraz enzimmasszát 1 g-jára vonatkoztatva. 1 egység (GIU) azt az enzimmennyiséget jelenti, amely az alábbi körülmények között 1 mikromól/perc sebességgel képes a glükózt fruktózzá alakítani: glükózkoncentráció 2,0 mó/l, pH 7,0, hőmérséklet 60 °C.

Az enzimaktivitás meghatározására 0,1–1 g enzimmasszát (eredeti kristályos masszát, vagy az alaposan mosott, térhálósított kristályos masszát) 100 ml fent ismertetett szubsztrátoldattal elegyítünk. Megfelelő idő – például 10 perc – elteltével meghatározzuk az oldat fruktóztartalmát, és az aktivitást a fent megadott egységekben kifejezve kiszámítjuk. Az enzim mennyiségét és a reakcióidőt úgy választjuk meg, hogy a képződött fruktóz az eredeti cukortartalomnak kevesebb mint 5%-a legyen azért, hogy a mért értékek a reakció kezdeti sebességét jelezzék. A kiindulási anyag és a termék szárazanyag-tartalmát ismert módon úgy határozzuk meg, hogy a mintát 105 °C-on tömegállandóságig szárítjuk.

Izomerizációs eljárás

A térhálósított kristályos enzimet szokásos módon alkalmazhatjuk szakaszos izomerizációs eljárásban, mikor is a felhasznált enzimet a reakció lejártszódása után például szűrővel elválasztjuk, és kívánt esetben újra felhasználhatjuk.

Ipari méretekben azonban az izomerizációt előnyösen folyamatos eljárással végezzük úgy, hogy az izomerizálandó cukoroldatot az enzimmel töltött oszlopon keresztül folyatjuk. A retenciós idő és/vagy hőmérséklet változtatásával az izomerizációs folyamatot könnyen szabályozhatjuk. Az enzim táp hőmérséklet-tartományban aktív, a fagyáspont és 100 °C-ot meghaladó hőmérséklet között. Alacsony hőmérsékleteken hátrányt jelent, hogy a reakció lassú, és a cukor (glükóz vagy fruktóz) hidrátja kristályosodik, míg magasabb hőmérsékleteken mind az enzim, mind a fruktóz bomlása lényegesen gyorsabban megy végbe.

A folyamatos izomerizációt rendszerint úgy folytatjuk le, hogy az oszlopot 100–300 mikrométer átmérőjű térhálósított enzimmasszával töltjük meg. Az oszlop méretét és magasságát minden egyes esetben a kívánt kapacitástól függően választjuk meg. Kisméretű oszlop esetén az oszloptöltet magassága célszerűen 5–50 cm lehet. Gyakorlatilag könnyen megvalósítható az eljárás, ha szobahőmérsékleten dolgozunk. Ha a jelenlévő mikrobiológiai szennyeződések problémát okoznak, ezt megszüntethetjük az oszlop hőmérsékletének legalább 60 °C-ra való emelésével.

Az eljárást egyszerűen szabályozhatjuk a lineáris átfolyási sebesség változtatásával. Kisméretű oszlop esetén a lineáris átfolyási sebesség 2–30 cm/perc lehet. A friss enzim számára megfelelő retenciós idő 1–2 perc. A nyomás atmoszférikus. A nyomásvesztés jelentéktelen ($<2 \times 10^4$ Pa 50 cm-es oszlopmagasságra számítva). A retenciós időt az oszloptöltet magasságának, valamint az átfolyási sebesség változtatásával állíthatjuk be a kívánt értékre. Az izomerizációs reakciót meggyorsíthatjuk a hőmérséklet emelésével.

A szokásos ipari eljárásokban az a cél legtöbb esetben, hogy olyan cukoroldatot állítsanak elő, amelyben a cukortartalom 40–45%-a fruktóz. Ha az oszlop öregedése következtében az enzim aktivitása csökken, a kívánt szintet az átfolyási sebesség csökkentésével tartathatjuk fenn.

A találmányt közelebből az alábbi példákkal kívánjuk ismertetni.

1. példa

850 g 10%-os ammónium-szulfát-oldatból a 4699882 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint kristályosított glükóz-izomeráz kristálymasszát lemérünk, és hozzáadunk 100 ml nátrium-szulfát-oldatot, amelynek pH-ját 0,5 mól/l koncentrációjú nátrium-foszfát-oldattal pH 7,4-re állítot-

A keverést azonnal befejezzük, és a kristályos masszát a reakcióedény alján 2 órán keresztül üledni hagyjuk. Az anyalúgot dekantáljuk, ügyelve arra, hogy közben a kristályokat ne öntsük le. A kristályos masszát 20 liter tiszta vízzel összekeverjük, és a mosóvizet dekantálással eltávolítjuk. A mosást még egyszer megismételjük. A kapott nedves, vízzel háromszor mosott, kristályos izomeráz használjuk az izomerizációs kísérletekben, aktivitásmeghatározásra és más kísérletekben.

A fenti módon előállított, térhálósított glükóz-izomeráz mikroszkópos vizsgálat szerint kristályos állapotú. A kristályok vízben, különféle sók híg oldataiban (pH 2–9 tartományban), híg savakban (1 mól/l koncentráció), és koncentrált glükóz-, fruktóz és cukoroldatban 100 °C-ig oldhatatlanok. A kristályok megjelenési formája a fenti körülmények között változatlan, míg a nem térhálósított kristályos izomeráz vagy oldódik, vagy amorf csapadék formájában kiválik. A térhálósított izomeráz enzimatis aktivitása a nem térhálósított, eredeti izomeráz aktivitásának 52%-a. Ennek megfelelően, ha az eredeti izomeráz aktivitása 40000 GIU/g, a megfelelő, térhálósított izomeráz aktivitása több, mint 20000 GIU/g, a száraz enzimproteinre számítva.

2. példa

Az 1. példában leírtak szerint eljárva az alábbi összetételű reakcióelegyet állítjuk elő:

14 g izomeráz, tiszta enzimproteinre számolva,
10 g ammónium-szulfát,
1,5 g glutáraldehid (kb. 8 ml 25%-os oldat),
0,05 mól/l nátrium-foszfát-puffer (pH 7,4),
100 ml víz.

A reakcióelegyet 25 °C-on 1 órán keresztül reagáltatjuk, majd a szabad oldatot laboratóriumi centrifugával 1000 fordulat/perc mellett 5 percen keresztül centrifugálva elválasztjuk az elegytől. A kristályos masszát 200 ml tiszta vízben szuszpendáljuk, és a fentiek szerint újracentrifugáljuk. A vizes mosást még egyszer megismételjük a fentiek szerint. A nedves kristályos masszát visszanyerjük és a további vizsgálatokban ezt használjuk. Az így módon előállított kristályos massa aktivitása az eredeti kristályos anyagénak 49%-a.

3–8. példa

A 2. példában ismertetett kiindulási összetételű reakcióelegyet állítjuk elő az 1. példában ismertetett módon és a reakciót –10 °C-on különböző reakcióidőket alkalmazva lejátsszatjuk. A reakciót leállítjuk, és a kristályos masszát mossuk, majd minden egyes készítmény aktivitását meghatározzuk. Az eredményeket az I. táblázatban ismertetjük.

I. táblázat

Példa száma	Reakcióidő	Aktivitás (eredeti kristályos massa aktivitásának %-a)
3.	10 perc	45
4.	30 perc	46
5.	60 perc	49
6.	90 perc	48
7.	120 perc	40
8.	180 perc	40

A fenti eredmények szerint a reakció igen gyorsan végbemegy, és az aktivitás a reakcióidő növelésével nem változik lényeges mértékben.

9–16. példa

Az 1. példában ismertetett módon állítjuk elő az alábbi összetételű reakcióelegyet:

14 g glükóz-izomeráz protein (kristályos formában),
10 g ammónium-szulfát,
90 ml 0,5 mól/l koncentrációjú nátrium-foszfát-oldat (pH 6,0, 7,0, 8,0 vagy 8,4, amint az a II. táblázatban látható),
glutáraldehid 0,12, 0,5, 2,0, 3,5 vagy 4,12 g (II. táblázat szerint).

A reakcióelegyet 10 °C-on 1 órán keresztül reagáltatjuk, majd minden egyes esetben meghatározzuk a kapott kristályos massa aktivitását (az eredeti kristályos massa aktivitásának %-ában). Az eredményeket a II. táblázatban ismertetjük.

II. táblázat

Példa száma	pH	Glutáraldehid (g)	Aktivitás (%)
9.	6,0	0,5	22
10.	6,0	3,5	24
11.	7,0	0,12	60
12.	7,0	2,0	65
13.	7,0	4,12	59
14.	8,0	0,5	41
15.	8,0	3,5	44
16.	8,4	2,0	39

A fenti eredményekből látható, hogy a glutáraldehid mennyiségét meglehetősen széles határok között vál-

toztathatjuk, és mégis magas aktivitásokat kapunk. A pH nagy mértékben befolyásolja az eredményeket; a pH előnyösen 7,0 körüli, de az egész vizsgált pH-tartományban – azaz pH 6,0 és 8,4 között – megfelelő készítményeket állíthatunk elő.

17–27. példa

Az előző példákban ismertetett kísérletsorozathoz hasonló kísérletsorozatot végzünk azzal az eltéréssel, hogy a reakció-hőmérséklet 2 °C és a reakcióidő 18 óra. A reakcióelegy összetétele az alábbi:

3 g izomeráz kristály, száraz proteinre számolva,
50 ml víz, mint reakcióközeg,
7,5 g só (nátrium-szulfát, magnézium-szulfát és/vagy ammónium-szulfát) (III. táblázat szerint),
nátrium-hidroxid, pH 7,0 beállítására (legfeljebb 2 milliekvivalens, azaz 80 mg),
0,125–2,5 g glutáraldehid (III. táblázat szerint).
Az eredményeket a III. táblázatban ismertetjük.

III. táblázat

Példa száma	Só (g)			Glutáraldehid (g)	Aktivitás (%)
	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄	Na ₂ SO ₄		
17.			7,5	0,5	0
18.			7,5	2,5	0
19.		7,5		0,125	0
20.		7,5		0,5	0
21.		7,5		0,75	0
22.		7,5		1,25	0
23.	0,45	7,05		0,75	20
24.	0,90	6,6		0,75	19
25.	1,8	5,7		0,75	28
26.	3,75	3,75		0,75	40
27.	7,5			0,75	60

A fenti eredményekből látható, hogy ha a térhálósítást ammóniumsó távollétében hajtjuk végre, még magas glutáraldehid-koncentráció alkalmazása mellett sem kapunk oldhatatlan kristályokat. Az oldhatatlan kristályok képződését már igen kis mennyiségű ammóniumsó is elősegíti.

28–38. példa

Az oldhatatlan izomerázkristályokat különféle nitrogénatomú komponensek alkalmazásával állítjuk össze, az alábbi általános eljárás szerint:

3 g kristályos izomeráz, száraz proteinre számolva,
7,5 g magnézium-szulfát,
10 mmól nitrogéntartalmú vegyület (IV. táblázat szerint),
2,5 g glutáraldehid (100%-ra számolva),
reakció-hőmérséklet: 2 °C,
reakcióidő: 18 óra.

Az eredményeket a IV. táblázatban ismertetjük.

IV. táblázat

Példa száma	Nitrogéntartalmú vegyület	Mennyiség (g)	Aktivitás (%)
28.	lizin	1,83	80
29.	arginin	1,74	17
30.	hisztidin	1,55	26
31.	glutamin	1,46	18
32.	leucin	1,31	21
33.	izoleucin	1,31	18
34.	prolin	1,15	10
35.	metionin	1,49	27
36.	fenilalanin	1,65	17
37.	triptofán	2,04	44
38.	betain	1,17	23

A fenti eredményekből látható, hogy számos különféle aminosav hasonló hatást fejt ki a térhálósítási folyamatban.

39–51. példa

Az oldhatatlan izomerázkristályokat glutáraldehid és lizin különböző dózisainak alkalmazása mellett állítjuk elő, az alábbi általános eljárás szerint:

3 g kristályos izomeráz, száraz proteinre számolva,
7,5 g magnézium-szulfát,
0,47–2,34 g lizin (V. táblázat szerint),
pH 8,0 beállítása nátrium-hidroxid-oldattal,
0,5–1,25 g glutáraldehid (100%, V. táblázat szerint),
reakcióidő: 18 óra,
hőmérséklet: 2 °C.

Az eredményeket az V. táblázatban közöljük.

V. táblázat

Példa száma	Glutáraldehid (g)	Lizin (g)	Aktivitás (%)
39.	0,5	0,47	67
40.	0,5	0,94	77
41.	0,5	1,40	60
42.	0,75	0,47	72
43.	0,75	0,94	83
44.	0,75	1,40	92
45.	0,75	1,87	81
46.	0,75	2,34	75
47.	1,25	0,47	68
48.	1,25	0,94	78
49.	1,25	1,40	90
50.	1,25	1,87	102
51.	1,25	2,34	100

A fenti eredmények szerint a lizin és glutáraldehid

mennyiségi aránya befolyásolja az oldhatatlan kristály képződését, azaz minden egyes glutáraldehid-koncentrációnál látható egy optimális lizindózisint.

52–57. példa

Az izomeráz kristályok térhálósítását ammónium-szulfátot és lizint tartalmazó oldatokban végezzük, az alábbi általános előírások szerint:

10 g kristályos izomeráz, 10%-os ammónium-szulfát-oldatban (azaz 3,72 g tiszta izomerázprotein száraz anyagra számolva, 0,63 g ammónium-szulfát és 5,65 g víz),

5 g ammónium-szulfát,

45 g víz,

1,25 g glutáraldehid, 100%-ra számolva,

0–3 g lizin (VI. táblázat szerint).

A reakcióelegy pH-ját a keverés megkezdése előtt nátrium-hidroxid-oldattal pH 8,0-ra állítjuk be. Az elegyet 3 °C-on 18 órán keresztül keverjük.

Az eredményeket a VI. táblázatban ismertetjük.

VI. táblázat

Példa száma	Lizin (g)	Aktivitás (%)
52.	0	40
53.	0,3	62
54.	0,6	66
55.	1,2	72
56.	1,8	92
57.	3,0	96

A fenti eredményekből látható, hogy a lizin igen kedvezően befolyásolja a térhálósítás hozamát. Az ammónium-szulfátnak nincs különösebb hatása, ha lizin is jelen van, noha az ammónium-szulfát önmagában elégtű eredményeket ad.

58–69. példa

Az izomeráz és lizin mennyisége állandó, míg a többi komponens mennyiségét a VII. táblázat szerint változtatjuk, az elegy

3 g glükóz-izomerázt (szárazanyagra számolva),

1 g lizint és

0,01 g nátrium-hidroxidot (pH 8,0 beállításához) tartalmaz. A reakcióidő 18 óra, és a reakció-hőmérséklet 2 °C.

Az eredményeket a VII. táblázatban foglaljuk össze.

VII. táblázat

Példa száma	Glutáraldehid (g)	MgSO ₄ (g)	Víz (g)	Reakcióelegy össz-mennyisége (g)	Aktivitás (%)
58.	0,5	2,1	11,9	18,5	39
59.	0,5	2,7	15,3	22,5	70
60.	0,5	4,2	23,8	32,5	70
61.	0,5	5,3	32,7	42,5	73

Példa száma	Glutáraldehid (g)	MgSO ₄ (g)	Víz (g)	Reakcióelegy össz-mennyisége (g)	Aktivitás (%)
62.	0,5	10,2	57,8	72,5	75
63.	0,5	16,2	91,8	112,5	77
64.	1,25	2,1	11,9	19,25	86
65.	1,25	2,7	15,3	23,25	99
66.	1,25	4,2	23,8	33,25	101
67.	1,25	10,2	57,8	73,25	83
69.	1,25	16,2	91,8	113,25	89

5

10

15

20

70. példa

1 g térhálósított, vízzel mosott glükóz-izomeráz masszát, amelyet az 56. példa szerint állítunk elő (0,4 g szárazanyag) 100 g 40%-os glükózoldattal elegyítünk, amelynek pH-ját 7,0-re állítottuk. Az elegyet 60 °C-on egyenletesen keverjük. A reakcióelegyből időközönként mintát veszünk, és a minta fruktóztartalmát polariméterrel, glükóztartalmát hexokináz alkalmazásával enzimatikusan meghatározzuk.

25

30

Az oldat fruktóztartalma 3 óra alatt az összcukortartalom (glükóz + fruktóz = 100%) 42%-ára emelkedik.

35

A vizsgálat befejezése után a keresztkötéses izomerázt szűrővel elválasztjuk az elegyből, és vízzel mosuk. A visszanyert kristályos massa aktivitását és szárazanyag-tartalmát meghatározva azt tapasztaljuk, hogy a kísérlet során az aktív enzim nem oldódik és nem veszik el. A kísérletet ugyanezzel az enzimmal többször is megismételhetjük.

40

71. példa

Az 1. példa szerint előállított kristályos masszából a finomszemcsés csapadékot mosással eltávolítjuk, és a kristályos anyagot finomra morzsoljuk a vízben való szuszpendálás és dekantálás (3-szor) alatt. Az így kapott durva kristályos frakciót, amelynek átlagos szemcsemérete 100 mikrométer, 2,6 cm átmérőjű és 5 cm magasságú henger alakú reaktorba helyezük. Az oszlopon 60 °C-on az alábbi összetételű glükózoldatot folytatjuk át:

50

582 g glükóz-monohidrát,

590 g víz,

0,37 g MgSO₄·7H₂O,

0,09 g NaHSO₃,

55

pH 6,9 (1 mól/l koncentrációjú NaOH-ból 1 ml-nél kevesebb kell a beállításához).

A vizsgálat megindításakor az átfolyási sebesség 1 ml/perc, és az oszlopról távozó oldatban a fruktóz koncentrációja az összcukor-tartalom 42%-ára emelkedik. A kísérletet 200 órán keresztül folytatjuk, ezután

60

az átfolyási sebességet 9 ml/óra-ra kell csökkenteni, hogy az eredeti konverziót (42% fruktóztartalom) fenntartsuk. Ennek megfelelően az enzim aktivitása az eredeti érték 81%-ára csökken ez alatt az idő alatt. A vizsgálat során nem észlelhető a kristályos massa mennyiségének csökkenése vagy oldódása.

72-76. példa

Lemérünk 43,42 g vízzel mosott nedves izomeráz enzimet, amelyet a 67. példa szerinti eljárással állítotunk elő (10,0 g enzim szárazanyagra számítva).

200 ml 71. példa szerint előállított glükózoldatot öntünk a kristályos masszára. Az elegyet 60 °C-on különböző időtartamokon keresztül rázatjuk, majd szűrőpapírkorongon átszűrjük az elegyet. A papíron maradt kristályos masszát az oldott anyag eltávolítására vízzel alaposan átmossuk. A kristályos masszát szárítószekrényben 105 °C-on szárítjuk, majd lemérjük. Az eredményeket a VIII. táblázatban foglaljuk össze.

Az eredményekből látható, hogy a találmány szerinti eljárással előállított, keresztkötéses, kristályos izomeráz nem oldódik a szubsztátoldatban, az ipari eljárásokban szokásosan alkalmazott körülmények között.

VIII. táblázat

Példa száma	Keverési idő	Kristályos massa száraz tömege a vizsgálat végén (g)
72.	10 perc	9,9
73.	2 óra	11,0
74.	4 óra	10,9
75.	6 óra	10,7
76.	21 óra	10,4

77. példa

Térhálósított kristályos izomerázt, DEAE-cellulózhoz kötött izomerázt és az eredeti, szabadon oldódó izomerázt hasonlítunk össze azonos kémiai és fizikai körülmények között. A körülményeket úgy választjuk meg, hogy mindegyik enzimmintát célszerű időn – azaz 10–30 órán – belül kimutatható mértékben veszítsen aktivitásából.

Minden egyes enzimkészítményből 5 g-ot 150 ml 0,05 mólos/l koncentrációjú nátrium-foszfát-pufferrel (pH 6,0) elegyítünk, amely puffer még 1,5 mmól/l MgSO_4 -ot, és 2 mmól/l NaHSO_3 -ot is tartalmaz.

Az elegyet 70 °C-on néhány órán keresztül rázatjuk. Az elegyből meghatározott időközökben mintát veszünk, és meghatározzuk a mintában lévő izomerázmaradék aktivitását. Az aktivitás csökkenése alapján minden egyes enzimmintát esetén kiszámítjuk a félelettartamot (azaz azt az időtartamot, amely alatt az aktivitás az eredeti érték felére csökken). Az eredményeket a IX. táblázatban ismertetjük.

IX. táblázat

Enzimminták	Félelettartam (óra)
eredeti, oldódó izomeráz	2,2
DEAE-cellulózhoz kötött izomeráz	3,3
térhálósított, kristályos izomeráz	19,0

Az eredményekből látható, hogy a találmány szerinti eljárással előállított, térhálósított kristályos izomeráz lényegesen jobban megőrzi aktivitását, mint a szabad enzim, vagy az ismert módon immobilizált enzim.

78. példa

Térhálósított, kristályos izomerázt és DEAE-cellulózhoz kötött izomerázt töltünk a 71. példában ismertetett módon henger alakú reaktorokba. Az oszlopokon egyenletes sebességgel glükózoldatot nyomunk át. A glükózoldat összetétele a 71. példában megadott, azzal az eltéréssel, hogy a pH-t 6-ra állítjuk be. A vizsgálat alatt az oszlop hőmérséklete 60 °C. Az oszlopokban lévő enzim aktivitását az átfolyási sebességből és az oszlopon átfolyt oldat fruktóztartalmából számítjuk ki. Az eredményeket a X. táblázatban ismertetjük.

X. táblázat

Oszloptöltet	Aktivitás félelettartama (óra)
térhálósított, kristályos izomeráz	120
DEAE-cellulózhoz kötött izomeráz	36

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a térhálósított kristályos enzim kiválóan megőrzi enzimátikus aktivitását.

79-81. példa

A találmány szerinti eljárással térhálósított kristályos izomeráz és ismert módon immobilizált izomeráz aktivitását hasonlítjuk össze, folyamatos, oszlopon végrehajtott eljárásban.

Az iparban szokásosan alkalmazott izomerázokat és a találmány szerinti eljárással térhálósított izomerázt vertikális laboratóriumi oszlopokba töltjük. A kristályok térhálósítását az 51. példában leírtak szerint végezzük.

A hengeres oszlopok belső átmérője 2,7 cm. és magassága 50 cm. Az oszlopokat 60 °C-ra termosztált vízzel töltött köpeny veszi körül. Az oszlopok alsó végén szita tartja az enzimszemcséket, de a cukoroldat átfolyását nem gátolja meg. Minden egyes oszlopba szárazanyagra számolva 20 g enzimet töltünk. A 71. példa szerinti összetételű glükózoldatot laboratóriumi szabályozható szivattyú segítségével nyomjuk át az oszlopokon. Minden egyes oszlop saját szivattyúval rendelkezik. A szubsztát hőmérsékletét 60 °C-ra állítjuk be. Az oszlopról távozó termék glükóz- és fruktóztartalmát meghatározzuk.

Azt tapasztaljuk, hogy a különböző enzimkészítmé-

nyekkel azonos átfolyási sebességek mellett különböző fruktóztartalmú termék állítható elő. Az egyes oszlopok átfolyási sebességét ezért úgy állítjuk be kísérleti úton, hogy minden egyes termék fruktóztartalma az összcukor-tartalom (glükóz + fruktóz) 45%-a legyen.

Az alkalmazott enzimeket, és a 45% fruktóztartalom biztosításához szükséges átfolyási sebességeket a XI. táblázatban ismertetjük.

XI. táblázat

Példa száma	Enzim (20 g szárazanyag)	Szubsztrát átfolyási sebessége (ml/óra)
Összehasonlító	Spezyme IGI (Finnish Sugar Co. terméke)	179
Összehasonlító	Sweetzyme T (NOVO Co., Dánia terméke)	197
Összehasonlító	Takasweet (Miles-Kali Chemie terméke)	94
79.	100–200 mikrométer átmérőjű térhálósított kristályos izomeráz	1364
80.	500–600 mikrométer átmérőjű térhálósított kristályos izomeráz	1121
81.	900–1000 mikrométer átmérőjű térhálósított kristályos izomeráz	1098

A kereskedelmi forgalomban lévő enzimekkel töltött oszlopok átfolyási sebessége jellemző módon ábrázolja a jelenlegi ipari gyakorlatot. A találmány szerinti eljárás

rással térhálósított izomerázkristályokat tartalmazó oszlopok átfolyási sebessége lényegesen nagyobb. Az ipari gyakorlatban a térhálósított kristályos enzim nagy aktivitása következtében lényegesen csökkenthető az oszlop mérete, ami a beruházási és üzemeltetési költségek csökkenéséhez vezet.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

10

1. Eljárás kereszt kötése, vízzel oldható, kristályos glükóz-izomeráz előállítására térhálósítással, *azzal jellemezve*, hogy

15

(a) glutáraldehidet adunk a kristályos glükóz-izomeráz-szuszpenzióhoz, amelyhez a glutáraldehid hozzáadása előtt, vagy a térhálósítási reakció során egy vagy több aminosavot tartalmazó vegyületet, például ammóniumsót vagy aminosavat adunk,

20

(b) a reakciók maradványait vízzel végzett mosással eltávolítjuk a térhálósított kristályokból.

25

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a glutáraldehidet a kristályos száraz enzim tömegére vonatkoztatva 0,4–8 tömeg% mennyiségben adjuk a szuszpenzióhoz.

30

3. Eljárás fruktóz előállítására glükóz izomerizálásával, *azzal jellemezve*, hogy a glükóz izomerizálásának katalizálására az 1. igénypont szerinti előállított, vízzel oldható kereszt kötése kristályos glükóz-izomerázt használjuk.

35

4. A 3. igénypont szerinti eljárás fruktóz folyamatos előállítására, *azzal jellemezve*, hogy glükóztartalmú oldatot vízzel oldható, kereszt kötése kristályos glükóz-izomerázt tartalmazó oszlopon folyatunk keresztül.