

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

N° 81 02153

⑫

⑤4 Procédé de production de glucose-isomérase immobilisée.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 11/02 // 9/92.

⑫2 Date de dépôt..... 4 février 1981.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : Japon, 5 février 1980, n° 12111/1980.

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 32 du 7-8-1981.

⑦① Déposant : Société dite : CPC INTERNATIONAL INC., résidant aux EUA.

⑦② Invention de : Soichiro Ushiro.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Rinuy, Santarelli,
14, av. de la Grande-Armée, 75017 Paris.

La présente invention concerne des enzymes immobilisés et elle a trait, en particulier, à une glucose-isomérase immobilisée et à des procédés permettant de l'obtenir.

5 Le terme "glucose-isomérase" est le terme générique utilisé pour désigner des enzymes qui transforment le glucose en fructose, et leur application principale réside dans la production de fructose à partir de glucose. En fait, des glucoses-isomérases sont couramment utilisées dans
10 l'industrie pour la production de sirops contenant du fructose, par isomérisation du glucose. Cette réaction a été conduite de façon classique par le procédé discontinu, par mise en contact d'une solution renfermant une forte concentration en glucose avec une glucose-isomérase pendant
15 environ 48 heures à une température de 60 à 70°C. Toutefois, attendu que cette réaction est conduite par lots, on s'est heurté à des problèmes tels qu'un taux médiocre d'utilisation de la glucose-isomérase, un changement de couleur du produit dû à la conduite de la réaction pendant des périodes
20 prolongées à hautes températures, le prix de revient élevé du raffinage du produit après la réaction, etc.

En outre, au cours des dernières années, on a mis au point des applications industrielles de procédés d'isomérisation continue utilisant des glucoses-isomérases
25 immobilisées préparées par adsorption ou par fixation d'une glucose-isomérase sur un support spécial, par exemple une résine d'échange ionique ou la diéthylaminoéthyl-cellulose.

Des glucoses-isomérases sont généralement élaborées au sein des cellules de micro-organismes, c'est-à-dire que la majeure partie de la glucose-isomérase produite
30 existe à l'intérieur de la paroi cellulaire ou sur la paroi cellulaire du micro-organisme producteur. Pour cette raison, en vue d'effectuer l'adsorption d'une glucose-isomérase sur un support tel qu'une résine échangeuse d'ion, la glucose-isomérase doit tout d'abord être séparée des cellules du
35 micro-organisme et utilisée sous la forme d'une solution. Certains exemples de procédés utilisant de la sorte une glucose-isomérase sous la forme d'une solution sont décrits

dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 708 397, N° 3 788 945, N° 3 850 751 et N° 3 868 304. Toutefois, lorsqu'on met ces procédés en oeuvre pour réaliser l'adsorption de glucose-isomérase sur un support tel qu'une
5 résine échangeuse d'ion, on se trouve confronté à divers problèmes tels qu'un faible taux d'adsorption de la glucose-isomérase sur la résine échangeuse d'ion ou sur un autre support, et il en résulte que la glucose-isomérase immobilisée obtenue a un faible rendement d'isomérisation dans
10 le processus d'isomérisation continue.

On vient de trouver, conformément à la présente invention, qu'un polysaccharide qui est renfermé dans les solutions de glucose-isomérase mentionnées ci-dessus est adsorbé par concurrence ou préférentiellement sur la résine
15 échangeuse d'ion ou sur un autre support, et que cette adsorption de polysaccharide a pour effet d'inhiber l'adsorption de la glucose-isomérase elle-même sur la résine échangeuse d'ion ou sur une autre forme de support. En fait, on a constaté qu'un polysaccharide adsorbé compliquait
20 l'immobilisation de glucoses-isomérases sur des supports tels que des résines échangeuses d'ions. Pour cette raison, la glucose-isomérase adsorbée sur la résine échangeuse d'ion est en faible proportion. Il y a lieu de remarquer qu'au sens du présent mémoire, le terme "polysaccharides" désigne des
25 saccharides de poids moléculaire élevé qui ne sont pas libérés dans le dialysat et qui sont retenus dans la solution de glucose-isomérase lorsque ladite solution est dialysée pendant environ 16 heures vis-à-vis d'eau désionisée contenant 10 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de $CoCl_2$.

Selon un autre aspect de la présente invention, on a découvert qu'il était possible d'adsorber une grande quantité de glucose-isomérase sur un support tel qu'une
30 résine échangeuse d'ions utilisée pour l'immobilisation de ladite glucose-isomérase si le polysaccharide contaminant est tout d'abord éliminé de la matière obtenue par culture
35 d'un micro-organisme producteur de glucose-isomérase. On a trouvé également qu'il était possible d'obtenir un rendement élevé dans la réaction d'isomérisation si l'on utilisait la

glucose-isomérase immobilisée obtenue de cette façon dans un processus d'isomérisation continue. Partant de ce résultat, la Demanderesse a déposé aux Etats-Unis d'Amérique le 11 janvier 1979 la demande de brevet N° 2839. La présente invention est l'aboutissement d'études ultérieures portant sur la séparation du polysaccharide de la matière obtenue par culture des micro-organismes producteurs de glucose-isomérase.

La présente invention a trait à un procédé de production d'une glucose-isomérase immobilisée, procédé qui consiste à ajouter un surfactant non ionique à une matière obtenue par culture d'un micro-organisme producteur de glucose-isomérase ou de cellules humides obtenues par cette culture, ou d'une suspension aqueuse de ces cellules. La matière obtenue par culture, la masse cellulaire humide ou la suspension aqueuse de cellules est ensuite autolysée de manière à solubiliser la glucose-isomérase sans qu'il y ait de solubilisation des polysaccharides présents, et afin d'obtenir ainsi une solution de glucose-isomérase ne renfermant pas ou pratiquement pas de polysaccharide. Cette solution de glucose-isomérase est ensuite mise en contact avec un support qui est capable d'adsorber la glucose-isomérase et cette dernière est adsorbée sur ledit support.

En ce qui concerne la matière obtenue par culture d'un micro-organisme élaborant la glucose-isomérase, il est possible d'utiliser toute matière obtenue en cultivant un micro-organisme producteur de glucose-isomérase. Par exemple, il est possible d'utiliser une matière obtenue en cultivant un actinomycète tel que Streptomyces olivochromogenes, ou une bactérie telle que Lactobacillus brevis ou Bacillus coagulans.

La matière obtenue par culture est autolysée par addition directe d'un surfactant non ionique, ou bien il est également possible de conduire l'autolyse par addition d'un surfactant non ionique à une suspension aqueuse des cellules humides séparées de la matière obtenue par culture par des moyens convenables, par exemple par centrifugation. Le surfactant est une substance tensio-active portant à la fois

des groupes hydrophiles et hydrophobes dans sa structure moléculaire et on l'utilise pour influencer la tension interfaciale. Des exemples de surfactants disponibles dans le commerce pour la conduite de l'autolyse comprennent les produits "TRITON" (fabriqué par Sigma Co., Etats-Unis d'Amérique), "BRIJI" (fabriqué par Kao Atlas, Japon) ou "TWEEN" (fabriqué par Tokyo Kasei Kogyo Co., Japon). Il est également possible d'utiliser tout surfactant non ionique capable de solubiliser la glucose-isomérase sans solubilisation des polysaccharides cellulaires.

Un taux convenable d'addition du surfactant non ionique se situe entre 0,1 et 20 %, de préférence entre 0,5 et 5 % par rapport au poids des cellules séchées.

Après que le pH a été ajusté entre 5 et 8, de préférence entre 5,5 et 7,5, la matière obtenue par culture, la masse cellulaire humide ou la suspension aqueuse de cellules est autolysée à une température de 30 à 70°C, de préférence de 45 à 60°C pendant 8 à 24 heures, de préférence pendant 10 à 15 heures, sous agitation. L'autolyse ainsi conduite donne une solution renfermant de la glucose-isomérase solubilisée, mais ne contenant pas ou presque pas de polysaccharide. Cela peut être mis en évidence par l'analyse de la solution par la méthode au phénol et à l'acide sulfurique après dialyse.

On laisse de préférence refroidir à la température ambiante l'autolysat ainsi obtenu et on sépare la fraction solide par une opération convenable telle qu'une filtration ou une centrifugation. Avant la séparation de la matière solide, il est efficace d'ajouter un solvant organique, par exemple du méthanol, de l'éthanol, du propanol, de l'isopropanol, de l'acétone, du tertio-butanol ou du p-dioxanne, l'isopropanol étant particulièrement apprécié.

L'addition du solvant organique doit être faite dans la mesure où il n'y a pas de précipitation de glucose-isomérase. Par exemple, dans le cas de l'isopropanol, l'addition doit être faite en proportion de 30 à 45 %, de préférence de 36 à 40 % par rapport à l'autolysat ci-dessus. Il est également possible d'ajouter le solvant organique

avant la fin de l'autolyse. Dans ce cas, la température de conduite de l'autolyse doit être choisie de manière à ne pas volatiliser le solvant organique. On obtient ainsi une solution de glucose-isomérase qui ne renferme pas ou presque pas de polysaccharide.

En ce qui concerne la conduite de l'adsorption de la solution de glucose-isomérase ainsi obtenue, si cette solution ne renferme aucun solvant organique, il est possible de l'utiliser tel quel. Toutefois, lorsqu'un solvant organique a été ajouté à la solution, la glucose-isomérase est d'abord précipitée par une opération convenable, par exemple par addition, à la solution, de chlorure ou de sulfate de magnésium jusqu'à une concentration de 10 à 200 mM, de préférence de 40 à 60 mM. Ensuite, la liqueur surnageante est séparée par exemple par centrifugation, et le précipité de glucose-isomérase est dissous dans de l'eau traitée par échange d'ions. On obtient ainsi une glucose-isomérase ne renfermant pas ou presque pas de polysaccharide.

La solution contenant la glucose-isomérase, qui a été obtenue de la manière indiquée ci-dessus et qui a été totalement ou presque totalement purifiée en ce qui concerne le polysaccharide, est ensuite mise en contact avec un support adsorbant la glucose-isomérase, et cette dernière est adsorbée sur ce support.

Des supports qui conviennent à l'adsorption de glucose-isomérase sont par exemple des résines échangeuses d'ions adsorbant la glucose-isomérase, la diéthylaminoéthyl-cellulose, le carbonate de magnésium basique, la silice colloïdale, le carbone actif et l'alumine dénommée "Controlled Pore Alumina".

Des exemples de résines échangeuses d'ions adsorbant la glucose-isomérase sont les résines "Amberlite IRA-904", "Amberlite IRA-938", "Amberlite IRA-93" (toutes ces dénominations sont des marques de produits de la firme Tokyo Yuki Kagaku Kogyo Co., Ltd), les résines "Duolite A-2", "Duolite A-7", "Duolite S-3", "Duolite ES-561", "Duolite ES-562" et "Duolite ES-568" (toutes ces dénominations sont des marques de produits de la firme Diamond Shamrock Chemical Co., Ltd., des Etats-Unis d'Amérique).

Un exemple de diéthylaminoéthylcellulose est le produit de marque "Selectacel-20" de la firme Braun Co., de la République fédérale d'Allemagne. Des silices colloïdales convenables sont les produits "LUDOX HS-30", "LUDOX HS-40", "LUDOX AM", "LODOX TM" (toutes ces dénominations correspondent à des produits de la firme DuPont Co., Ltd., des Etats-Unis d'Amérique), et les produits "Snowtex 20", "Snowtex 30" et "Snowtex N" (toutes ces dénominations correspondent à des marques de produits de la firme Nissan Kagaku Co., Ltd.).

Le produit appelé "Controlled Pore Alumina" est un produit de la firme Corning Co., Ltd.

Des carbones actifs convenables comprennent les produits "Darco S-51" et "Darco G060" (dénominations commerciales de produits de la firme danoise Atlas Co., Ltd.).

Au moment de la conduite de l'adsorption de la glucose-isomérase par contact d'une solution chargée de glucose-isomérase ne renfermant pas ou presque pas de polysaccharide avec l'un des supports adsorbant la glucose-isomérase mentionnés ci-dessus, ladite solution de glucose-isomérase, telle quelle ou après que sa concentration a été ajustée à une valeur convenable (concentration en glucose-isomérase de 50 à 1000 U/ml, de préférence d'environ 300 U/ml) par concentration ou dilution, est mise en contact avec le support. Cette opération peut avoir lieu dans une colonne ou dans quelque autre récipient convenablement choisi. Aux fins du présent mémoire, une unité d'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui forme une millimole de fructose en une minute par incubation avec une solution décimolaire de glucose en présence de $MgCl_2$ 0,01 M et de $CoCl_2$ 0,001 M.

Lorsque le support est une résine échangeuse d'ions, il est possible que le groupe échangeur présente l'une quelconque des formes OH, Cl, SO_4 , etc., mais il est très apprécié d'utiliser la forme Cl dérivée de NaCl ou de HCl.

En outre, au moment de l'adsorption de glucose-isomérase sur les supports mentionnés ci-dessus, il est désirable que le pH de la solution contenant la glucose-

isomérase se situe dans une plage de 4 à 11, notamment dans la plage d'environ 7 à 8. De plus, la température au moment de l'adsorption de la glucose-isomérase doit se situer entre 4 et 60°C, et elle doit notamment être de l'ordre de la température ambiante.

Lorsque l'adsorption de glucose-isomérase est effectuée dans une colonne, la solution mentionnée ci-dessus, contenant la glucose-isomérase, doit être introduite dans ladite colonne à un débit correspondant à une VS de 0,5 à 10 (VS désigne la vitesse spatiale, qui est la quantité horaire de solution traversant la colonne, exprimée proportionnellement au volume de lit de la colonne), et de préférence à une VS de 1,0. A titre de variante, l'adsorption peut être conduite par circulation de la solution renfermant la glucose-isomérase à travers la colonne pendant une période de 3 à 24 heures, de préférence pendant une période de 10 à 15 heures.

Lorsque l'adsorption de glucose-isomérase est effectuée dans un récipient convenable selon un mode discontinu d'adsorption, la solution contenant la glucose-isomérase mentionnée ci-dessus doit être mise en contact avec les supports précités pendant une période de 30 minutes à 24 heures, de préférence pendant une période de 2 à 5 heures, avec agitation du mélange, et la glucose-isomérase est ainsi adsorbée sur le support choisi.

En conséquence, lorsqu'on suit le mode opératoire ci-dessus pour la mise en contact d'une solution contenant de la glucose-isomérase et ne renfermant pas ou pratiquement pas de polysaccharide avec un support adsorbant la glucose-isomérase et pour l'adsorption dudit enzyme sur ce support, on obtient une glucose-isomérase immobilisée.

Conformément à la présente invention, en utilisant une solution de glucose-isomérase qui a été obtenue par une séparation sélective de la fraction de polysaccharides de la matière obtenue par culture d'un micro-organisme producteur de glucose-isomérase, on peut donc aisément obtenir une glucose-isomérase immobilisée qui a une très grande efficacité d'adsorption relativement à des

supports adsorbant la glucose-isomérase et qui se prête à la mise en oeuvre de réactions continues d'isomérisation par glucose-isomérase avec des rendements extrêmement élevés. Il en résulte qu'il est possible de réduire grandement aussi bien le coût de production de glucose-isomérase immobilisée que le coût de l'enzyme utilisé dans la réaction d'isomérisation.

D'autres détails de la présente invention ressortent des exemples suivants.

EXEMPLE 1

On cultive Streptomyces olivochromogenes (FERM P 1640, ATCC 21 114), micro-organisme producteur de glucose-isomérase, dans un milieu liquide (2 % de xylose, 4 % d'amidon de maïs, 4 % d'extrait soluble de maïs, 0,1 % de glycine, 0,2 % de nitrate d'ammonium, 0,05 % de sulfate de magnésium heptahydraté) à 30°C pendant environ 50 heures sous agitation par secousses. Les cellules microbiennes sont recueillies par centrifugation du produit de culture à 10 000 tr/min pendant 20 minutes. Après homogénéisation des cellules recueillies dans un mélangeur, on obtient 2700 g de cellules humides. La teneur en humidité des cellules humides est déterminée par lyophilisation d'une portion des cellules humides et pesée des cellules séchées. On la trouve égale à 80 %. Une portion des cellules humides est également désintégrée par l'action des ultrasons et l'activité en glucose-isomérase est déterminée. On trouve que l'activité est égale à 384 unités/g de cellules humides.

On charge 250 g de cellules humides (50 g de cellules humides séchées contenant 96 000 unités d'activité en glucose-isomérase) dans un ballon de 2 litres et on les met en suspension dans de l'eau traitée par échange ionique. On ajoute à cette suspension 500 mg de "TRITON X-100" (produit de la firme Sigma Co., des Etats-Unis d'Amérique) en proportion de 1 % par gramme de cellules séchées, on ajuste le pH à 6,0 avec de l'acide acétique 1 N et on ajuste la quantité totale à 1000 g par addition d'eau traitée par échange d'ions. Cette suspension cellulaire est autolysée à

50°C pendant 12 heures sous agitation à 200 tr/min. Après refroidissement à la température ambiante de l'autolysat ainsi obtenu, on ajoute 582 g d'isopropanol froid tout en agitant modérément. On filtre ce mélange sur "Celite 535" (auxiliaire de filtration fabriqué par la firme Junsei Chemical Co.), en utilisant une trompe aspirante et on lave correctement les cellules résiduelles avec environ 200 g d'une solution à 38 % en poids/poids d'isopropanol.

On rassemble le filtrat et la liqueur de lavage (1700 g). On appelle solution de glucose-isomérase A le mélange ainsi obtenu.

La détermination de l'activité en glucose-isomérase de la Solution A donne un résultat de 95 600 unités, ce qui correspond à 99,6 % de l'activité totale en glucose-isomérase des cellules utilisées pour la solubilisation.

On introduit ensuite 2700 g de cette solution A de glucose-isomérase dans un b cher de 2 litres et on y ajoute, en agitant, 17 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; on continue d'agiter pendant une heure à la température ambiante.

Après avoir centrifugé cette solution à 15 000 tr/min pendant 15 minutes, on jette la liqueur surnageante par décantation et on dissout le précipité dans un volume d'environ 30 ml d'eau traitée par échange d'ions. On obtient ainsi 43,2 g d'une solution raffinée de glucose-isomérase que l'on appelle solution P.

On trouve comme résultat de la détermination de l'activité en glucose-isomérase et de la teneur totale en saccharides, mesurée par la méthode au phénol et à l'acide sulfurique, que la solution P contient 93 890 unités d'activité en glucose-isomérase. Cela correspond à 97,8 % de l'activité totale en glucose-isomérase des cellules soumises à la solubilisation et à une teneur totale en saccharides de 2,03 μg par unité d'activité en glucose-isomérase.

On introduit ensuite 4,6 g de solution P de glucose-isomérase (contenant 9998 unités de glucose-isomérase) dans une colonne de 2,2 x 20 cm garnie de 20 ml de support consistant en "Amberlite IRA-904" humide et on fait

circuler cette solution à travers la colonne pendant environ 18 heures à une VS égale à 1 et à la température ambiante.

Il en résulte l'adsorption sur le support de 100 % de la glucose-isomérase mise en jeu.

5

EXEMPLE 2

On charge dans un ballon de 2 litres 250 g de cellules humides (50 g de cellules séchées ; 96 000 unités de glucose-isomérase) préparées conformément au mode opératoire décrit dans l'exemple 1, et on les met en suspension dans 700 g d'eau traitée par échange d'ions. On ajoute à la suspension cellulaire 500 mg de "TWEEN 60" (produit de la firme Tokyo Kasei Kogyo Co.) en proportion de 1 % par rapport au poids de cellules sur base sèche, puis on ajuste le pH à 6,0 par addition d'acide acétique 2 N et on ajuste la quantité totale à 1000 g par addition d'eau traitée par échange d'ions. Cette suspension cellulaire est autolysée à 50°C pendant 12 heures sous agitation à 200 tr/min. Après refroidissement à la température ambiante de la solution d'autolysat ainsi obtenue, on ajoute 582 g d'isopropanol froid en agitant modérément. On filtre ce mélange sur un auxiliaire de filtration consistant en "Celite 535" en utilisant une trompe d'aspiration et on lave correctement les cellules résiduelles avec environ 200 g d'une solution d'isopropanol à 38 % en poids/poids. On rassemble le filtrat et la liqueur de lavage (1700 g) et on donne à ce mélange le nom de Solution B de glucose-isomérase.

Il résulte de la détermination de l'activité en glucose-isomérase de la Solution B que 94 850 unités de glucose-isomérase ont été solubilisées, ce qui correspond à 98,8 % de l'activité totale en glucose-isomérase des cellules soumises à la solubilisation.

On introduit ensuite 2700 g de solution B de glucose-isomérase dans un bécher de 2 litres et on y ajoute en agitant 27 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; on continue d'agiter pendant une heure à la température ambiante. Après centrifugation de cette solution à 25 000 tr/min pendant 15 minutes, on jette la liqueur surnageante par décantation et on dissout le

précipité dans environ 30 litres d'eau traitée par échange d'ions. On obtient ainsi 44,1 g de solution Q de glucose-isomérase raffinée.

Comme résultat de la détermination de l'activité en glucose-isomérase et de la teneur totale en saccharides, on trouve que la solution Q renferme 93 410 unités d'activité en glucose-isomérase, ce qui correspond à 97,3 % de l'activité totale en glucose-isomérase des cellules soumises à la solubilisation, et une teneur en saccharides totaux de 2,18 µg par unité d'activité en glucose-isomérase.

On introduit ensuite 4,72 g de cette solution Q de glucose-isomérase (contenant 9998 unités de glucose-isomérase) dans une colonne de 2,2 x 20 cm garnie de 20 ml de résine "Amberlite IRA-904" (support) humide et on la fait circuler à travers la colonne pendant environ 16 heures à VS 1 et à la température ambiante.

Il en résulte que 100 % de la glucose-isomérase mise en jeu sont adsorbés sur le support.

20 EXEMPLE 3

On introduit 250 g de cellules humides (50 g de cellules séchées), 96 000 unités de glucose-isomérase, préparées conformément au mode opératoire décrit dans l'exemple 1, dans un ballon de 2 litres et on les met en suspension dans 700 g d'eau traitée par échange d'ions. On ajoute 500 mg de produit "BRIJI" 35 (fabriqué par la firme Kao Atlas) à la suspension cellulaire en proportion de 1 % par rapport au poids des cellules séchées, on ajuste le pH à 6,0 avec de l'acide acétique 1 N et on ajuste la quantité totale à 1000 g par addition d'eau traitée par échange d'ions. Cette suspension cellulaire est autolysée à 50°C pendant 12 heures sous agitation à 200 tr/min. Après refroidissement à la température ambiante de la solution d'autolysat ainsi obtenue, on ajoute 582 g d'isopropanol froid en agitant modérément.

On filtre ce mélange sur un auxiliaire de filtration consistant en "Celite 535" en utilisant une trompe d'aspiration et on lave correctement les cellules résiduelles

avec environ 200 g d'une solution à 38 % en poids/poids d'isopropanol. On rassemble le filtrat et la liqueur de lavage (1700 g) et on appelle ce mélange solution C de glucose-isomérase. Comme résultat de la détermination de l'activité en glucose-isomérase de cette solution C, on trouve que 93 600 unités de glucose-isomérase ont été solubilisées ; cela correspond à 97,5 % de l'activité totale en glucose-isomérase des cellules soumises à la solubilisation.

On introduit ensuite 2700 g de solution C de glucose-isomérase dans un b cher de 2 litres et on ajoute, en agitant, 17 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. On continue d'agiter pendant une heure à la température ambiante. Après centrifugation de cette solution à 15 000 tr/min pendant 15 minutes, on jette la liqueur surnageante par décantation et on dissout le précipité dans environ 30 ml d'eau traitée par échange d'ions. On obtient ainsi 45,3 g de solution R de glucose-isomérase raffinée.

Comme résultat de la détermination de l'activité en glucose-isomérase et de la teneur totale en saccharides, on trouve que la solution R contient 93 210 unités d'activité en glucose-isomérase, ce qui représente 97,1 % de l'activité totale en glucose-isomérase dans les cellules soumises à la solubilisation, et 2,35 μg de teneur en saccharides totaux par unité d'activité en glucose-isomérase.

On introduit ensuite 4,86 g de cette solution R de glucose-isomérase (contenant 10 000 unités de glucose-isomérase) dans une colonne de 2,2 x 20 cm garnie de 20 ml de résine "Amberlite IRA-904" (support) humide et on la fait circuler à travers la colonne pendant environ 16 heures à VS 1 et à la température ambiante.

Il en résulte que 100 % de la glucose-isomérase mise en jeu ont été adsorbés sur le support.

EXEMPLE COMPARATIF

On charge 250 g de cellules humides (50 g de cellules séchées, 96 000 unités de glucose-isomérase), préparées conformément au mode opératoire décrit dans

l'exemple 1, dans un ballon de 2 litres et on les met en suspension dans 700 g d'eau traitée par échange d'ions. On ajuste le pH à 6,0 avec de l'acide acétique 1 N. On ajoute à cette suspension cellulaire 0,05 % de lysozyme/g de cellules
5 sur base sèche (25 mg, produit de la firme Boehringer Mannheim) et on ajuste la quantité totale à 1000 g avec de l'eau traitée par échange d'ions. Cette suspension cellulaire est lysée à 50°C pendant 12 heures sous agitation à 200 tr/min. Après refroidissement à la température ambiante
10 de l'autolysat ainsi obtenu, on ajoute 582 g d'isopropanol froid en agitant modérément. On filtre ce mélange sur un auxiliaire de filtration consistant en "Celite 535" en utilisant une trompe d'aspiration et on lave correctement les cellules résiduelles avec environ 200 g d'isopropanol à 38 %
15 en poids/poids, et on appelle solution D de glucose-isomérase le produit ainsi obtenu. Comme résultat de la détermination de l'activité en glucose-isomérase de la solution D, on trouve que 93 980 unités de glucose-isomérase ont été solubilisées, ce qui correspond à 97,9 % de l'activité totale
20 en glucose-isomérase dans les cellules soumises à la solubilisation.

On introduit ensuite 1700 g de cette solution D de glucose-isomérase dans un b cher de 2 litres et on y ajoute, en agitant, 17 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; on continue d'agiter
25 pendant une heure à la température ambiante. Après centrifugation de cette solution à 15 000 tr/min pendant 15 minutes, on jette la liqueur surnageante par décantation et on dissout le précipité dans environ 30 ml d'eau traitée par échange d'ions. On obtient ainsi 44,7 g de solution S de
30 glucose-isomérase raffinée.

Comme résultat de la détermination de l'activité en glucose-isomérase et de la teneur en saccharides totaux, on trouve que la solution S contient 92 930 unités d'activité en glucose-isomérase, ce qui correspond à 96,8 % de
35 l'activité totale en glucose-isomérase dans les cellules soumises à la solubilisation, et une teneur en saccharides totaux de 8,38 μg par unité d'activité en glucose-isomérase. Comme indiqué ci-dessus, la teneur totale en saccharides de

cette solution est notablement plus forte que celle des solutions préparées conformément au procédé de l'invention.

5 On introduit ensuite 4,81 g de la solution de glucose-isomérase (contenant 10 000 unités de glucose-isomérase) dans une colonne de 2,2 x 20 cm garnie avec 20 ml de résine "Amberlite IRA-904" (support) humide et on la fait circuler à travers la colonne pendant environ 16 heures à VS 1 et à la température ambiante.

10 En conséquence, 61,8 % de la glucose-isomérase mise en jeu ont été adsorbés sur le support.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de glucose-isomérase immobilisée, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter un surfactant non ionique à une matière obtenue par culture d'un
- 5 micro-organisme producteur de glucose-isomérase ou à des cellules humides obtenues à partir de cette matière ou d'une suspension aqueuse de ces cellules, à autolyser la matière obtenue par culture, la masse cellulaire humide ou la suspension aqueuse de cellules de manière à solubiliser la
- 10 glucose-isomérase sans solubiliser les polysaccharides présents et à obtenir ainsi une solution de glucose-isomérase ne contenant pas ou presque pas de polysaccharides, puis à faire entrer la solution de glucose-isomérase en contact avec un support qui est capable d'adsorber la glucose-isomérase,
- 15 et à adsorber cette dernière sur ledit support.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le surfactant non ionique est choisi dans le groupe des produits "Triton", "Briji" et "Tween".