



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

207702
(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
C 12 P 19/02

(22) Přihlášeno 16 11 73
(21) (PV 7872-73)

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 03 84

(72)
Autor vynálezu

THOMPSON KENNETH NORDAHL, JOHNSON RICHARD ALBERT a
LLOYD NORMAN EDWARD, CLINTON (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu

STANDARD BRANDS INCORPORATED, NEW YORK (Sp. st. a.)

(54) Způsob enzymatické přeměny glukózy na fruktózu

1

Vynález se týká způsobu enzymatické přeměny glukózy na fruktózu, zvláště enzymatické přeměny části glukózy v roztoku na fruktózu.

Pro přeměnu glukózy na fruktózu nebo pro výrobu roztoku s obsahem fruktózy, je známa celá řada způsobů. Tyto způsoby je možno rozdělit do tří širokých kategorií. V první kategorii se sacharóza mění na glukózu a fruktózu působením kyseliny nebo invertázy.

V druhé kategorii se glukóza mění na fruktózu působením alkalických katalyzátorů. Existuje celá řada publikací a patentových spisů, které se týkají různých alkalických katalyzátorů a jejich použití k přeměně glukózy na fruktózu. Příkladem těchto postupů mohou být metody, uvedené například v patentových spisech USA č. 2 487 121, 2 746 889, 2 354 665, 3 285 245, 3 285 776, 3 383 245 a 3 305 395. Izomerace za alkalických podmínek je však spojena s řadou nevýhod. Jde například o to, že způsob není selektivní a z toho důvodu vzniká celá řada nežádoucích vedlejších produktů, například velká množství různě zabarvených sloučenin a látky kyselé povahy. Je tedy nutno produkty tohoto způsobu čistit k odstranění těchto nežádoucích vedlejších produktů, přičemž tyto metody jsou složité a velmi nákladné.

2

Třetí kategorií pro výrobu roztoků s obsahem fruktózy je enzymatická přeměna glukózy, zvláště potom roztoku glukózy, jako kukuřičného sirupu, na fruktózu. K tomu účelu je možno užít celé řady známých mikroorganismů, které produkují izomerázu glukózy. Například v časopise Science, sv. 125, str. 648 až 649 [1957] je uvedeno, že enzym, produkováný mikroorganismem *Pseudomonas hydrophilla*, způsobuje isomeraci glukózy na fruktózu. Britský patentový spis číslo 1 103 394 a japonský patentový spis č. 7428 [1966] Takasakiho uvádí, že mikroorganismy, příslušející k rodu *Streptomyces*, například *Streptomyces flavovirens*, *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces echinatus* a *Streptomyces albus* produkují isomerázu glukózy. Existuje celá řada dalších mikroorganismů, které jsou rovněž schopny tuto isomerázu produkovat, například *Aerobacter cloacae*, *Bacillus megaterium*, *Acetobacter suboxydans*, *Acetobacter melanogenus*, *Acetobacter roseus*, *Acetobacter oxydans*, *Bacillus fructose* a *Lacto-bacillus fermenti*.

Aby byl způsob přeměny glukózy isomerázou ekonomický, je nutné užít isomerázy za takových podmínek, při nichž se dosáhne maximálních výtěžků fruktózy při použití minimálního množství isomerázy glukózy. Mimoto by měly být podmínky pro isomeraci

takové, aby vznikalo co nejmenší množství nežádoucích vedlejších produktů.

Isomeráza glukózy je produkována svrchu uvedenými mikroorganismy převážně intracelulárně. To znamená, že hlavní podíl této isomerázy se nachází uvnitř a/nebo ve stěně mikroorganismu. Při běžných způsobech, při nichž jsou tyto buňky užity k isomeraci glukózy na fruktózu, se isomeráza uvolňuje v průběhu isomerace nebo se z buněk extrahuje. V obou těchto případech se v podstatě dostává do roztoku. Bylo by velmi drahé a složité získat isomerázu z roztoku zpět, aby ji bylo možno užít i pro další isomerační reakce.

V článku „A Continuous Glucose Isomerization Method by an Absorbed Enzyme Column“ Tsumury aj., který byl publikován v Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 14 (12) (1967), byla isomeráza glukózy, produkováná kmenem *Streptomyces phaeochromogenes* vázána na DEAE-Sephadex. Takto vázaný enzym byl užit ve formě sloupce, kterým kontinuálně protékal roztok glukózy. Při průtoku sloupcem se glukóza dostávala do styku s vázaným enzymem, čímž docházelo ke kontinuální produkci fruktózy. Přestože způsob, uvedený v této publikaci, zřejmě znamená částečně vyřešení problému jak znovu užít isomerázy glukózy, byl proveden v tak malém měřítku, že získané hodnoty nelze převést do obchodní praxe. Bylo by proto obtížné, ne-li nemožné, prostě převést tento postup do průmyslových rozměrů a vyrobit tak roztok s obsahem glukózy a fruktózy při zachování žádané kvality.

Z tohoto důvodu stále ještě trvá potřeba kontinuálního způsobu enzymatické přeměny glukózy na fruktózu v průmyslovém měřítku.

Předmětem vynálezu je způsob pro enzymatickou přeměnu glukózy na fruktózu, při němž se roztok glukózy o viskozitě 5 až 1000 Pa, o pH 6 až 9, s obsahem 5 až 80 hmotnostních % glukózy, udržuje na teplotě 20 až 80 °C, přičemž se nechá procházet vrstvou isomerázy glukózy, vyznačující se tím, že roztok prochází vrstvou isomerázy glukózy, vázané na nosič, kterým je derivát celulózy nebo aniontoměničová pryskyřice a isomeráza, má účinnost 3 až 1000, s výhodou alespoň 20 IGIU v cm² vrstvy a stabilitu 50 až 1200 hodin, s výhodou alespoň 300 a zvláště alespoň 400 hodin.

Různé výrazy a termíny, užívané v průběhu přihlášky jsou definovány takto:

Stabilita

Stabilita se stanoví tak, že se dostatečné množství vázané isomerázy glukózy uloží do sloupce tak, aby sloupec obsahoval 1000 až 4000 IGIU. Sloupcem se nechá procházet 3 M roztok glukózy o pH 6,5, přičemž tento roztok ještě dále obsahuje 0,001 M CoCl₂ a 0,005 M MgSO₄, při rychlosti 10 až 200 ml/hod. Teplota sloupce se udržuje na 60 °C.

Po 4 hodinách se určí podíl glukózy, který se mění na fruktózu, aby bylo prokázáno, že vrstva vázané isomerázy je v rovnováze. Index účinnosti vázané isomerázy glukózy se vypočítá tímto způsobem: účinnost = $\frac{R}{E} \log \left[\frac{0,504}{(0,504 - I)} \right]$, kde I je frakce glukózy přeměněná na fruktózu, R je rychlost průtoku v ml za hodinu a E je počet IGIU, původně přítomných ve sloupci.

Index aktivity se stanoví periodicky a doba, po které index účinnosti klesne na polovinu původní hodnoty, je stabilita v hodinách.

Barevné jednotky

Barva byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbce při 450 nm a 600 nm v příslušně zředěné kapalině v kyvetách o šířce 1 cm a získaná hodnota byla srovnávána s hodnotou získanou pro vodu. Jako spektrofotometrie byl užit přístroj Beckman DK-2A, vyrobený firmou Beckman Instrument Company. Zabarvení bylo vypočítáno podle následujícího vzorce:

$$\text{Barevné jednotky} = \frac{(109) (A_{450} - A_{600})}{C}$$

A₄₅₀ = absorbce při 450 nm

A₆₀₀ = absorbce při 600 nm

C = koncentrace v g/100 ml.

Obsah fruktózy v roztoku po isomeraci

Obsah fruktózy v roztoku po isomeraci se stanoví změnou specifické rotace, k níž v důsledku isomerace dochází. Specifická rotace byla měřena přístrojem Bendix Corporation NPL Model 969 Automatic Polarimeter. Rotace byla stanovena při koncentraci 2,5 g/100 ml ve skleněné kyvetě, při termostaticky udržované teplotě 25 °C. Dráha kyvety byla 50 mm. Specifická rotace byla stanovena na počátku isomerace po slití všech složek roztoku. Změna obsahu fruktózy byla stanovena druhým měřením specifické rotace po isomeraci. Změna obsahu fruktózy byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{Procenta fruktózy} = \frac{100 (A_1 - A_0)}{-138,9}$$

A₁ = specifická rotace roztoku po isomeraci,

A₀ = specifická rotace roztoku glukózy před isomerací.

Ve vzorci znamená faktor -138,9 změnu specifické rotace, k níž by došlo při úplné přeměně glukózy na fruktózu.

IGIU

IGIU je zkratka pro International Glucose Isomerace Unit, to jest takové množství en-

zymu, které přemění 1 mmol glukózy na fruktózu v roztoku, který obsahuje v 1 litru 2 móly glukózy, 0,02 molu síranu hořečnatého a 0,001 molů chloridu kobaltnatého, při pH 6,84 až 6,85 (0,2 M maleátu sodného) při teplotě 60 °C.

Způsob podle vynálezu má řadu zřetelných výhod. Jde o způsob, který je možno snadno a hospodárně provádět v průmyslovém měřítku. Mimoto je tento postup velmi účinný, pokud jde o využití glukózo isomerázy na výrobu roztoku s obsahem glukózy a fruktózy při minimálním zabarvení, malém obsahu popelovin a psikózy. Mimoto je možno tento postup provádět kontinuálně, což znamená velkou výhodou.

Vlastnosti roztoku, který obsahuje glukózu jsou poměrně důležité pro stanovení přesných podmínek pro isomeraci. Pro výrobu roztoků s obsahem glukózy je známa celá řada metod. Jde například o způsoby, které se průmyslově běžně užívají a při nichž se kukuřičný škrob rozkládá na glukózu. Tyto metody je možno rozdělit do tří skupin. První skupina obsahuje způsoby, při nichž se hydrolyzuje škrob na glukózu zředěným roztokem kyseliny. Ve druhé skupině jsou způsoby enzymatické, které se provádí za kyselé reakce, čímž dochází k přeměně škrobu na glukózu. Ve třetí skupině se užívá po sobě dvou enzymů, přičemž první enzym zkapaňuje škrob a druhý enzym mění kapalný škrob na glukózu. Při provádění způsobu podle vynálezu je výhodné užít roztoku glukózy, vyrobených podle posledních dvou způsobů, protože tyto roztoky obvykle obsahují větší množství dextrózy v sušině, malé množství kyseliny, méně intenzivní zabarvení a nižší množství oligosacharidů. Roztok s obsahem glukózy je možno čistit, je-li to žádoucí, a to obvyklými způsoby před jeho použitím k provádění způsobu podle vynálezu.

Viskozita roztoku glukózy se má pohybovat v rozmezí 0,0005 až 0,1 Pa, s výhodou 0,002 až 0,2 Pa. V případě, že viskozita roztoku je příliš vysoká, je tlak, který vykonává roztok na vrstvu vázané isomerázy, příliš vysoký. Snížení tlaku má za následek i snížení průtokové rychlosti, takže doba pobytu roztoku ve vrstvě isomerázy může být příliš dlouhá, vzhledem k efektivnímu využití enzymu. Protože doba, po kterou je roztok udržován v podmínkách isomerace může být příliš dlouhá, vzniká potom příliš syté zabarvení a dochází k výrobě psikózy.

Koncentrace glukózy v roztoku se má pohybovat v rozmezí 5 až 80 hmotnostních %, s výhodou 40 až 60 hmotnostních %.

Roztok glukózy má mít pH v rozmezí 6 až 9, s výhodou 6,5 až 8, zejména 7 až 7,5. Je důležité udržet pH roztoku glukózy v tomto rozmezí v průběhu isomerace, jinak dochází k rychlé inaktivaci isomerázy a/nebo k tvorbě velkých množství nežádoucích vedlejších produktů, jako barviv a psikózy. Roztok glukózy může obsah různé kovové ionty jako aktivátory a/nebo stabilizační látky pro iso-

merázy, například rozpustné soli kobaltu, hořčíku apod.

Vlastnosti vrstvy vázané isomerázy glukózy jsou velmi důležité pro kvalitu budoucího roztoku fruktózy a glukózy, který má být vyroben, a pro komerční využití způsobu podle vynálezu. Vrstva má obsahovat alespoň 3 IGIU isomerázy na cm^2 , s výhodou alespoň 20 IGIU v cm^2 . V případě, že vrstva obsahuje méně než 3 tyto jednotky na cm^2 , je nutno užít příliš velké vrstvy k dosažení isomerace ekvivalentního množství dextrózy. To může vést ke vzniku dalších problémů, například možnosti vyššího tlaku, nutnosti delší doby pobytu roztoku ve vrstvě, a tím i vyšších nákladů, protože je nutno užít zařízení mnohem větších rozměrů. Mimoto s větší hloubkou vrstvy dochází také k větší tendenci ke spékání v důsledku vyššího tlaku, kterého je nutno použít k zajištění průchodu roztoku vrstvou. Poměrně nízká vrstva nemá možnost se do větší míry spékat, zatímco hluboké vrstvy mají daleko vyšší tendenci ke spékání. Jakmile ke spékání dojde, dojde i k většímu poklesu tlaku při průchodu vrstvou, a to tak, že je potom nutno užít výjimečně vysokých tlaků k dosažení průchodu glukózy, takže k uložení vrstvy již není vzhledem k vysokému tlaku možno užít zařízení běžné konstrukce.

Stabilita vázané isomerázy glukózy má mít hodnotu alespoň 50 hodin, s výhodou alespoň 300 hodin, zejména alespoň 400 hodin.

Vrstvu isomerázy glukózy je možno vyrobit jakýmkoli běžným způsobem, lze například vázat isomerázu na inertní nosiče, jako diethylaminoethylcelulózu nebo podobné materiály s velmi dobrými výsledky. Má-li být dosaženo vazby isomerázy, je nutno isomerázu uvolnit z buněk produkčního mikroorganismu a v průběhu vazby nesmí být přítomny žádné interferující látky. Vazbu je možno provádět ve vodném prostředí nebo v cukrovém roztoku, například v kukuřičném sirupu. Isomerázu je tedy možno vázat na inertní nosiče buď spolu s buněčným materiálem, nebo v poměrně čistém stavu. K tomuto účelu je možno užít různých polymerních látek, tyto materiály však musí mít takovou poréznost, aby glukóza se mohla dostávat do styku s isomerázou.

V případě, že isomeráza je vázána na jemně rozptýlený nosič jako je DEAE-celulóza, je výhodné, aby roztok glukózy procházel poměrně nízkou vrstvou tohoto materiálu. Tloušťka vrstvy vázané isomerázy se tedy pohybuje například v rozmezí 2,5 až 13 cm. Průřez vrstvou však v tomto případě bude veliký. Je výhodné, aby poměr hloubky vrstvy k šířce vrstvy byl v rozmezí 0,01 až 0,1, s výhodou 0,02 až 0,05. To má výhodu, že pokles tlaku při průchodu vrstvou je malý a spékání vrstvy je minimální. Protože však vrstva je poměrně mělká, je větší tendence k tvorbě kanálek. Dojde-li ke tvorbě kanálek, je isomeráza glukózy málo využita. V přípa-

dě, že jsou zařazeny dvě vrstvy za sebou, s výhodou 6 vrstev za sebou, přičemž roztoky získané při průchodu jednou vrstvou se smísí před průchodem další vrstvou, nebude mít tvorba kanálků příliš nepříznivý vliv na účinnost způsobu podle vynálezu.

Přístrojem, kterého je možno užít k tomuto účelu je známý vrstvený filtr pro použití tlaku. Tento filtr sestává ze soustavy plochých filtračních elementů, které se nacházejí vertikálně nebo horizontálně ve válcové nádobě. Složky filtru mohou mít kruhový nebo pravoúhlý tvar a filtrační povrch se nachází na obou stranách. Válcový tank může mít podélnou osu uloženou horizontálně nebo vertikálně. Jedna filtrační vrstva může sestávat ze žlábkované destičky, přes ní je přitaženo vlastní filtrační prostředí, jako tkanina nebo jemná drátěná síťka. Iso-

meráza glukózy, vázaná na inertní nosič, může být uvedena v suspenzi v roztoku glukózy a tato suspenze se potom prohání svrchu uvedeným filtrem, takže každá složka filtru je stejnoměrně potažena vázaným enzymem. Aplikovaný tlak roztoku udrží v případě vertikálního proudění vázanou isomerázu na složkách filtru. Glukózový roztok je potom možno prohánět filtrem kontinuálně, přičemž dojde k isomeraci glukózy. Množství fruktózy závisí na časovém období, po které je roztok glukózy ve styku s vázaným enzymem.

Přesné složení roztoku glukózy se bude měnit podle podmínek provádění způsobu podle vynálezu. V následující tabulce I jsou uvedeny podstatné vlastnosti roztoku glukózy po isomeraci.

Tabulka I

Vlastnosti nečistěných fruktózových roztoků (procenta sušení)

	Glukóza*	Fruktóza*	Polysacharidy*	Psikóza	Popel**	Barevné jednotky
typické rozmezí	30 až 60	10 až 54	0 až 50	0 až 1	0,1 až 0,5	0 až 2,0
výhodné rozmezí	30 až 60	10 až 54	0 až 30	0 až 0,5	0,1 až 0,2	0 až 0,05
nejvýhodnější rozmezí	30 až 60	10 až 54	0 až 30	0 až 0,1	0,05 až 0,1	0 až 0,03

* = množství sacharidů je závislé na žádaném produktu

** = v podstatě sestává z kovových solí, užitých ke stabilizaci a/nebo aktivaci isomerázy glukózy

Vynález bude osvětlen následujícími příklady, které však v žádném smyslu nemají vést k jeho omezení.

Příklad 1

Tento příklad osvětluje použití isomerázy glukózy, vázané na DEAE-celulózu ke kontinuální přeměně glukózy na fruktózu.

Kmen *Streptomyces* ATCC 21175 se pěstuje v submerzní aerobní kultuře a potom se oddělí filtrací od živného prostředí. 1 kg filtračního koláče se uvede v suspenzi v 5 litrech deionizované vody, k níž se přidá 50 mililitrů 0,1 M CoCl_2 a 8 g detergenčního činidla kationtové povahy (Arquad 18—50, Armour Industrial Chemical Co.). Teplota suspenze se udržuje na 60 °C, pH na hodnotě 6,7 až 6,8. Směs se míchá 3,75 hodin, potom se suspenze zfiltruje ve vakuu přes filtrační papír Whatman č. 1. Filtrát se koncentruje odpařením ve vakuu na 30 IGIU/ml.

500 ml koncentrovaného filtrátu se zředí na 1500 ml deionizovanou vodou. K filtrátu se přidá 5 g DEAE celulózy (Cellex-D vyrobeno Bio-Rad Laboratories), směs se míchá ½ hodiny a znovu se zfiltruje přes Whatman č. 1 ve vakuu. Filtrační koláč se promyje vodou na filtru a promývací voda se přidá k filtrátu. Filtrační koláč nyní obsahuje téměř pouze balastní materiál. Čištěný filtrát obsahuje 9,2 IGIU/ml.

30 g DEAE celulózy se uvede v suspenzi v 1500 ml vody, energicky se míchá a suspenze se nechá usadit 30 až 45 minut. Horní část tekutiny se slije, čímž se odstraní příliš jemné částice DEAE-celulózy. To se opakuje čtyřikrát, načež se suspenze zfiltruje za odsávání. 20 g filtračního koláče DEAE-celulózy se přidá k čištěnému filtrátu s obsahem 9,2 IGIU/ml a směs se míchá ½ hodiny při teplotě místnosti. Suspenze se zfiltruje a vlhký filtrační koláč s obsahem DEAE-celulózy s adsorbovanou isomerázou se izoluje. Filtrační koláč obsahuje 215 IGIU/g. 6,25 g tohoto koláče se uvede v suspenzi v 50 ml vodného roztoku s obsahem 0,001 molů CoCl_2 v litru, 0,005 M MgSO_3 a 0,1 M NaCl v litru. Tato suspenze se nanese na vrchol sloupce o průměru 1 cm a nechá se usadit. Spodní část

sloupce obsahuje mělkou vrstvu skleněné vaty k udržení DEAE-celulózy. Spodní výstup ze sloupce byl otevřen a výška vrstvy DEAE-celulózy byla 25 cm. Potom se na sloupec nanese 350 ml vodného roztoku, který obsahuje v 1 litru 0,001 M CoCl_2 , 0,005 M MgSO_3 a 0,1 M NaCl, čímž dojde k odstranění zbarvených materiálů a dalších nečistot z DEAE-celulózy.

Potom se nechá projít sloupcem rychlostí 0,2 ml za minutu roztok glukózy o pH 6,5, který obsahuje v 1 litru 3 moly glukózy, 0,001 molu CoCl_2 a 0,005 molu MgSO_3 . Teplota sloupce se udržuje na 60 °C. Přeměna glukózy na fruktózu po 6 hodinách byla 49,6 procent a po 186 hodinách 45,0 %. Stabilita byla 198 %.

Příklad 2

Tento příklad znázorňuje užití isomerázy glukózy, která je vázána na porézní syntetickou aniontoměničovou pryskyřici ke kontinuální přeměně glukózy na fruktózu.

Isomeráza glukózy byla získána stejně jako v příkladu 1.

100 g pryskyřice Amberlite IRA-938 (Rohm a Haas) bylo uloženo do sloupce o průměru 2,6 cm. Výška vrstva pryskyřice byla 37 cm, teplota sloupce byla udržována na 60 °C. Sloupcem se nechá postupně projít 500 ml 1,5 N NaOH, 1000 ml deionizované vody, 1000 ml 2M HCl a 1000 ml deionizované vody. K 1480 ml částečně čištěného roztoku isomerázy glukózy z příkladu 1 se při teplotě 50 °C přidá 100 g pryskyřice Amberlite IRA-938. Roztok se míchá 2 hodiny, zfiltruje se a filtrát se nechá procházet vrstvou pryskyřice rychlostí 3 ml/minuta. Vrstva se promyje 100 ml deionizované vody, obsahuje pak 3430 IGIU.

Potom se nechá vrstvou pryskyřice procházet roztok glukózy o pH 6,5, který obsahuje v 1 litru 3 moly glukózy, 0,001 molu CoCl_2 a 0,005 molu MgSO_3 rychlostí 3,6 ml/min., přičemž teplota sloupce udržuje na 60 °C. Stupeň přeměny glukózy na fruktózu byl po 41 hodinách 21,9 % a po 210 hodinách 19,5 %. Stabilita byla 600 hodin.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob enzymatické přeměny glukózy na fruktózu, při němž se roztok glukózy o viskozitě 5 až 1000 Pas, o pH 6 až 9 s obsahem 5 až 80 hmotostních % glukózy udržuje na teplotě 20 až 80 °C, přičemž se nechá procházet vrstvou isomerázy glukózy, vyznačující se tím, že roztok prochází vrstvou isomerázy glukózy, vázané na nosič, kterým je derivát celulózy nebo aniontoměničová pryskyřice a izomeráza, má účinnost 3 až 1000, s výhodou alespoň 20 IGIU v cm² vrstvy a stabilitu 50 až 1200 hodin, s výhodou alespoň 300 a zvláště alespoň 400 hodin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím,

že isomeráza glukózy je vázána na diethylaminoethylcelulózu.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že poměr hloubky k šířce vrstvy celulóзовého nosiče je 0,01 až 0,1, s výhodou 0,02 až 0,05.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že roztok s obsahem glukózy prochází dvěma až dvanácti vrstvami isomerázy glukózy, vázané na celulóзовý nosič.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že isomeráza glukózy je vázána na syntetickou aniontoměničovou pryskyřici, uloženou do sloupce.