

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

INMOVILIZACION DE LA ENZIMA GLUCOSA ISOMERASA  
A MATERIALES DE INTERCAMBIO IONICO Y SU UTILIZACION  
EN LA ISOMERIZACION CONTINUA DE D-GLUCOSA A  
D-FRUCTOSA.

TESIS

que presenta el Biólogo CARLOS HUITRON VARGAS  
para obtener el grado de doctor en Ciencias  
Químicas (especialidad Bioquímica).

México, D.F.

Marzo de 1978.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INTRODUCCION

Las enzimas son catalizadores biológicos que intervienen activamente en todos los procesos propios de los sistemas vivos. Son macromoléculas protéicas que aumentan la velocidad de las reacciones químicas a través de una unión transitoria con el sustrato y las cuales, al final de la reacción no resultan modificadas, ya que no forman enlaces químicos permanentes con el sustrato.

Conforme se ha avanzado en el conocimiento de la estructura y función de las enzimas que se encuentran en las células, se ha hecho cada vez más evidente el papel tan importante que tienen dichos catalizadores para todos los sistemas biológicos y se han abierto mayores perspectivas de comprensión y manipulación de estas macromoléculas maestras.

Las enzimas no solo son importantes desde un punto de vista biológico, sino también desde un punto de vista práctico, ya que son moléculas muy específicas, eficientes y actúan a su máxima capacidad bajo condiciones relativamente suaves de temperatura, pH y presión. Lo cual las hace muy adecuadas para utilizarse en la producción de compuestos de importancia práctica. De hecho, aun sin tener conocimientos de las enzimas como entidades bioquímicas, el hombre ha utilizado la actividad enzimática desde

la antigüedad en la elaboración de pan, quesos, cerveza, vino etc., así como en el ablandamiento de carnes. El estudio formal de las enzimas se inició a finales del -- siglo pasado, sin embargo, no fue sino hasta los cincuentas cuando la utilización práctica de las enzimas se empezó a estudiar en forma sistemática.

Como las enzimas ofrecen ventajas sobre los proce-- sos químicos, se ha ampliado cada vez más su utilización. Llegando en la actualidad al uso de enzimas en procesos industriales, en química analítica y en medicina clínica. Sin embargo, de las aproximadamente 2 000 enzimas descritas a la fecha, solo una parte muy pequeña de ellas, se usan en procesos prácticos. Por lo que se vislumbra un gran potencial de utilización práctica de las enzimas en un futuro cercano. Hasta ahora la mayoría de las enzimas utilizadas han sido de tipo hidrolítico y extracelular, - debido a la mayor facilidad que presentan de producción, otención y purificación.

Para una ampliación del número de enzimas utiliza--- bles y de los procesos prácticos en las que intervendrían, es necesario tener en mente que existen factores limitantes, debido a que la mayor parte de las enzimas presentan las siguientes características: se producen en pequeñas - cantidades, se localizan dentro de las células, requieren de la presencia de coenzimas o cofactores para expresar - su actividad, son inestables en las condiciones de operación y son solubles en los medios acuosos donde expresan

su actividad. De tal forma, para ampliar la utilización de las enzimas o para optimizar el aprovechamiento de las que ya están siendo utilizadas, será necesario contar con métodos más eficientes de producción, de obtención, de purificación, de estabilización y de utilización.

Debido a que no es el propósito de este trabajo el analizar en detalle todos estos puntos, la discusión siguiente se centrará en el último de ellos.

Inicialmente las enzimas de interés práctico fueron utilizadas en forma soluble en extractos libre de células crudos o parcialmente purificados. Las preparaciones solubles presentan una baja actividad específica y no se pueden recuperar fácilmente al final de la reacción lo cual no permite tener un control preciso del proceso y lo hace poco eficiente al perder la enzima al final de la reacción.

Una posibilidad de hacer más eficiente la utilización de las enzimas que se ha desarrollado en los últimos años, ha sido el de la insolubilización de las enzimas a través de su inmovilización a soportes sólidos. De esta forma se obtienen derivados activos insolubles que pueden ser removidos fácilmente de las mezclas de reacción aumentando de esta forma el control sobre la reacción y pueden usarse también en reactores bioquímicos de operación continua, requiriéndose para ello solamente de filtros adecuados para retener las partículas del soporte donde está

fijada la enzima. Por otro lado, también se ha visto la importancia que pueden tener los derivados activos insolubles para usarlos como modelos en el estudio del comportamiento de las enzimas en interfase sólido-líquido, debido a que muchas enzimas en la célula no se encuentran en fase acuosa sino relacionadas a membranas.

En retrospectiva es muy difícil poder decir si el interés en la inmovilización de enzimas a soportes sólidos surgió como una forma de estudiar mecanismos celulares o por un interés primario en las aplicaciones prácticas. - En cualquier caso el nuevo enfoque de fijación de enzimas ha traído como consecuencia una gran cantidad de trabajos de interés enzimológico y a llevado al establecimiento de procesos enzimáticos a escala industrial. Entre los grupos de investigación en inmovilización de enzimas y que - han contribuido significativamente al campo, se encuen--- tran; el grupo de E. Katchalski en el Instituto Weizmann, en Israel, el de M.D. Lilly en la Universidad de Londres en Inglaterra, el de J. Porath en la Universidad de - - - Uppsala en Suecia, el de M. Manecke en Alemania y poste-- riormente muchos otros en los Estados Unidos, Japón y Francia.

La cantidad de trabajos publicados sobre los diferentes aspectos de las enzimas inmovilizadas es cada vez mayor, pero como no es mi intención hacer una revisión bibliográfica, solamente señalaré que existen algunas revi-

siones que contienen bastante información sobre este tema: Silman and Katchalski (1966); Kay (1968); Melrose (1971); Mosbach (1971); Gryszkiewicz (1971); Zaborsky (1973) y - - Royer et al. (1973).

Un aspecto central de la inmovilización de enzimas - ha sido el desarrollo de métodos que conduzcan a la fijación duradera de la enzima a un soporte sólido. Los métodos reportados de inmovilización de enzimas se pueden agrupar básicamente en tres tipos: unión covalente de la enzima, adsorción de la enzima a materiales cargados y el atrapamiento de la enzima en mallas o microcápsulas. Sin embargo, en la actualidad se manejan muchos otros métodos de inmovilización que son variaciones de estos tres, o -- combinaciones de ellos.

Los reactivos, métodos y soportes utilizados en la inmovilización de enzimas son actualmente de una variedad muy grande. Los reactivos comprenden desde moléculas relativamente simples como el glutaraldehído, hasta moléculas más complejas como el ácido 4, 4' -diisotiocianatobifenilo-2, 2' -disulfónico. Los métodos van desde la simple adsorción de la enzima a soportes cargados sin la intervención de otros reactivos, hasta el uso de métodos -- complejos de activación del soporte y de la enzima antes de la inmovilización, los cuales requieren de varios pasos para llevarse a cabo. La variación de los soportes - es todavía mayor, prácticamente cualquier cosa se ha utilizado de soporte. Esencialmente se han usado soportes -

inorgánicos como; óxidos de fierro, de níquel y de titanio, vidrio, cerámica, arena, etc., Entre los soportes orgánicos se han usado polímeros naturales como; celulosa, colágena, dextranas, quitina, etc., así como derivados de ellos. También se han usado polímeros artificiales tanto solubles como insolubles, tal es el caso del polivinilo, poliaminoácidos, poliestireno, polietilenimina, polietilenmaleico, etc.

A pesar de la diversidad de los métodos de inmovilización y de los soportes que están disponibles, actualmente todavía no es posible predecir el mejor método y el mejor soporte para una enzima determinada. Lo cual implica que para cada enzima se tendrá que determinar empíricamente el método y el soporte con los que se obtenga un elevado porcentaje de actividad y que sean simples y de bajo costo. En muchas ocasiones una misma enzima puede presentar muy diferentes porcentajes de actividad retenida cuando se inmoviliza a dos soportes diferentes usando un mismo método, o cuando se inmoviliza a un mismo soporte por dos métodos diferentes.

Aunque la preparación y caracterización de enzimas inmovilizadas son interesantes en cuanto al comportamiento de las enzimas en fase sólida-líquida, desde un punto de vista práctico es importante el buscar en la inmovilización obtener derivados insolubles que retengan el 100% de la actividad soluble y que presenten una adecuada estabilidad



bajo condiciones de operación contínua.

A pesar de que existen decenas de enzimas inmovilizadas a diferentes soportes, solo muy pocas est n siendo -- explotadas comercialmente, esto se debe a que si bien las enzimas presentan ventajas potenciales sobre las solubles, la importancia real de ellas, dependerá de las características del proceso donde se va a utilizar, de los costos - relativos de la enzima, del soporte, de la energía, y de la mano de obra en un momento determinado. Es decir, para poder determinar con mayor precisión las posibilidades prácticas reales de una enzima inmovilizada es necesario llevar a cabo una etapa de evaluación despues de obtener los resultados de laboratorio.

## El caso de la Glucosa Isomerasa

Desde el establecimiento de la utilización de la aminoacilasa inmovilizada en la producción industrial de L-aminoácidos, se han incrementado los estudios para utilizar industrialmente otros sistemas enzimáticos. Dentro de las enzimas de mayor aplicación práctica actual y futura, se encuentra la Glucosa Isomerasa. Esta enzima cataliza la conversión de D-Glucosa a D-Fructosa y es en realidad una xilosa isomerasa (D-xilosa cetol isomerasa E.C.5.3.1.5). El interés comercial de esta enzima radica en que a través de su actividad se produce el monosacarido D-fructosa que es un azúcar de mayor poder edulcorante que la sacarosa y la glucosa.

Debido a que la reacción alcanza el equilibrio aproximadamente al 50% de conversión, para obtener fructosa pura, se requiere llevar a cabo procesos de separación. Sin embargo, es posible obtener jarabes con un contenido del 42% sin necesidad de separar los azúcares ya que estos jarabes fructosados tienen propiedades similares al azúcar invertido (Wardrip, 1971).

Se han reportado un gran número de microorganismos que producen esta actividad, entre los que se encuentra Pseudomonas hydrophila (Marshall and Kooi, 1957), - - - Aerobacter cloacae (Sato and Tsumura, 1965; Tsumura and

Sato, 1961), Bacillus megatherium (Takasaki, 1964), - - - -  
Aerobacter aerogenes (Natake, 1964), Lactobacillus brevis  
(Yamanaka, 1963; 1968) Escherichia intermedia (Natake, - -  
1966), Streptomyces phaeochromogenes (Tsumura and Sato, -  
1967; Strandberg and Smiley, 1971), Brevibacterium - - - -  
pentoaminoacidinum (Ichimura, 1965), Streptomyces albus -  
(Takasaki, 1966, Bacillus coagulans) (Yoshimura et al., --  
1966; Danno, 1970); Streptomyces griseolus (Giovenco et -  
al., 1973), Paracolobacterium aerogenoides (Takasaki and  
Tanabe, 1961), etc.

Marshall y Kooi en 1957, fueron los primeros que re-  
portaron esta actividad de isomerasa en células crecidas  
en D-xilosa de Pseudomonas hydrophila, pero la enzima re-  
quería de la presencia de arsenato para expresar su acti-  
vidad. Posteriormente se descubrieron otros microorganismos  
que tenían la misma propiedad de convertir glucosa en  
fructosa, pero estas enzimas también requerían la presen-  
cia de arsenato para poder llevar a cabo la reacción - -  
(Natake and Yoshimura, 1963; 1964). En 1966, Natake puri-  
ficó la enzima que convertía Glucosa en Fructosa hasta ho-  
mogeneidad y vio que la enzima podía isomerizar Glucosa -  
6-fosfato en ausencia de arsenato por lo que postuló que  
se trataba de la enzima fosfo-glucosa isomerasa. Yamanaka  
(1963) encontró la misma actividad en Lactobacillus brevis  
crecido en D-Xilosa, pero esta enzima no requería de la -  
presencia de arsenato. Esta enzima fue purificada par---

cialmente, observándose que la relación de actividad entre glucosa y xilosa isomerasa permanecía constante a través de la purificación (Yamanaka, 1963), lo cual sugirió que la glucosa isomerasa y la xilosa isomerasa eran la misma enzima. De tal forma hasta ahora no se ha encontrado una verdadera glucosa isomerasa.

Las especies de Streptomyces, probablemente han sido las más estudiadas como fuente de Glucosa Isomerasa que cualquier otro género. Sato y Tsumura (1967) fueron los primeros en descubrir en Streptomyces phaeochromogenes cepa SK, la actividad de glucosa isomerasa. Al purificar la enzima, observaron que para isomerizar glucosa y xilosa sólo se requería la presencia de magnesio y cobalto y que la presencia de magnesio protegía a la enzima de la inactivación, así como la glucosa la protegía de la desnaturización por calor. Takasaki (1966), buscó microorganismos en los que se pudiera inducir la enzima sin utilizar xilosa y encontró una cepa de Streptomyces albus (Takasaki, et al., 1969), la cual en presencia de xilanos producía la actividad de glucosa isomerasa y esta producción se veía aumentada en presencia de cobalto en el medio de fermentación. Yoshimura (1966), seleccionó de entre 300 microorganismos que crecían en xilosa como fuente de carbono a una cepa de Bacillus coagulans HN-68, que producía glucosa isomerasa en medios que contenían xilosa y además la producción se aumentaba cuando se proporcionaba

ba manganeso al medio de cultivo. Las propiedades de esta enzima, así como sus condiciones de reacción la hicieron atractiva para su utilización a nivel industrial. Esta enzima requiere la presencia de cobalto para isomerizar glucosa y ribosa, pero manganeso para xilosa (Danno, 1970).

Para producir la enzima a gran escala, una vez que se tiene el microorganismo productor de la enzima, seleccionado, se requiere de la optimización de las condiciones de fermentación para obtener los máximos rendimientos de actividad producida. Como el inductor natural, la xilosa, es un azúcar caro, se ha buscado reemplazarlo por xilanos o con sustratos que los contengan. Así también para aumentar la producción de enzima se han obtenido una gran cantidad de cepas mutantes que son hiperproductoras, debido a que son resistentes a represión catabólica o constitutivas, (Sánchez and Quinto, 1975).

Como la glucosa isomerasa es una enzima intracelular, inicialmente se utilizó a la célula completa para convertir glucosa a fructosa (Yoshimura, et al., 1966; Tsumura et al., 1967; Takasaki, 1969). Las células de Streptomyces albus se lisan a temperaturas menores de 50°C liberándose la enzima, pero el calentamiento a más de 60°C durante 10 minutos, fija a la enzima a la célula, por lo que es relativamente fácil "atrapar" a la Glucosa Isomerasa dentro de la célula de Streptomyces (Takasaki et al., 1969).

Para su utilización, las células también han sido in-

movilizadas por atrapamiento o microencapsulación tanto por métodos físicos como químicos (Kolorik et al., 1974; Vieth et al., 1973).

Desde principios de los setentas, se empezó a utilizar la actividad de Glucosa Isomerasa para producir jarabes fructosados a partir de hidrolizados de almidón y a un costo menor que el del azúcar invertido.

Se ha estimado que tan solo en los Estados Unidos se produjeron alrededor de 2.5 millones de toneladas de jarabes fructosados en 1977. Estos jarabes contienen aproximadamente el 71% de sólidos, son cristalinos e incoloros, pueden manejarse con instrumental similar al empleado para azúcar invertido o jarabes de glucosa, y deben almacenarse aproximadamente entre 30°C y 35°C para prevenir su cristalización (Robinson, 1975). El jarabe normal contiene aproximadamente un 42% de fructosa y es tan dulce como un jarabe de sacarosa y no contiene sobores ni olores que enmascaren otro tipo de sabor u olor, por lo que se utiliza en muchos productos alimenticios; otra ventaja que tienen es su alta presión osmótica que lo previene de contaminación microbiana.

Para la producción de estos jarabes, se ha utilizado en general a la Glucosa Isomerasa dentro de la célula y en células inmovilizadas para la producción en lote y continua a escala industrial, como por ejemplo la utilizada -- por Novo Industri A/S (Zittan et al., 1975). Esta forma

de utilización tiene algunas desventajas, por ejemplo, como presenta una actividad específica baja, se requieren de grandes volúmenes para obtener la productividad deseada, además se presentan problemas serios de difusión del sustrato y del producto a través de la membrana, también el producto final puede ser contaminado con productos de degradación de la célula, lo que puede alterar el olor, color, sabor, etc., de éste.

El inmovilizar a la enzima libre en un soporte sólido, posee mayores ventajas que el retenerla únicamente dentro de la célula, puesto que se puede inmovilizar a la enzima libre de otros contaminantes celulares y obtenerse preparaciones con Actividad Específica elevada, lo que reduce los volúmenes de enzima empleados en el proceso.

La Glucosa Isomerasa se ha inmovilizado por distintos métodos y a diferentes soportes como por ejemplo la enzima de Streptomyces phaeochromogenes se ha inmovilizado por enlace covalente a esferas de vidrio poroso (Strandberg and Smiley, 1972), a esferas de vidrio recubiertas con Zirconio (Havewala and Pitcher, 1974; Lee et al., 1976), por atrapamiento en polímeros de acrilamida (Kasumi et al., 1974), y por adsorción a DEAE-Sephadex (Tsumura and Ishikawa, 1967) y a DEAE-Celulosa (Schnyder, 1974). La enzima de Streptomyces griseolus ha sido inmovilizada por atrapamiento en fibras de triacetato de celulosa (Giovenco et al., 1973) y la de Bacillus sp. por

adsorción a DEAE-Celulosa (Huitrón and Limón-Lason, 1978).

Se ha reportado que las preparaciones obtenidas por unión covalente y atrapamiento presentan una menor retención de actividad que las obtenidas por adsorción. Por otro lado, es importante mencionar que la inmovilización por adsorción presenta las siguientes ventajas: es simple y rápida, las condiciones de inmovilización son suaves, es económica, se puede reutilizar el soporte, se puede purificar la enzima al inmovilizar, y como el sustrato y el producto de la Glucosa Isomerasa son moléculas neutras, se pueden utilizar altas concentraciones de sustrato durante la operación continua.

La enzima de Streptomyces phaeochromogenes fue inmovilizada por adsorción a DEAE-Sephadex en 1967, pero fue hasta 1974 cuando se reportó que se estaba utilizando inmovilizada a DEAE-celulosa en la producción comercial de jarabes ricos en fructosa, por Clinton Corn Products. En vista de que la utilización de la enzima de Streptomyces phaeochromogenes inmovilizada a DEAE-celulosa apareciera utilizándose comercialmente, sin haber reportes previos de la preparación de estos derivados insolubles, indicaba que las posibilidades de obtención de mejores preparaciones estaban abiertas, usando para ello otras fuentes de enzima, otros soportes de intercambio iónico y por modificaciones al método de inmovilización por adsorción.



## RESUMEN

Bajo las consideraciones mencionadas anteriormente, se realizó el trabajo que se presenta enseguida, en el cual se inmovilizó la enzima glucosa isomerasa de Bacillus sp parcialmente purificada, a materiales de intercambio iónico.

Se encontró una mayor retención de la actividad en DEAE-celulosa que en DEAE-Sephadex y AE-Celulosa. Hasta 170 mg de proteína agregada por g de soporte, la actividad retenida fue proporcional a la agregada y presentó en este rango una actividad entre 93 y 100% en relación a la soluble. La actividad máxima inmovilizada fue de 1700 unidades por gramo de soporte. El derivado insoluble DEAE-celulosa-glucosa isomerasa fue caracterizado en cuanto a su pH óptimo, estabilidad térmica y Km aparente. Cuando se utilizó la enzima inmovilizada en columnas empacadas se observó una disminución de la actividad durante el tiempo de operación. Este efecto fue menor a bajas concentraciones de  $Mg^{2+}$  y fue afectado por la geometría de la columna. Así también no se encontraron limitaciones difusionales en las columnas empacadas.

## CONCLUSIONES

Como conclusión de los resultados obtenidos, se puede decir que la enzima glucosa isomerasa de Bacillus sp - inmovilizada a DEAE-celulosa presenta algunas ventajas -- importantes sobre otras preparaciones insolubles reportadas hasta ahora. En primer lugar la retención de la actividad obtenida fue prácticamente del 100% sobre la enzima soluble, valor que no solo es mayor que la de otras preparaciones de glucosa isomerasa reportadas, sino también a la de otras enzimas inmovilizadas a DEAE-celulosa. La actividad máxima retenida por gramo de soporte fue mayor a la de cualquier otra preparación obtenida por inmovilización de glucosa isomerasa libre de células.

Aunque la estabilidad operacional del derivado insoluble no fue mayor que la reportada para células rotas e inmovilizadas de Bacillus sp, hay que tener en cuenta que no fue optimizada su utilización en el reactor continuo, - pues se ha visto que la exposición al oxígeno decrece la - estabilidad operacional de la enzima. Sin embargo, se obtuvieron incrementos en la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada a DEAE-celulosa al reducir la concentración de  $Mg^{2+}$  y al usar columnas más largas.

El método que se ha descrito para inmovilizar la glu-

cosa isomerasa de Bacillus sp es simple y eficiente para obtener preparaciones muy activas que se pueden utilizar en la producción continua de mezclas de D-Glucosa y D- - fructosa y en los que se puede reutilizar el soporte cuando la columna pierde totalmente su actividad.

## REFERENCIAS

1. Danno, G. Agr. Biol. Chem., 34, 1795 (1970).
2. Giovenco, S., F. Morisi and P. Pansolli. FEBS Letters, 36, 57 (1973).
3. Gryszkiewicz, J. Folia Biologica 19, 119 (1971).
4. Havewala, N.B. and W.H. Pitcher in Enzyme Engineering, 2, 315, E.K. Pye and L.B. Wingard, Plenum Press, New York (1974).
5. Huitrón, C., and J. Limón-Lason. Biotech. and Bioeng., en prensa (1978).
6. Ichmura, M. J. Agr. Biol. Chem. Soc., 39, 8 (1965).
7. Kasumi, T., K. Kawashima and N. Tsumura. J. Ferm. Technol. 52, 321 (1974).
8. Kay, G. Process Biochem., 3, 36 (1968).
9. Kolorik, M.J., B.J. Chen, A.H. Emery and H.C. Lim en Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes, 71, Ed. por A.C. Olson and C.L. Cooney, Plenum Press. (1974).
10. Lee, Y.Y., A.R. Fratzke, K. Wun and G.T. Tsao. Biotech. and Bioeng. 18, 389 (1976).
11. Marshall, R.O. and E.R. Kooi. Science, 125, 648 (1957).
12. Melrose, G.J.H. Rev. Pure and App. Chem., 21, 83 (1971).
13. Mosbach, K. Sci. Am. 26 (1971).
14. Natake, M.J. Agr. Biol. Chem., 30, 887 (1966).
15. Natake, M. and S. Yoshimura. J. Agr. Biol. Chem., 27, 342 (1963).

16. Natake, M. and S. Yoshimura. J. Agr. Biol. Chem., 28, 505 (1964).
17. Royer, G.P., J.P. Andrews and R. Ug. Enz. Tech. Digest. 1, 99 (1973).
18. Robinson, J.W. Food Eng., 47, 57 (1975).
19. Sánchez, S. and C. Quinto. Appl. Microbiol., 30, 750 (1975).
20. Sato, T. and N. Tsumura. J. Ind. Chem. (Japan), 67, 683 (1965).
21. Schnyder, B.J. Die Starke, 26, 409 (1974).
22. Silman, I.H. and E. Katchalski. Ann. Rev. Biochem., 35, 873 (1966).
23. Strandberg, G.W. and K.L. Smiley. Appl. Microbiol., 21, 588 (1971).
24. Strandberg, G.W. and K.L. Smiley. Biotech. Bioeng., 14, 509 (1972).
25. Takasaki, Y. J. Agr. Biol. Chem. (Japan), 36, 1010 (1964).
26. Takasaki, Y. J. Agr. Biol. Chem. (Japan), 30, 1247 (1966).
27. Takasaki, Y., Y. Josugi and A. Kanabayashi, Agr. Biol. Chem. 33, 1527 (1969).
28. Takasaki, Y. and O. Tanabe. Agr. Biol. Chem., 28, 710 (1961).
29. Takasaki, Y. and O. Tanabe. Agr. Biol. Chem., 30, 220 (1966).
30. Tsumura, N., M. Hagi and T. Sato, J. Agr. Biol. Chem., 31, 902 (1967).
31. Tsumura, N. and M. Ishikawa. Nippon Shokohin, K.G., 14, 539 (1967).

32. Tsumura, N. and T. Sato. *Agr. Biol. Chem.*, 25, 620 (1961).
33. Vieth, W.R., S.S. Wang and R. Saini. *Biotech. Bioeng.*, 15, 565 (1973).
34. Wardrip, E.K. *Food Tech.* May 1971, p. 47.
35. Yamanaka, K. *J. Agr. Biol. Chem.*, 27, 271 (1963).
36. Yamanaka, K. *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 670 (1968).
37. Yoshimura, S., G. Danno and M. Nataka. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 1015 (1966).
38. Zaborsky, O. "Immobilized Enzymes". CRC-Press, U.S.A. (1973).
39. Zittan, L., P. B. Pulsen and S.H. Hemmingsen. *Die Starke*, 27, 236 (1975).

TABLE I  
Purification of Glucose Isomerase Activity

	Protein (mg)	Activity (units*)	Specific Activity (units/mg protein)	Yield (%)
Supernatant (I)	2200	16,400	7.5	100
Mn <sup>2+</sup> Treatment	1600	10,300	6.5	63
Ammonium Sulfate	660	10,200	15.5	62
Dialysis	650	9,200	14.2	56
DEAE-Sephadex A-50 Chromatography	270	8,150	30.2	50

\* units =  $\mu\text{mol D-fructose}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Specific Activity and  $K_m$  of the Free and  
Immobilized Enzyme Before and After Grinding

Condition	Specific Activity (units/mg protein)	$K_m$ app (M)	$K_m$ app* (M)
Free Enzyme	9.32	0.17±0.056 (14)	0.11±0.01 (6)
Immobilized Enzyme			
non-ground	10.91	0.19±0.033 (7)	0.25±0.017 (6)
ground	10.79	0.18±0.028 (8)	- - -

$Mg^{2+}$  concentration 0.005M except in (\*), which was 0.01M  $K_m$  app values given as

$\bar{x} \pm s.d. (N)$ .



Preparation of Immobilized Glucose Isomerase Activity

Support	Activity (units/g supp) <sup>a</sup>		Activity Retained (B/A x 100)	Protein (mg/g supp)		Specific Activity (units/mg protein)	
	Added (A)	Bound (B)		Added (C)	Bound (D)	Added (A/C)	Bound <sup>b</sup> (B/D)
AE-Cellulose	317	73	23	ND	ND	ND	ND
DEAE-Sephadex A-25	317	133	42	34	11	9.32	12.1
	634	128	20	68	11	9.32	11.6
	950	140	14	102	11	9.31	12.7
DEAE-Sephadex A-50	856	453	53	ND	ND	ND	ND
DEAE-Cellulose	634	590	93	68	55	9.32	10.7
	1268	1186	94	136	106	9.32	11.2
	2400	1700	70	272	152	8.82	11.2

<sup>a</sup>units =  $\mu\text{mol D-fructose} \cdot \text{min}^{-1}$

<sup>b</sup>determined after elution with 1.0M NaCl

ND = Not determined

Figure Legends

- figure 1. Chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of the enzyme preparation obtained by precipitation with ammonium sulfate. The column, 2.5 cm diam x 30 cm, was eluted stepwise with 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 1.0M KCl in 0.01M maleate buffer, pH 6.5, at a flow rate of 15 ml/hr. Fraction volumes were 10 ml. Absorbance at 280 nm (0); glucose isomerase activity (●); KCl concentration in eluant fed to column (-----).
- figure 2. Dependence of conversion on reciprocal flow rate. The substrate solution passed through the column contained 0.275M D-glucose, 0.001M  $\text{Co}^{2+}$  and 0.01M  $\text{Mg}^{2+}$  at pH 6.9.
- figure 3. Immobilization of glucose isomerase to DEAE-cellulose. Enzyme immobilization and assays were carried out under standard conditions except for the concentration of protein added.
- Figure 4. Effect of pH on glucose isomerase activity in solution (0), and when immobilized to DEAE-cellulose (●). Enzyme assays were carried out under standard conditions except for the pH of the reaction mixture.
- Figure 5. Heat stability of glucose isomerase. 10 ml of enzyme solution or immobilized enzyme suspended in distilled water were preincubated for 15 min at the specified temperatures, rapidly cooled, and the remaining activity assayed at 37°C. Soluble enzyme (0); immobilized enzyme (●).

Figure 6. Stability of DEAE-cellulose-glucose isomerase when used for the continuous isomerization of D-glucose in a column system. 500 mg of the immobilized enzyme preparation were packed into a jacketed column held at 65°C, and substrate was passed through the column at a flow rate of 10 ml/hr. 1.6 x 3.0 cm column receiving 0.275M D-glucose, 0.001M  $\text{Co}^{2+}$ , 0.01M  $\text{Mg}^{2+}$  (●). 1.1 x 6.0 cm column receiving 1.0M D-glucose, 0.001M  $\text{Co}^{2+}$ , 0.01M  $\text{Mg}^{2+}$  (○). 1.6 x 3.0 cm column receiving 0.86M glucose, 0.001M  $\text{Co}^{2+}$  and 0.005M  $\text{Mg}^{2+}$  (Δ). The initial isomerization values for runs were 54%, 45% and 30%, respectively.

Figure 7. Stability of DEAE-cellulose-glucose isomerase in a 1.6 x 12.0 cm column, fed at 10 ml/hr a substrate solution containing 2.5M glucose, 0.001M  $\text{Co}^{2+}$ , and 0.005M  $\text{Mg}^{2+}$ .













