



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1542/81

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 11/08

(22) Indleveringsdag: 03 apr 1981

(41) Alm. tilgængelig: 05 okt 1981

(44) Fremlagt: 22 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 04 apr 1980 JP 45044/80

(71) Ansøger: *Sumitomo Chemical Company Limited; 15, Kitahama 5-chome; Higashi-ku; Osaka, JP

(72) Opfinder: Hideo *Hirohara; JP, Hidefumi *Yamamoto; JP, Emiko *Kawano; JP, Shigeyasu *Nabeshima; JP, Satoshi *Mitsuda; JP, Tsuneyuki *Nagase; JP

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Immobiliseret lactase fra *Aspergillus oryzae*

(56) Fremdragne publikationer

FR pat. nr. 2381059

US pat. nr. 3767531

(57) Sammendrag: 1542-81

Stabil og vand-uopløselig immobiliseret lactase med en høj lactose-hydrolyserende aktivitet fremstilles ved immobilisering af en lactase fra *Aspergillus oryzae* på en makroporøs phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks, som har et specifikt overfladeareal på mindst 5 m²/g, et samlet makroporevolumen med en porediameter på 100-2000 Å på mindst 0,2 cm³/g og en anionbytterkapacitet på mindst 1 mekv/g hidrørende fra aminogruupper og/eller substituerede aminogruupper.

Immobiliseringen sker ved, at lactasen adsorberes på bærestoffet, f.eks. ved neddykning af dette i en lactaseopløsning med en pH-værdi på 4,0-6,5, hvorefter bærestoffet med den adsorbere lactase behandles med glutaraldehyd, f.eks. ved neddykning i en glutaraldehydopløsning med en pH-værdi på 3,5-7,0.

Det foretrækkes, at adsorptionen og glutaraldehydbehandlingen gennemføres ved 0-50°C, og især at adsorptionen udføres ved højere temperatur end glutaraldehydbehandlingen.

Den immobiliserede lactase muliggør en kontinuerlig katalytisk reaktion af lactosehydrolysen i mælk, valle og vallepærmælk.

Den foreliggende opfindelsen angår en immobiliseret lactase. Nærmere betegnet angår opfindelsen en stabil og vanduopløselig, immobiliseret lactase med høj lactosehydrolyserende aktivitet, som kan fremstilles ved immobilisering af en lactase afledt fra *Aspergillus oryzae* på en makroporøs phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks.

Når et enzym, som i sig selv er katalysator for en reaktion i en homogen vandig opløsning, immobiliseres, bliver det muligt at anvende det gentagne gange og kontinuerligt. I betragtning af en sådan anvendelighed af et immobiliseret enzym til industrielt formål er der i den seneste tid blevet udviklet et antal metoder til immobilisering af enzymer, jfr. C.R. Zarborsky: *Immobilized Enzymes*, C.R.C. Press (1973), og Ichiro Chihata: *Immobilized Enzymes*, Kodansha (1975).

Kendte metoder til fremstilling af immobiliserede enzymer kan groft opdeles i følgende fire metoder:

- 1) Adsorptionsmetoden.
- 2) Covalent bindings-metoden.
- 3) Indfangningsmetoden.
- 4) Tværbindingsmetoden.

Da metoderne hver især har både fordele og ulemper i forhold til de andre, er det vanskeligt at sige, hvilken der er den bedste. Desuden er der endnu ikke tilvejebragt et bærestof eller en metode til immobilisering af enzymer, som er anvendelige til alle mulige forskellige enzymer. I praksis må man individuelt vælge et egnet bærestof og en metode afhængigt af det specifikke formål, således at man kan få et fortrinligt immobiliseret enzym til det beregnede formål.

Desuden bør man være opmærksom på, at selv de enzymer, som er klassificeret i samme kategori og har fået samme enzymnummer i overensstemmelse med "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry", 1964, kan være ret forskellige fra hinanden med hensyn til molekylvægt og enzymatiske egenskaber, hvis de har forskellig

oprindelse. I sådanne tilfælde er det ganske naturligt, at kombinationen af et bestemt enzym med et bærestof og en fremgangsmåde, hvorved der fås et særdeles fordelagtigt immobiliseret enzym, varierer afhængigt af enzymernes oprindelse, selv om disse har fået samme enzymnummer og samme navn.

Lactase (β -galactosidase, enzym-nummer 3.2.1.23) er det enzym, som hydrolyserer lactose til glucose og galactose. Det er kendt, at dyr, planter, bakterier, svampe og gær producerer lactase. Lactase er et typisk eksempel på enzymer med et navn, hvorunder der er mange slags enzymer, som er forskellige med hensyn til deres egenskaber bortset fra én fælles egenskab, nemlig at de hydrolyserer lactose til glucose og galactose. Eksempelvis kan nævnes, at blandt enzymerne fra bakterier er lactase fra *Escherichia coli* (i det følgende benævnt "E. coli") et intracellulært enzym, hvis molekylvægt ligger i området fra 52×10^4 til 54×10^4 , hvis optimale pH-værdi er 7,3, og hvis Michaelis' konstant, K_m (som angiver dissociationskonstanten af enzym-substrat-komplekset), er $9,5 \times 10^{-4}M$ [substrat: ortho-nitrophenyl- β -D-galactosepyranosid (ONPG)] og $7,5 \times 10^{-3}M$ (substrat: lactose).

På den anden side er lactase afledt fra gær, f.eks. *Saccharomyces fragilis* eller *Saccharomyces lactis*, også et intracellulært enzym, hvis molekylvægt er så lille som 20×10^4 , mindre end halvdelen af molekylvægten af lactase fra *E. coli*. Lactase fra gær har en optimal pH-værdi på 6,5 til 7,0, og K_m -værdierne (substrat: ONPG og lactose) er meget forskellige fra værdierne for lactase fra *E. coli*.

Desuden er lactase fra svampen *Aspergillus niger* et ekstracellulært enzym, hvis optimale pH-værdi er så lav som 3,5, og hvis molekylvægt ligger i området fra 10×10^4 til 11×10^4 . Lactasen fra en lignende svamp, *Aspergillus oryzae*, adskiller sig på mange punkter fra lactose fra *Aspergillus niger*, herunder den optimale pH-værdi, som er 4,5 til 5,0 (C.D. Boyer: *The Enzymes*, 3. udg., bd., 7, 617-663).

Man kan således næppe forestille sig, at lactaserne, hvis oprindelser er forskellige, har samme kemiske struktur

og egenskaber og er den samme forbindelse. De har kun én fælles egenskab, som består i, at de alle hydrolyserer lactose til glucose og galactose eller aryl- eller alkyl- β -D-galactosid til en alkohol og galactose.

5 Man kan derfor sige, at det enzym-immobiliseringsbærestof og den enzym-immobiliserings-metode, der er egnet til ét bestemt enzym, ikke nødvendigvis kan anvendes på alle andre enzymer.

Eksempelvis er der i US patentskrift nr. 3.767.531
10 beskrevet en fremgangsmåde til immobilisering af lactase fra *Aspergillus niger* på phenol-formaldehyd-harpiks, som kun har phenoliske hydroxylgrupper og methylolgrupper, men ikke andre funktionelle grupper, såsom amino- eller substituerede aminogru- eller carboxymethylgrupper. Disse bærestoffer og den anførte fremgangsmåde er imidlertid ikke
15 nødvendigvis egnet til alle typer af enzymer.

Dette bekræftes ved en sammenligning af hydrolyseaktiviteten af lactase immobiliseret ifølge ovennævnte US patentskrift og lactasen ifølge den foreliggende opfindelse. Ved
20 hydrolyse af lactose ifølge nedenstående eksempel 1 og 2 opnås der rumhastigheder på hhv. 4,5 og 4,9 time^{-1} , medens rumhastigheden ifølge US patentskrift nr. 3.767.531, eksempel 2, ikke kan komme op over 1,8 time^{-1} , når der tilstræbes en acceptabel hydrolysegrad (75-100%), medmindre man hæver
25 temperaturen, hvilket i sig selv er en omkostningsforøgende faktor, som man kun anvender, hvis den ikke kan undgås. Alene dette viser, at den omhandlede, immobiliserede lactase er 2-3 gange så effektiv som den kendte, og denne forskel vokser til mere end det dobbelte, når man tillige tager i
30 betragtning, at der med lactasen ifølge opfindelsen behandles en 7%'s (vægt/vol) lactoseopløsning, hvor den kendte teknik behandler ca. 3%'s opløsning.

Medens det ifølge US patentskrift nr. 3.767.531 er lactase fra *Aspergillus niger*, som immobiliseres, kendes
35 der fra FR offentliggørelsesskrift nr. 2.581.059 en lactase fra *Aspergillus oryzae* immobiliseret på en pullulangel,

altså en helt anden geltype end den nedenfor omtalte ionbytterharpiks. De i dette FR offentliggørelsesskrift beskrevne, immobiliserede lactaser har aktiviteter fra 68 μmol til 264 μmol pr. minut pr. g katalysator (eksempel 7 hhv. 12). Hvis

5 den immobiliserede lactase fra nedenstående eksempel 1 afprøves under samme betingelser (5%'s lactoseopløsning, pH-værdi 4,5, 30°C) opnås en aktivitet på 4,53 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$, svarende til 462 μmol pr. g katalysator pr. minut, dvs. næsten det dobbelte af den bedste, kendte, immobiliserede lactase.

10 Under anvendelse af en immobiliseret lactase fremstillet ved adsorbering af en lactase fra *Bacillus circulans* på "Doullite[®] ES-762", en phenol-formaldehydharpiks med phenoliske hydroxylgrupper og methylolgrupper, man ingen andre ionbyttergrupper, efterfulgt af behandling med glutaraldehyd,

15 har man forsøgt at hydrolysere lactose i mælk i en propstrømme-reaktor (søjle), men det er svært at bibeholde aktiviteten. Aktiviteten falder så hurtigt, at halveringstiden er mindre end 6 dage, selv når en lactoseopløsning i en koncentration på 4,8% anvendes som substrat. [Rapport fra

20 Torii et al., side 38, Symposium af the Agricultural Chemical Society of Japan, afholdt i Tokyo i april 1979; Rapport fra Matsuno, side 14, det andet foredragsmøde for Enzyme Technological Studies, 1979]. Lignende vises også med de sammenligningseksempler, som gives senere.

25 En væsentlig industriel anvendelse af lactase er til hydrolyse af lactose i mælk til personer, der ikke kan tåle lactose i mælk, og en anden anvendelse af lactase er hydrolyse af lactose i valle. Som en følge heraf har der været gjort betydelige forsøg på at udvikle lactaser fra mikroorganismer,

30 der er egnet til disse to væsentlige industrielle anvendelser, samt en fremgangsmåde til immobilisering af disse lactaser (Immobilized Enzyme Technology, udgivet af H.H. Weetall og S. Suzuki, Plenum Press, New York (1975), Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes, udgivet af A.C.

35 Olson og C.L. Cooney, Plenum Press, New York, (1974)).

Især har de seneste udviklinger af en membranteknik

gjort det muligt uden vanskeligheder at adskille valle i en proteindel med høj molekylvægt og en del med forbindelser med lav molekylvægt, som hovedsageligt indeholder lactose. Med henblik herpå har der været foretaget mange forskellige undersøgelser af hydrolyse af lactose med en immobiliseret lactase samt anvendelse af produktet inden for fødevarerindustrien.

Næsten ingen af disse undersøgelser er imidlertid kommet i praktisk anvendelse. Årsagen hertil kan være, at meget få lactaser virker både på mælk og sur valle, og at der er et problem med produktinhibering på grund af galactose og lignende. Blandt årsagerne hertil kan især nævnes, at kun få lactaser er stabile, højaktive over for lactose og tilgængelige til en rimelig pris.

Som tidligere nævnt betragtes en immobiliseret lactase som værende af stor betydning set ud fra en industriel anvendelse af lactase, men der foreligger ikke én enkelt immobiliseringsmetode, som er alment anvendelig på alle slags lactaser uanset oprindelse. For at fremstille en fortrinligt immobiliseret lactase er det nødvendigt omhyggeligt at udvalge den bedste kombination af (1) en lactase, dvs., lactasetype med hensyn til oprindelse, (2) et bærestof og (3) en immobiliseringsmetode. Med andre ord er det nødvendigt at udvalge den bedste lactase ud fra et praktisk synspunkt og at beslutte sig til det mest egnede bærestof og immobiliseringsmetode under hensyntagen til den industrielle anvendelsesmåde for slutproduktet. Dette gælder naturligvis for et hvilket som helst andet, immobiliseret enzym.

Ud fra dette standpunkt er der tilvejebragt fortrinslige immobiliseringsbærestoffer (som beskrevet i f.eks. JP offentliggørelsesskrifter nr. 67091/1979 og nr. 119084/1979).

Desuden er der blevet udviklet en immobiliseret lactase ved hjælp af adsorptions-immobilisering af en lactase fra *Aspergillus oryzae* på et bærestof, som er en makroporøs, phenol-formaldehyd-baseret, amfoter ionbytterharpiks med både anion- og kationbyttergrupper, dvs., usubstituerede og

substituerede aminogrupper og carboxylgrupper, og som har specifikke fysiske egenskaber, (JP patentskrift nr. 56-26189), og en immobiliseret lactase ved hjælp af covalent binding ved en glutaraldehydbehandling (JP patentskrift nr. 5 56-51984). Den førstnævnte lactase, som er immobiliseret ved hjælp af adsorption-immobilisering, og som har et højt enzymindehold pr. vægtenhed bærestof og høj aktivitet, muliggør en kortere fremstillingstid, idet immobiliseringen af enzymet sker hurtigere ved adsorption end ved covalent binding. Den sidstnævnte lactase, som er immobiliseret ved 10 hjælp af covalent binding, er stabil uden at forårsage eluering af enzymet, selv om et substrat indeholder en stor koncentration af salt. På grund af den optimale pH-værdi, som er særegen for en lactase fra *Aspergillus oryzae*, er disse immobiliserede lactaser desuden virksomme indenfor et 15 pH-værdi-område, som er bredere end pH-værdiområderne for de immobiliserede enzymer, som er fremstillet ud fra lactaser fra gær og lactaser fra *Aspergillus niger*, og de er virksomme over for sur valle, vallepermeat og mælk. Således kan lactasen, der immobiliseres ved covalent binding af en lactase 20 fra *Aspergillus oryzae* på den makroporøse, phenol-formaldehyd-baserede, amfotere ionbytterharpiks, siges at være særdeles overlegen, set fra et industrielt synspunkt. Hvis der imidlertid skal peges på nogle ulemper, kan fremstillingen og konditioneringen af bærestoffet være vanskeligt, fordi 25 den ionbytterharpiks, der anvendes som bærestof, er amfoter. Aktivering af en sådan harpiks giver problemer, fordi tilstedeværelsen af både anion- og kationbytteraktivitet medfører, at harpiksen skal vaskes skiftevis med sure og basiske opløsninger. 30

Ved den foreliggende opfindelse er det alvorligt blevet forsøgt at forbedre ulemperne, og det har nu overraskende vist sig, at indholdet af immobiliseringsenzym pr. vægtenhed af bærestoffet, hvis der til immobiliseringen 35 anvendes en anionbytterharpiks, og der ikke glutaraldehydbehandles, vil være noget lavere, men elueringen af enzymet

vil være lettere sammenlignet med den makroporøse, phenol-formaldehyd-baserede, amfotere ionbytterharpiks, som anvendes til immobiliseringen, hvorimod en immobiliseret lactase, som har en høj aktivitet pr. enhed (dvs. specifik aktivitet),
5 og som er så stabil, at intet enzym elueres fra bærestoffet, kan opnås, hvis immobiliseringen udføres med en glutaraldehydbehandling under anvendelse af en aminosubstitueret, makroporøs, phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks med de specielle fysiske egenskaber, som fremgår af det
10 følgende.

Formålet med den foreliggende opfindelse er derfor at tilvejebringe en immobiliseret lactase, som muliggør en enkel og effektiv anvendelse af lactase i en kontinuerlig katalytisk reaktion af substratet, lactose, og som er fri
15 for de ovenfor nævnte ulemper.

Formålet med den foreliggende opfindelse opnås med den her omhandlede immobiliserede lactase, som er ejendommelig ved, at den er en lactase fra *Aspergillus oryzae*, som har følgende egenskaber:

- 20 1) den optimale pH-værdi er 4,5 til 5,0 (substrat: lactose), idet forholdet mellem aktiviteterne ved pH-værdierne 6,65 og 4,5 (begge ved 30°C) er $0,45 \pm 0,05$,
- 2) Michaelis' konstant $K_m \approx 0,1 \pm 0,05$ mol/liter (pH-værdi = 4,5, 30°C, substrat: lactose) og $0,3 \pm 0,15$ mol/liter (pH-værdi = 6,65, 30°C, substrat: lactose),
25 værdi = 6,65, 30°C, substrat: lactose),
- 3) en inhiberingskonstant K_i ved galactose på $(6 \pm 3) \times 10^{-3}$ mol/liter (pH-værdi = 4,5, 30°C, substrat: lactose) og $(4 \pm 3) \times 10^{-3}$ mol/liter (pH-værdi = 6,65, 30°C, substrat: lactose),
- 30 og som er immobiliseret ved hjælp af covalent binding ved en glutaraldehydbehandling på et bærestof af en makroporøs, aminosubstitueret, phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks med et specifikt overfladeareal på $5 \text{ m}^2/\text{g}$ eller derover, et samlet volumen af makroporer, der har en porediameter på
35 fra 100 til 2000 Å, på $0,2 \text{ cm}^3/\text{g}$ eller derover og en anionbytterkapacitet, der hidrører fra aminogrupper, substituerede

aminogrupper eller en kombination deraf, på 1 mækv/g eller derover.

Den her omhandlede, immobiliserede lactase fremstilles ved, at lactase fra *Aspergillus oryzae* adsorberes på ovennævnte bærestof, hvorefter det resulterende bærestof, hvorpå
5 lactasen er adsorberet, behandles med glutaraldehyd.

Den her omhandlede, immobiliserede lactase, som er fremstillet ved covalent binding, har fordele set ud fra synspunktet industriel fremstilling, og den har tilstrækkelig
10 høj aktivitet og stabilitet set ud fra synspunktet industriel udnyttelse.

Den makroporøse, phenol-formaldehyd-baserede anionbytterharpiks, der indgår i den immobiliserede lactase ifølge opfindelsen, kan være en vilkårlig harpiks fremstillet ved
15 en hvilken som helst metode, når blot harpiksen har ovennævnte egenskaber. Harpiksen kan derfor fremstilles ved en kendt metode, f.eks. som beskrevet i JP patentskrift nr. 53-85890, og nogle af de ionbytterharpikser, som har ovennævnte egenskaber, er kommercielt tilgængelige.

20 Harpiksen kan være formet som granuler eller perler, og størrelsen er fortrinsvis i området fra 1410 μm til 250 μm . Det er ikke at foretrække at anvende en harpiks af for stor størrelse, da hulrumsvolumenet er stort i forhold til harpiksstørrelsen, og som en følge deraf bliver aktiviteten
25 pr. volumenenhed mindre. En for lille harpiksstørrelse er heller ikke at foretrække, da trykfaldet over f.eks. en kolonne bliver for stort, eller fordi adskillelsen af reaktionsopløsningen fra det immobiliserede enzym er vanskelig.

Den lactase, der anvendes ved fremstillingen af den
30 immobiliserede lactase ifølge den foreliggende opfindelse, fås fra en stamme hørende til *Aspergillus oryzae* som ekstracellulært enzym og har de ovenfor anførte karakteristika.

Lactasen er endvidere pH-værdistabil, idet det, når lactasen neddyppes i en pufferopløsning med vekslende pH-værdi ved 40°C i 1 time, viser sig, at der ikke sker nogen
35 formindskelse af aktiviteten i pH-værdi-området fra 4,0 til

7,5.

Lactasen er også temperaturstabil, idet den, når den neddyppes i en pufferopløsning med en pH-værdi på 4,5 og 6,5 ved 50°C eller mindre i 30 minutter, slet ingen aktivitet mister. Følgende tabel viser enzymets residualaktivitet, efter at det har været neddyppet i en opløsning ved pH-værdi 4,5 og 6,5 ved 55°C eller højere i 30 minutter.

	<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Residualaktivitet (%)</u>
	55	96 - 97
10	60	80
	65	20

Man fandt ikke nogen forskel mellem resultaterne fra forsøgene ved pH-værdi 4,5 og pH-værdi 6,5.

Lactasens aktiveringsenergi, E_a , viser ved en afbildning ifølge Arrhenius (substrat: 13,3%'s (vægt/vol) lactoseopløsning, pH-værdi = 4,5) en let krumning, og E_a -værdien ved 30°C til 40°C er 9 ± 3 kal/mol.

De ovenfor anførte værdier inkluderer naturligvis forsøgsusikkerheder, som er tilladelige ved måling af enzymatiske reaktioner. For så vidt de ovenfor nævnte karakteristika er tilfredsstillende, er fremgangsmåden til fremstilling af lactase ikke specielt begrænset. Lactasen opbevares sædvanligvis i form af pulver eller opløsning. Hvad angår aktiviteten, har et enzym med lav aktivitet ingen mening ifølge formålet med den foreliggende opfindelse. Som en følge heraf foretrækkes det at anvende et enzympulver, hvis enzymatiske aktivitet ikke er mindre end 15 ILU pr. mg af det ikke-immobiliserede enzympulver, fortrinsvis ikke mindre end 40 ILU/mg.

I den foreliggende beskrivelse er 1 ILU defineret som den mængde lactase, der producerer 1 μ mol glucose pr. minut ved pH-værdi 4,5 ved 30°C, når der som substrat anvendes en 13,3%'s (vægt/vol) lactoseopløsning. Mængden af den således fremstillede glucose defineres ved anvendelse af glucoseoxidase-peroxidase-farvesystemet. Når målingen af aktiviteten (enhed) udføres ved en anden pH-værdi eller

temperatur, vil pH-værdien eller temperaturen blive specielt anført i hvert tilfælde.

Den immobiliserede lactase ifølge den foreliggende opfindelse kan fremstilles ved en hvilken som helst fremgangsmåde, for så vidt det resulterende immobiliserede enzym 5 ligger inden for de ovenfor specificerede rammer. Følgende fremgangsmåde betragtes imidlertid som værende praktisk:

Bærestoffet neddyppes i en lactaseopløsning i en pufferopløsning (pH-værdi 4,0 til 6,5), hvorved lactasen 10 adsorberes på bærestoffet. Derpå behandles bærestoffet, som adsorberer lactasen, med glutaraldehyd ved neddykning af bærestoffet i en vandig glutaraldehydopløsning indstillet på pH-værdi 3,5 til 7,0, og blandingen omrøres til dannelse af immobiliseret lactase. Derefter vaskes ikke-reageret 15 glutaraldehyd bort. Det antages, at glutaraldehyd tværbinder mellem enzymet og bærestoffet, hvorved enzymet immobiliseres på bærestoffet med en covalent binding. Faktisk elueres enzymet ikke fra bærestoffet, selv når der anvendes en substratopløsning med høj saltkoncentration.

20 Ved denne immobiliseringsproces skal det bemærkes, at ikke-adsorberet lactase vaskes bort efter afslutningen af adsorptionsprocessen, således at der ikke dannes tværbindinger mellem de ikke-adsorberede frie enzymer. Hertil kommer, at behandlingen med glutaraldehyd efter adsorptionen 25 fortrinsvis udføres indenfor en pH-værdi på 4,0 til 6,5, hvorved den adsorberede lactase ikke elueres under glutaraldehydbehandlingen.

Med hensyn til immobiliseringstemperaturen kan den for den vandige opløsning ligge over frysepunktet, men 30 ikke over 50°C. Adsorptionen og reaktionen med glutaraldehyd kan fortrinsvis udføres ved en temperatur mellem 5°C og 45°C. Det foretrækkes at udføre adsorptionen ved en temperatur lidt højere end den, hvorved behandlingen med glutaraldehyd foregår, f.eks. kan adsorptionen udføres ved 30°C og 35 behandlingen med glutaraldehyd ved 20°C, hvorved adsorptions-hastigheden bliver høj, og der sker næsten ingen eluering

under glutaraldehydbehandlingen.

Egende glutaraldehydkoncentrationer, der anvendes ved lactaseimmobiliseringen, er 0,1 til 5%, fortrinsvis ca. 0,2 til 2%.

5 Den tid, der er nødvendig til adsorption og behandling med glutaraldehyd, afhænger af temperaturen i den enkelte proces, men er almindeligvis fra ca. 0,5 til 20 timer for hver proces. I de tilfælde, hvor adsorptionen og behandlingen med glutaraldehyd udføres ved en temperatur fra ca. 15°C
10 til 40°C, er 1 til 6 timer længe nok til hver proces.

Den mængde pulveragtig lactase, der skal immobiliseres, er ca. 200 mg/g tørt bærestof. Selv om både mængde og procentdel af immobiliserings-enzymet er mindre end hos den immobiliserede lactase, der er beskrevet i JP patentskrift
15 nr. 56-51984, er der ingen problemer i praksis. Den immobiliserede lactase ifølge den foreliggende opfindelse er overlegen i fremstillingens lethed og bærestoffets tilgængelighed.

Det er vigtigt at vaske den immobiliserede lactase grundigt med en pufferopløsning med en høj saltkoncentration
20 og vand til fjernelse af al den lactase, som ikke er tilstrækkelig bundet og derfor sandsynligvis vil skilles fra. Det enzym, som ikke skilles fra ved en sådan behandling, er netop den her omhandlede, immobiliserede lactase.

De enzymatiske egenskaber af foretrukne udførelsesformer for den her omhandlede, immobiliserede lactase er
25 anført i det følgende:

1. Optimal pH-værdi og pH-værdi-afhængighed:

Den optimale pH-værdi er fra 4,5 til 5,0, når substratet er lactose, og der observeres næsten ingen ændring i de
30 optimale pH-værdier ved immobiliseringen. Forholdet mellem aktiviteten ved pH-værdi 6,65 og aktiviteten ved pH-værdi 4,5 er $0,45 \pm 0,05$, dvs. som ovenfor anført.

2. Michaelis' konstant K_m :

$K_m = 0,2 \pm 0,1$ mol/liter (både ved pH-værdi 4,5, 30°C, substrat: lactose, og ved pH-værdi 6,5, 30°C, substrat: lactose).
35 se).

3. Inhiberingskonstant K_i ved galactose:

$K_i = (8 \pm 5) \times 10^{-2}$ mol/liter (pH-værdi 4,5, 30°C, substrat: lactose) og $K_i = (3 \pm 2) \times 10^{-2}$ mol/liter (pH-værdi 6,65, 30°C, substrat: lactose).

- 5 Begge værdier for K_m og K_i af det immobiliserede enzym er tilbøjelige til at stige med en forøgelse af koncentrationen af glutaraldehydopløsningen, der anvendes til behandlingen, og ydermere er det, ved målingen deraf, særdeles svært at opnå resultaterne med god reproducerbarhed.
- 10 Den ovennævnte værdi for K_m og K_i skal derfor ses under hensyntagen hertil.

4. pH-værdi-stabilitet:

- Når det immobiliserede enzym neddyppes i pufferopløsning med forskellig pH-værdi ved 40°C i 1 time, er det immobiliserede enzym stabilt, og der observeres ingen formindskelse i aktiviteten i pH-værdi-området fra 2,0 til 7,0.
- 15

Den her omhandlede, immobiliserede lactase besidder de ovenfor nævnte, enzymatiske egenskaber, og nogle supplerende, egenskaber, som beskrives i det følgende.

- 20 1. Aktiviteten pr. vægtenhed (specifik aktivitet)

Aktiviteten pr. g tør, immobiliseret lactase (specifik aktivitet) er ikke specielt begrænset, men en lactase med en for lav aktivitet er værdiløs set ud fra formålet med den foreliggende opfindelse. (Tør, immobiliseret lactase benævnes i det følgende "IML"). Lactasen med ca. 200 ILU/g-IML eller derover ved pH-værdi 4,5 ved 30°C foretrækkes i praksis. I den foreliggende opfindelse opnås der let lactaser med en aktivitet så høj som ca. 500 til 1000 ILU/g-IML.

25

2. Modstandsevne mod kemikalier.

- 30 Når den her omhandlede, immobiliserede lactase neddyppes i en 300 gange så stor mængde 10%'s vægt/vol benzalkoniumchloridopløsning, et desinfektionsmiddel, "Osuban" (som sælges af Takeda Chemical Industries, Ltd.), og får lov at stå i 3 måneder ved 4°C, observeres næsten ingen formindskelse i
- 35 aktiviteten. Den her omhandlede, immobiliserede lactase ses således at være yderst resistent over for kemikalier.

3. Stabilitet i en kontinuerlig reaktion.

Som belyst i detaljer i eksemplerne udføres hydrolyse af lactose på følgende måde: Den her omhandlede, immobiliserede lactase med f.eks. en specifik aktivitet på 615 ILU/g-IML
5 ved pH-værdi 4,5 ved 30°C pakkes i en søjle, som er forsynet med en kappe, og en 7%'s vægt/vol lactoseopløsning (pH-værdi 4,5) ledes kontinuerligt gennem søjlen, der holdes på 40°C ved en rumhasighed (SV) på 4,5 time⁻¹ i 100 dage. I dette
10 tilfælde forbliver hydrolyseforholdet 98 til 100%, og der observeres ingen formindskelse i aktiviteten. Det er således tydeligt, at den her omhandlede lactase er meget stabil i den kontinuerlige reaktion.

Den foreliggende opfindelse belyses i nærmere detaljer i de følgende eksempler.

15 Betingelserne for målingerne af aktiviteten af den immobiliserede lactase ifølge den foreliggende opfindelse forklares i det følgende.

1. Fremgangsmåde til måling af aktiviteten af den immobiliserede lactase:

20 Den immobiliserede lactase (0,1 til 0,3 ml) suspenderes i en 0,05 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 4,5). Til denne opløsning sættes en opløsning af lactose i samme pufferopløsning som ovenfor, således at der opnås en 13,3%'s (vægt/vol) lactoseopløsning. Opløsningen omrystes ved 30°C i 15 minutter
25 med en omryster (100 omdr. pr. min., rystebredde: 3,5 cm). Efter fjernelse af den immobiliserede lactase ved filtrering, bestemmes indholdet af glucose i filtratet under anvendelse af glucoseoxidase-, peroxidase- og farvestofsystemet. Mængden af enzymet, der producerer 1 μ mol glucose i løbet af 1 minut,
30 defineres som 1 enhed (1 ILU). pH-Niveauet og temperaturen ved målingen af aktiviteten vil blive anført i hvert enkelt tilfælde i beskrivelsen.

2. Måling af vægten af den immobiliserede lactase og bærestoffet:

35 Den immobiliserede lactase eller bærestoffet spredes ud i et højst 2 mm tykt lag og tørres under formindsket tryk (5

mm Hg eller derunder) ved 50°C i mindst 8 timer, indtil der er opnået en konstant vægt. Derefter anbringes den immobiliserede lactase eller bærestoffet, der skal undersøges, i en ekssikkator ved stuetemperatur (18 til 25°C) i 1,5 timer eller mere, hvorefter vægten heraf bestemmes. Denne vægt betragtes som værende vægten i tør tilstand. Alle vægtangivelser i den foreliggende beskrivelse er denne tørvægt.

Eksempel 1

10 Fremstilling af immobiliseret lactase samt dens sammensætning

Et tørt lactasepulver fra *Aspergillus oryzae* (7,5 g) (fremstillet af Shinnihon Kagaku Kogyo Co., aktiviteten ved pH-værdi 4,5 ved 30°C: 58 IU/mg, K_m ved pH-værdi 4,5 ved 30°C: 0,10 mol/liter) opløses i 375 ml af en 0,05 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,5). I denne opløsning neddyppes 15 50 g af en makroporøs, phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks med en partikelstørrelse på 250 til 840 μm , et specifikt overfladeareal på 31 m^2/g , et samlet volumen af makroporer med en porediameter på 100 til 2000 Å på 0,52 20 cm^3/g og en anionbytterkapacitet, der hidrører fra primære aminogruupper og sekundære aminogruupper, på 7,5 mækv/g (kommercielt tilgængeligt "Duolite®A-7", fremstillet af Diamond Shamrock). Den resulterende blanding omrøres ved 30°C i 4 timer ved ca. 150 omdr/min. til udførelse af adsorptionsprocessen. Derefter vaskes produktet grundigt med en 0,2 M 25 acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,5) og afioniseret vand, indtil intet enzym er til stede i vaskevæskan. Mængden af adsorberet enzym beregnes til at være 103 mg/g bærestof ud fra proteinindeholdet i vaskevæskerne. Det således fremkomne 30 bærestof med adsorberet lactase neddyppes i 375 ml af en 0,8%'s glutaraldehydopløsning (indstillet på pH-værdi 4,5) og omrøres i 3 timer ved 150 omdr/min., medens temperaturen holdes på 20 til 21°C. Den resulterende harpiks vaskes grundigt med en 0,2 M acetatpufferopløsning af afioniseret vand. 35 Mængden af immobiliseret enzym beregnes til at være 102 mg/g bærestof. Aktiviteten af den således opnåede, immobili-

serede lactase viser sig at være 615 ILU/g-IML ved pH-værdi 4,5 ved 30°C.

Kontinuerlig hydrolyse af lactose

5 Den her omhandlede, immobiliserede lactase (10 ml) pakkes i en søjle (indvendig diameter 12 mm), som er forsynet med en kappe. En 7%'s lactoseopløsning, indstillet på pH-værdi 4,5 med en 0,05 M acetatpufferopløsning, ledes kontinuerligt gennem søjlen, som holdes ved 40°C, i 100 dage ved
10 en rumhastighed på 4,5 time⁻¹. Den hydrolyserende mængde beregnes ud fra glucoseindholdet i den eluerende opløsning og viser sig at være holdt inden for 98 til 100% i løbet af de 100 dage. Der iagttages således ingen formindskelse i aktiviteten. Den immobiliserede lactase i søjlen steriliseres
15 én gang hver anden uge med en 500 gange så stor mængde af et kommercielt tilgængeligt desinfektionsdetergens "Diazan" (fra Asahi Garasu K.K.).

Kontinuerlig hydrolyse af lactose i skummetmælk

20 En søjle (indvendig diameter 14 mm) pakket med 15 ml af den her omhandlede, immobiliserede lactase anbringes i et rum ved 4°C, og en 12%'s vægt/vol skummetmælksopløsning (samlet sukkerindhold: 5% vægt/vol, pH-værdi 6,65) ledes kontinuerligt gennem søjlen i 85 dage ved en rumhastighed på 0,75
25 time⁻¹. Selv om den hydrolyserende mængde lactose er betragtelig ujævn straks efter hydrolysens påbegyndelse, viser gennemsnitsmængden sig at være henholdsvis 72,5% og 70,4% for de første 5 dage efter begyndelsen og de sidste 5 dage fra den 80. dag til den 85. dag. Således viser formindskelsen
30 i aktiviteten sig at være meget lille, hvis der overhovedet er nogen. I dette forsøg vaskes den immobiliserede lactase gennemsnitlig én gang hver 5. dag med en 200 gange så stor mængde "Diazan" til forebyggelse af forrådnelse af skummetmælk, hvilket er tilbøjeligt til at forekomme, når den ledes
35 gennem søjlen.

Kontinuerlig hydrolyse af lactose i valle

En søjle (indvendig diameter 12 mm) pakket med 10 ml af den her omhandlede, immobiliserede lactase anbringes i et rum ved 4°C. Vallepulver (fremstillet i New Zealand) opløses som en 7%'s vægt/vol opløsning med et lactoseindhold på 4,9%, indstilles på pH-værdi 4,4, frigøres for det uopløste materiale ved centrifugering, hvorefter der tilsættes 120 ppm n-propyl-p-hydroxybenzoat til forebyggelse af forrådnelse. Opløsningen ledes gennem søjlen ved en rumhastighed på 2,4 time⁻¹. Den gennemsnitlige hydrolyserende mængde lactose i 5 dage efter hydrolysestarten viser sig at være 87%. Efter at hydrolysen er udført kontinuerligt i 120 dage, viser den hydrolyserende mængde sig at være 78%. Denne formindskelse har ikke nogen væsentlig praktisk betydning.

I dette forsøg steriliseres den immobiliserede lactase én gang hver anden uge med en 500 gange så stor mængde "Diazan".

Måling af K_m og K_i

K_m - og K_i -værdierne af den her omhandlede, immobiliserede lactase beregnes ud fra Lineweaver-Burk-afbildninger under anvendelse af en lactoseopløsning som substrat. K_m -værdien viser sig at være 0,21 mol/liter ved pH-værdi 4,5 ved 30°C, og K_i -værdien viser sig at være $6,7 \times 10^{-2}$ mol/liter ved tilsætning af en 0,15 M galactoseopløsning, hvorimod K_m -værdien var 0,22 mol/liter ved pH-værdi 6,65 ved 30°C, og K_i -værdien var $2,5 \times 10^{-2}$ mol/liter ved tilsætning af en 0,1 M galactoseopløsning.

30 Temperaturstabilitet

Temperaturstabiliteten af den her omhandlede, immobiliserede lactase bestemmes ved pH-værdi 4,5 under anvendelse af en 13,3%'s lactoseopløsning som substrat, hvorved afbildninger ifølge Arrhenius viser en svag krumning mellem 0°C og 50°C. Hver aktiveringsenergi ved ca. 30°C til 40°C og ca. 5°C viser sig at være henholdsvis 71 ± 2 kcal/mol og 11

± 2 kcal/mol.

Eksempel 2

Fremstilling af immobiliseret lactase samt dens sammensætning

5 Et tørt lactasepulver fra *Aspergillus oryzae* (2,3 g) (aktiviteten og K_m -værdien ved pH-værdi 4,5 ved 30°C er henholdsvis 73 ILU/mg og 0,11 mol/liter) opløses i 150 ml 0,05 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,5). I denne opløsning neddyppes 20 g af en makroporøs, phenol-formaldehyd-
10 baseret anionbytterharpiks med en partikeldiameter på 250 til 840 μm , et specifikt overfladeareal på 68 m^2/g , et samlet volumen af mikroporer med en porediameter på 100 til 2000 Å på 0,56 cm^3/g og en anionbytterkapacitet hidrørende fra tertiære aminogru-
15 "Duolite®A-4", fremstillet af Diamond Shamrock). Omrøringen af blandingen fortsættes ved en væsketemperatur på $35 \pm 2^\circ\text{C}$ i 3 timer ved ca. 150 omdr/min. til adsorbering af lactasen på bærestoffet. Produktet vaskes successivt og grundigt med
20 en 0,3 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,5) og afioniseret vand, og den lactaseimmobiliserende harpiks neddyppes derefter i 150 ml af en 1,0%'s glutaraldehydopløsning (indstillet på pH-værdi 4,5). Omrøring af blandingen fortsættes ved en væsketemperatur på 20°C i 4 timer ved 150 omdr/min. til udførelse af glutaraldehydbehandlingen. Mængden af immobili-
25 seret enzym beregnes til at være 74 mg/g-bærestof. Aktiviteten af den således opnåede, immobiliserede lactase viser sig at være 635 ILU/g-IML ved pH-værdi 4,5 ved 30°C.

Kontinuerlig hydrolyse af lactose

30 En søjle (indvendig diameter 12 mm) forsynet med en kappe pakkes med 10 ml af den her omhandlede, immobiliserede lactase. Lactose opløses i en 0,05 M acetatpufferopløsning indeholdende 150 ppm n-propyl-p-hydroxybenzoat til dannelse af en 7%'s vægt/vol lactoseopløsning. Den resulterende opløsning
35 ning ledes kontinuerligt gennem den ovennævnte søjle ved 30°C, en pH-værdi på 5,5 og en rumhastighed på $4,9 \text{ time}^{-1}$.

I den kontinuerlige hydrolyse i 88 dage var formindskelsen i den hydrolyserende mængde kun fra 75% til $71 \pm 2\%$. I dette forsøg steriliseres den immobiliserede lactase i søjlen én gang hver anden uge med en 300 gange så stor mængde "Osuban".

5

Eluering af enzym med en opløsning med høj saltkoncentration

En 0,3 M phosphatpufferopløsning (pH-værdi 6,65) ledes gennem en med kappe forsynet søjle fyldt med 10 ml af den her omhandlede, immobiliserede lactase ved en søjletemperatur på 40°C i én uge ved en rumhastighed på $5,0 \text{ time}^{-1}$. Pufferopløsningen har samme pH-værdi og samme elektriske ledningsevne som mælk. Mængden af enzym og protein, som elueres i løbet af denne tid, er kun 2,8%, baseret på vægten af det immobiliserede enzym, og formindskelsen af aktiviteten er også kun 3% (den fundne aktivitet er 615 ILU/g-bærestof). Når mulige forsøgsusikkerheder tages i betragtning, kan det hævdes, at der ingen formindskelse af aktiviteten sker.

15

Hydrolyse af lactose i valle

En søjle (indvendig diameter 14 mm) forsynet med en kappe pakkes med 8 ml af den her omhandlede, immobiliserede lactase. En 7%'s vægt/vol-opløsning af vallepulver (fremstillet i New Zealand) indeholdende 150 ppm n-propyl-p-hydroxybenzoat centrifugeres ved 5000 G til fjernelse af det uopløste materiale. Den ovenstående væske (indstillet på pH-værdi 4,5) var noget emulgeret, da substratopløsningen blev ledet igennem søjlen ved en søjletemperatur på 40°C i 8 uger ved en rumhastighed på $8,5 \text{ time}^{-1}$. Både substratopløsningen og produktopløsningen afkøles til ca. 2°C for at forebygge forrådnelse i størst mulig udstrækning, og det immobiliserede enzym i søjlen steriliseres også én gang hver uge med en 300 gange så stor mængde af et desinfektion-detergens, "Osuban". Lige før sterilisationen er aktiviteten synligt formindsket, men den genvindes øjeblikkelig efter sterilisationen. Trods alt viser den hydrolyserende mængde lactose sig i den første uge at være 86% i gennemsnit, og i den 8. uge

20

25

30

35

85%. Der iagttages således ingen formindskelse i løbet af dette tidsrum.

Måling af K_m -værdi

Under anvendelse af lactose som substrat måles K_m -værdien ved pH-værdi 4,5 ved 30°C og ved pH-værdi 4,5 ved 40°C og beregnes ud fra Lineweaver-Burk-afbildninger til at være henholdsvis 0,27 mol/liter og 0,34 mol/liter.

Eksempel 3

10 Fremstilling af immobiliseret lactase samt den sammensætning

Et tørt lactasepulver fra *Aspergillus oryzae* (3,0 g) (fremstillet af Shinnihon Kagaku Kogyo Co., aktivitet: 80 ILU/mg ved pH-værdi 4,5 ved 30°C, K_m -værdi: 0,10 mol/liter ved pH-værdi 4,5 ved 30°C) opløses i 150 ml af en 0,05 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,2). I denne opløsning neddyppes 20 g af en makroporøs, phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks med en partikeldiameter på 250 til 1000 μm , et specifikt overfladeareal på 95 m^2/g , et samlet volumen af makroporer med en porediameter på 100 til 2000 Å på 0,66 cm^3/g og en anionbytterkapacitet hidrørende fra sekundære aminogruupper og tertiære aminogruupper på 4,3 mækv/g (kommercielt tilgængeligt "Duolite®S-37", fremstillet af Diamond Shamrock), og adsorptionsprocessen udføres ved 30°C i 4 timer. Efter tilstrækkelig vaskning beregnes den adsorberende mængde enzym til at være 99 mg/g-bærestof. Den lactaseadsorberende harpiks neddyppes successivt i 150 ml af en 1,5%'s glutaraldehydopløsning (indstillet på pH-værdi 4,5) og holdes ved 15°C i 4 timer. Mængden af den immobiliserede lactase viser sig at være 97 mg/g-bærestof, og aktiviteten af den immobiliserede lactase er 680 ILU/g-IML ved pH-værdi 4,5 ved 30°C.

Optimal pH-værdi og pH-værdi-afhængighed af aktiviteten

Under anvendelse af en 13,3%'s vægt/vol lactoseopløsning måles pH-værdi-afhængigheden af aktiviteten hos den her omhandlede, immobiliserede lactase ved 30°C. Den optimale

pH-værdi er fra 4,5 til 5,0, og forholdet mellem aktiviteten ved pH-værdi 6,65 og pH-værdi 4,5 er 0,44.

Opbevaringsstabilitet

5 En del af den her omhandlede, immobiliserede lactase holdes ved 35°C under formindsket tryk, indtil vandindholdet når 50%. Den således tørrede, immobiliserede lactase (som så tør ud) forsegles i luften og holdes i en termostat ved 30°C i 2 måneder. Da den derefter blev målt ved pH-værdi
10 4,5 ved 30°C var aktiviteten forblevet 630 ILU/g-IML. Opbevaringsstabiliteten er således gunstig.

Eksempel 4

Fremstilling af immobiliseret lactase samt dens sammensætning

15 Det samme tørre lactasepulver, som er anvendt i eksempel 2 (1,5 g), opløses i 75 ml af en 0,05 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,2). I denne opløsning neddyppes 10 g af en makroporøs, phenol-formaldehyd-baseret anionbytterharpiks med en partikeldiameter på 250 til 1000 μm , et specifikt
20 overfladeareal på 90 m^2/g , et samlet volumen af makroporer med en porediameter på 100 til 2000 Å på 0,6 cm^3/g og en anionbytterkapacitet hidrørende fra kvaternære ammoniumgrupper (fremstillet ved reaktion mellem en kommercielt tilgængelig "Duolite®S-30"-harpiks produceret af Diamond Shamrock
25 og 3-chlor-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid til indføring af kvaternære ammoniumgrupper i harpiksen) på 1,9 $\text{m}\text{eq}/\text{g}$. Omrøringen af blandingen fortsættes ved 150 omdr/min . i 5 timer, medens væsketemperaturen holdes på 25°C til adsorbering af lactasen på bærestoffet. Efter at være vasket
30 grundigt med 0,3 M acetatpufferopløsning (pH-værdi 5,2) og afioniseret vand, neddyppes bærestoffet, som har enzymet immobiliseret ved adsorption, i 75 ml af en 2%'s glutaraldehydopløsning (indstillet på pH-værdi 4,4), og omrøringen fortsættes i 4 timer ved 150 omdr/min ., medens væsketemperaturen holdes på 18 til 22°C, og derefter udføres glutaraldehydbehandlingen. Mængden af det immobiliserede enzym viser
35

sig at være 89 mg/g-bærestof, og aktiviteten heraf er 630 ILU/g-IML ved pH-værdi 4,5 ved 30°C.

Modstandsevne mod kemikalier

5 Den her omhandlede, immobiliserede lactase, som er delt i 4 dele, som hver især svarer til en mængde på ca. 1 g lactase, neddyppes i henholdsvis en 200 gange så stor mængde "Diazan" en 200 gange så stor mængde "Osuban", en mælkesyreopløsning med pH-værdi 2,5 og en mælkesyre-natrium-
10 hydroxidopløsning med pH-værdi 3,0 og får derefter lov til at stå ved 4°C i 1 måned. Derefter måles hver aktivitet ved pH-værdi 4,5 ved 30°C og viser sig at være henholdsvis 605, 625, 620 og 600 ILU/g-IML. Der iagttages således næsten ingen formindskelse i aktiviteten.

15

Sammenligningseksempel 1

Et tørt lactasepulver fra en gær, *Saccharomyces* (*Kluyveromyces*) *lactis*, adsorberes ved pH-værdi 6,65 på det i eksempel 1 omhandlede bærestof, og derefter behandles det
20 med en 1,5%'s glutaraldehydopløsning (indstillet på pH-værdi 6,65) til immobilisering ved covalent binding. Derefter måles aktiviteten ved pH-værdi 6,65, som svarer til mælks pH-værdi, ved 30°C under anvendelse af en 13,3%'s vægt/vol lactoseopløsning som substrat, og den viser sig kun at være 1 ILU/g-
25 IML eller mindre. Der er altså fremstillet en immobiliseret lactase med næsten ingen aktivitet af praktisk betydning.

Sammenligningseksempel 2

Immobilisering på et bærestof, der hverken har amino- eller
30 carboxylgrupper.

Eksempel 1 gentages, idet dog processen udføres i 1/5 skala, under anvendelse af en kommercielt tilgængelig phenol-formaldehyd-harpiks, "Duolite[®] ES-762" (fremstillet af Diamond Shamrock), uden andre ionbyttergrupper end phenoliske hydroxylgrupper og methylolgrupper som bærestof til
35 immobilisering af enzymet. Mængden af immobiliseret enzym

viser sig at være 49 mg/g-bærestof ved pH-værdi 4,5 ved 30°C, og aktiviteten er kun 270 ILU/g-IML, hvilket er halvdelen af den i eksempel 1 fremkomne.

5 Sammenligningseksempel 3

En kommercielt tilgængelig lactase af industriel renhed (aktivitet 5 ILU/g-IML ved pH-værdi 4,5, 30°C) fra *Aspergillus niger* adsorberes på det i eksempel 1 anvendte bærestof i en mængde på 150 mg lactase pr. g bærestof og
10 behandles derefter med en 1,5%'s glutaraldehydopløsning (indstillet på pH-værdi 4,5). Aktiviteten af den resulterende, immobiliserende lactase er mindre en 1 ILU/g-IML ved pH-værdi 6,65, hvilket er den samme pH-værdi som for mælk, og 45 ILU/g-IML selv ved pH-værdi 4,0 ved 30°C. Denne immo-
15 biliserede lactase har således en meget lav aktivitet og ingen værdi af praktisk betydning.

P A T E N T K R A V

1. Immobiliseret lactase, k e n d e t e g n e t ved, at den er en lactase fra *Aspergillus oryzae*, som har følgende egenskaber:

- 5 1) den optimale pH-værdi er 4,5 til 5,0 (substrat: lactose), idet forholdet mellem aktiviteterne ved pH-værdierne 6,65 og 4,5 (begge ved 30°C) er $0,45 \pm 0,05$,
2) Michaelis' konstant $K_m \approx 0,1 \pm 0,05$ mol/liter (pH-værdi = 4,5, 30°C, substrat: lactose) og $0,3 \pm 0,15$ mol/liter
10 (pH-værdi = 6,65, 30°C, substrat:lactose),
3) en inhiberingskonstant K_i ved galactose på $(6 \pm 3) \times 10^{-3}$ mol/liter (pH-værdi = 4,5, 30°C, substrat: lactose) og $(4 \pm 3) \times 10^{-3}$ mol/liter (pH-værdi = 6,65, 30°C, substrat: lactose),
15 og som er immobiliseret ved hjælp af covalent binding ved en glutaraldehydbehandling på et bærestof af en makroporøs, aminosubstitueret, phenol-formaldehyd-baseret anionbytterhar-piks med et specifikt overfladeareal på 5 m²/g eller derover, et samlet volumen af makroporer, der har en porediameter på
20 fra 100 til 2000 Å, på 0,2 cm³/g eller derover og en anion-bytterkapacitet, der hidrører fra aminogrupeer, substituerede aminogrupeer eller en kombination deraf, på 1 mækv/g eller derover.

2. Immobiliseret lactase ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den har følgende enzymatiske egenskaber:

- 25 1) den optimale pH-værdi = 4,5 til 5,0 (substrat: lactose), idet forholdet mellem aktiviteterne ved pH-værdierne 6,65 og 4,5 (begge ved 30°C) er $0,45 \pm 0,05$, og
2) Michaelis' konstant $K_m = 0,2 \pm 0,1$ mol/liter (pH-værdi =
30 4,5, 30°C, og pH-værdien = 6,65, 30°C, substrat: lactose).

3. Immobiliseret lactase ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den har en inhiberingskonstant K_i på galactose på $(8 \pm 5) \times 10^{-2}$ mol/liter (pH-værdi = 4,5, 30°C, substrat: lactose) og $(3 \pm 2) \times 10^{-2}$ mol/liter (pH-værdi =
35 6,65, 30°C, substrat: lactose).