

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149757 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **2576/78**

(51) Int.Cl.⁴: **C 07 K 17/14**
C 12 N 11/14

(22) Indleveringsdag: **09 jun 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **11 dec 1978**

(44) Fremlagt: **22 sep 1986**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **10 jun 1977 DE 2726188**

(71) Ansøger: ***KALI-CHEMIE AKTIENGESELLSCHAFT; Hannover, DE.**

(72) Opfinder: **Gunter *Weidenbach; DE, Dirk *Bonse; DE.**

(74) Fuldmægtig: **Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et i vand uopløseligt enzympræparat**

UK 149757 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et i vand uopløseligt enzympræparat, hvorved man bringer en uorganisk bærer, som har en gennemsnitlig porediameter mellem 100 og 1000 Å og indeholder funktionelle grupper til kovalent binding af et enzym, i kontakt med en opløsning af et enzym, binder enzymet til bæreren ved i sig selv kendte fremgangsmåder og isolerer de opnåede enzympræparater.

Det er kendt at immobilisere enzymer ved binding til organiske eller uorganiske bærere, dvs. gøre dem vand-uopløselige, således at de kan genanvendes og anvendes ved kontinuerligt arbejdende fremgangsmåder.

Organiske materialer (f. eks. cellulose, nylon, polyacrylamid) udviser som bærere betydelige ulemper, da de ikke

har tilstrækkelig mekanisk stabilitet, kan angribes af opløsningsmidler, er følsomme overfor vekslende pH-værdier og ionstyrker og delvis er tilbøjelige til at blive angrebet af mikroorganismer, hvorved bindingen til enzymer kan løsnes.

Derfor blev der som bærere foreslået uorganiske stoffer, hvortil enzymerne bindes adsorptivt eller kovalent. Den foretrukne art af bindingen afhænger af enzyms art og anvendelsesbetingelserne og af substratets beskaffenhed. Hvis f.eks. substratet foreligger i en stærk saltkoncentration, er adsorptionsmetoden ikke anvendelig, da en desorption af de adsorberede enzymmolekyler er mulig. Derfor foretrækkes den kovalente binding af enzymer til bæreren. Bæreroverfladen må da indeholde specifikke funktionelle grupper, som frembringer en binding af enzymet. Da bæreren i de fleste tilfælde ikke er i besiddelse af disse funktionelle grupper, kræves en forbehandling af overfladen. Kendt er f.eks. belægningen af uorganisk materiale med silaner, hvorved overfladen får organisk funktionelle grupper (f.eks. alkylamin), som indgår en kovalent binding med organisk stof. Endvidere er behandlingen af uorganiske bærere med sulfurylchlorid, thionylchlorid eller cyanurchlorid blevet prøvet. Desuden er det muligt at overtrække bæreroverfladen med en vandopløselig polymer, som indeholder frie funktionelle grupper, som f.eks. polyacrolein, som har mellem 10 og 70% frie aldehydgrupper, beregnet på antallet af monomere molekyler.

Som materiale for uorganiske bærere er foreslået aluminiumoxider, nikkeloxid, jernoxid, titanoxid, zirconoxid, hydroxylapatit, silicater og porøst glas, hvis porestruktur muliggør enzyms og substratets tilgængelighed til den indre overflade, men om hvis yderligere ønskværdige egenskaber, som f.eks. optimal porefordeling og overfladestørrelse, der foreligger meget forskellige angivelser.

Det er ikke med nogen af de nævnte bærere, uanset den anvendte bindingsart, lykkedes at immobilisere enzymer således, at deres specifikke aktivitet kommer nær til den specifikke aktivitet i fri tilstand. Efter angivelser af D.L. Latigue (Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, London 1975, side 127) foreligger selv under bedste immobiliseringsbetingelser kun maksimalt 80% af det på bæreren påførte enzym i aktiv form.

Fra US patentskrift nr. 3 850 751 kendes immobiliserede enzympræparater bestående af et enzym adsorberet til den indre overflade af en porøs i hovedsagen ikke-siliciumholdig keramisk bærer. Det anføres i patentskriftet spalte 3, linie 56 - 61, at de fleste enzymer kan bindes effektivt i porerne af bærere med en gennemsnitlig porediameter mellem 100 og 1000 Å, fortrinsvis mellem 100 og 500 Å, og at den ideelle gennemsnitlige porestørrelse af en bærer for et givet enzym afhænger direkte af enzymets og/eller substratets størrelse. Det anføres endvidere i spalte 6, linie 31 - 35, at enzymet, som skal adsorberes, sættes til de våde bærerpartikler i en koncentration pr. vægtenhed af bæreren, som vil tillade optimal adsorption af enzymet eller maksimal belastning i betragtning af det til rådighed værende overfladeareal.

Fra DE offentliggørelsesskrift nr. 2 514 225 kendes en fremgangsmåde til binding af enzymer til porøse uorganiske bærere ved hjælp af et koblingsmiddel. I dette offentliggørelsesskrift er det på side 5, linie 4 - 7 anført, at det som almen regel gælder om at vælge den gennemsnitlige porevidde så lille som muligt, mindst så stor som enzymet eller substratet, dvs. det største af de to, og i området 100 - 1000 Å.

I intet af disse skrifter er det angivet, hvordan man inden for det alment anvendelige område på 100 - 1000 Å kan finde en gennemsnitlig porestørrelse, som for et bestemt enzym uanset enzymlastningen giver den maksimale aktivitet af enzympræparatet; tværtimod tales kun om en tilpasning af porestørrelsen efter enzymets og substratets molekylstørrelse. Det er heller ikke blot antydnet, at der for en bærer med en given porestørrelse kan findes en optimal enzymlastning, som giver både maksimal aktivitet af enzympræparatet og maksimal specifik aktivitet af det bundne enzym, dvs. nær ved 100% af enzymets specifikke aktivitet i den frie tilstand.

Opfindelsens formål er derfor at forbedre de kendte fremgangsmåder til fremstilling af vandopløselige enzympræparater, hvorved man bringer en uorganisk bærer med funktionelle grupper i berøring med en enzymopløsning til kovalent binding, på en sådan måde, at der ved minimalt enzymforbrug opnås et maksimalt aktivt præparat.

Dette opnås med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Ifølge opfindelsens lære forsynes bærere med forskellige hyppigste porediametre først ifølge kendte metoder med koblingsmidler, som både hæfter tilstrækkeligt fast til bæreren, især indgår en kovalent binding til bæreren, og er i stand til at indgå en kovalent binding med enzymet. Som sædvanligste metode er hidtil for uorganiske bærere blevet anvendt silaniseringen, men der kan som allerede anført også anvendes andre koblingsmidler. Antallet af koblingsled på bæreren må være tilstrækkeligt stort og afhænger i vid udstrækning af bærerens overflade.

De således forbehandlede bærere tilbydes derpå forskellige enzygmængder, idet man bringer dem i berøring med enzymløsninger af forskellig koncentration og efter kendte metoder frembringer en kovalent binding af enzymet til koblingsleddet og dermed til bæreren. Efter bestemmelse af det således opnåede præparats aktivitet viser det sig, at præparatets aktivitet uanset den dertil bundne enzygmængde afhænger af den hyppigste porediameter og gennemløber et maksimum. Det har derved desuden vist sig, at bærerens kornstørrelse er uvigtig for maksimumets beliggenhed men øver indflydelse på dettes absolutte værdi. Bærerens kornstørrelse har derfor kun en underordnet betydning for opfindelsens lære og retter sig i vid udstrækning efter den påtænkte anvendelse, f.eks. substratets viskositet, arbejdsmåden og lignende.

Den på denne måde med hensyn til den hyppigste porediameter fundne optimale bærer tilbydes derpå igen forskellige mængder enzym. Derved viser det sig, at der ved bestemte enzymkoncentrationer opnås præparater, hvis specifikke aktivitet kommer nær til eller når enzymets specifikke aktivitet i fri tilstand, dvs. præparatets relative aktivitet når en værdi på 100%.

Ved bærere, som er fremstillet ud fra en SiO_2 -gel, kan den optimale bærer ifølge en fordelagtig udførelsesform af opfindelsen opnås ved, at man efter indstilling af et alkalimetallindhold i gelen på 0,1-0,5 vægt pct., beregnet som Na_2O på basis af tørstof, og tørring gløder gelen i 5 - 10 timer i en vanddampholdig luftstrøm ved 400 - 850 °C, fortrinsvis ved 570 - 750 °C.

Hensigtsmæssigt foregår tørringen i vanddampmættet luft ved 180-200°C. Til glødningen har en vanddampholdig luftstrøm med en relativ fugtighed på 40-80% vist sig fordelagtig.

Den således fremstillede bærer udviser en hyppigste pore-diameter på 17,5-300 nm, fortrinsvis 25-60 nm, og næst optimalt omkring 34 nm.

Immobiliseringsfremgangsmåden ifølge opfindelsen er anvendelig til alle teknisk og analytisk vigtige enzymer, f.eks. til hydrolaser (f.eks. amylaser, glycosidaser, proteaser), oxidoreductaser (glucoseoxidase, katalase), isomeraser (glucoseisomeraser) og transferaser (dextansucrase).

I det tilfælde at enzymet er amyloglucosidase, som i fri tilstand har en specifik aktivitet på 10-15 enheder/mg, opnås det optimale præparat derved, at man bringer den optimale bærer i berøring med en opløsning, som indeholder 25-75 mg, fortrinsvis 50 mg amyloglucosidase pr. g bærer.

Hvis der som enzym anvendes glucoseisomerase, som i fri tilstand har en specifik aktivitet på 50-70 enheder/mg, opnår man det optimale præparat, når den optimale bærer bringes i berøring med en opløsning, som indeholder 20-50 mg, fortrinsvis 25 mg glucoseisomerase pr. g bærer.

De efterfølgende eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 1

Til fremstilling af bæreren 1 blev en af natriumsilicat-opløsning med svovlsyre udfældet SiO_2 -gel med et Na_2O -indhold på 0,3 vægt pct. tørret ved 180°C i vanddampmættet luft i 3 timer. 1 kg af dette materiale blev glødet i 6 timer ved 730°C i en luftstrøm på 2 l/min., som havde

et relativt fugtighedsindhold på 80%. Efter denne behandling havde siliciumdioxidet en hyppigste porediameter på 140 nm. Bæreren 1 blev ved sigtning skilt i fraktioner. Den yderligere præparation foregik med fraktionen 0,25-0,5 mm.

150 g af denne bærerfraktion blev kogt i 8 timer med 4 l af en 10 pct. opløsning af γ -aminopropyltriethoxysilan i benzen under tilbagesvaling og efter afkøling vasket 3 gange med hver gang 1000 ml benzen og med hver gang 1000 ml acetone. Efter afddampning af opløsningsmidlet ved stuetemperatur i vakuum blev bæreren vasket 2 gange med 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og 3 gange med dobbelt destilleret vand. Tørringen foregik over P_2O_5 i vakuum. Beregnet på basis af middelværdien af C- og N-bestemmelsen indeholdt bæreren 1 0,13 mækv. silan/g.

10 g af denne bærer blev suspenderet i 20 ml opløsning af 1 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7). Amyloglucosidasens aktivitet var 11,75 enheder/mg, hvorved der som aktivitetseenhed benyttedes dannelsen af 1 μ mol glucose/min. ved 25 °C. Suspensionen blev holdt i 20 minutter under vakuum, igen luftet og efter 2 timer endnu en gang evakueret i 20 minutter. Efter 4 timer foregik adskillelsen af bærer og opløsning ved filtrering, efterfølgende 3 ganges vaskning med dobbelt destilleret vand og til slut 3 ganges vaskning med 0,01 M phosphatpuffer (pH 5). Den færdige prøve 1.1 blev opbevaret i phosphatpuffer (pH 5) ved 4 °C. C-N-analysen gav et proteinindhold på 16,5 mg/g.

Til fremstilling af prøven 1.2 blev 10 g af den silaniserede bærer 1 suspenderet i 20 ml opløsning af 0,5 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7).

Den videre arbejdsmåde svarede til præparationen af prøven 1.1. C-N-analysen af den færdige prøve 1.2 gav et proteinindhold på 9,0 mg/g.

EKSEMPEL 2

Til fremstilling af bæreren 2 blev en af natriumsilicatopløsning med svovlsyre udfældet SiO_2 -gel med et Na_2O -indhold på 0,3 vægtpct. tørret som beskrevet i eksempel 1. 1 kg af dette materiale blev glødet i 6 timer ved 680°C i en luftstrøm på 2 l/min., som havde et relativt fugtighedsindhold på 80%. Efter denne behandling havde siliciumdioxidet en hyppigste porediameter på 34 nm . Bæreren 2 blev ved sigtning adskilt i fraktioner. Den videre præparation foregik med fraktionen 0,25-0,5 mm.

150 g af denne bærerfraktion blev behandlet i 8 timer med 4 l af en 10 pct. opløsning af γ -aminopropyltriethoxysilan i benzen svarende til den i eksempel 1 angivne arbejdsmåde.

Bæreren 2 indeholdt, beregnet på basis af middelværdien af C- og N-bestemmelsen, 0,19 mækv. silan/g.

10 g af denne bærer blev suspenderet i 20 ml opløsning af 1 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og præpareret som beskrevet i eksempel 1. Den færdige prøve 2.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 30,8 mg/g.

Yderligere 10 g af den silaniserede bærer 2 blev suspenderet i 20 ml opløsning af 0,5 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og behandlet som beskrevet i eksempel 1 (prøve 1.2). C-N-analysen af den færdige prøve 2.2 gav et proteinindhold på 17,4 mg/g.

EKSEMPEL 3

Til fremstilling af bæreren 3 blev en af natriumsilicatopløsning med svovlsyre udfældet SiO_2 -gel med et Na_2O -

indhold på 0,3 vægt pct. tørret som beskrevet i eksempel 1. 1 kg af dette materiale blev glødet i 6 timer ved 640°C i en luftstrøm på 2 l/min., som havde et relativt fugtighedsindhold på 60%. Efter denne behandling havde siliciumdioxidet en hyppigste porediameter på 18 nm. Bæreren 3 blev ved sigtning adskilt i fraktioner. Den videre præparation foregik med fraktionen 0,25-0,50 mm.

150 g af denne bærerfraktion blev behandlet i 8 timer med 4 l af en 10 pct. opløsning af γ -aminopropyltriethoxysilan i benzen svarende til den i eksempel 1 angivne arbejdsmåde. Bæreren 3 indeholdt, beregnet på basis af middelværdien af C- og N-bestemmelsen, 0,51 mækv. silan/g.

10 g af denne bærer blev suspenderet i 20 ml opløsning af 1 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og præpareret som beskrevet i eksempel 1.

Den færdige prøve 3.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 26,2 mg/g.

Yderligere 10 g af den silaniserede bærer 3 blev suspenderet i 20 ml opløsning af 0,5 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og behandlet som beskrevet i eksempel 1 (prøve 1.2). C-N-analysen af den færdige prøve 3.2 gav et proteinindhold på 12,7 mg/g.

EKSEMPEL 4

For at påvise, at koblingsmidlet ikke har nogen indflydelse på præparatets aktivitet, blev fra bæreren 2 (hyppigste porediameter 34 nm) sigtet fraktionen 0,25-0,5 mm, og deraf blev 50 g udrørt i 500 ml 12,5 pct. vandig glutardialdehydopløsning i 5 minutter ved stuetemperatur. Derefter foregik en tilsætning af 500 ml mættet NH_4Cl -opløsning. Efter

4 timers omrøring ved stuetemperatur blev prøven vasket med vand til chloridfrihed og tørret over P_2O_5 i vakuum. 10 g af denne bærer blev suspenderet i 20 ml opløsning af 1 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og præpareret som beskrevet i eksempel 1.

Den færdige prøve 4.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 29,8 mg/g.

Yderligere 10 g af bæreren 2 blev suspenderet i 20 ml opløsning af 0,5 g amyloglucosidase (Merck 1330) i 0,05 M phosphatpuffer (pH 7) og behandlet som beskrevet i eksempel 1 (prøve 1.2). C-N-analysen af den færdige prøve 4.2 gav et proteinindhold på 17,9 mg/g.

EKSEMPEL 5

10 g af bæreren 1 (hyppigste porediameter 140 nm) blev suspenderet i 40 ml af en 0,05 M phosphatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,5 g glucoseisomerase (Y. Takasaki, Agr.Biol.Chem.33, Nr. 11, 1527-1534 (1969)).

Reaktionstiden udgjorde ved stuetemperatur 30 minutter. Hvert 10. minut blev reaktionsbeholderen evakueret, og efter reaktionens afslutning blev restopløsningen suget fra. Derpå foregik 3 vaskninger med vand og 0,05 M phosphatpuffer (pH 7).

Den færdige prøve 5.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 4,8 mg/g.

Til fremstilling af prøve 5.2 blev yderligere 10 g af bæreren 1 suspenderet i 40 ml af en 0,05 M phosphatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,25 g glucoseisomerase. Den yderligere arbejdsmåde svarede til præparationen 5.1.

C-N-analysen af den færdige prøve 5.2 gav et proteinindhold på 2,0 mg/g.

EKSEMPEL 6

10 g af bæreren 2 (hyppigste porediameter 34 nm) blev suspenderet i 40 ml af en 0,05 M fosfatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,5 g glucoseisomerase.

Den videre behandling svarede til eksempel 5. Den færdige prøve 6.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 22,0 mg/g.

Til fremstilling af prøven 6.2 blev yderligere 10 g af bæreren 2 suspenderet i 40 ml af en 0,05 M fosfatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,25 g glucoseisomerase. Den videre behandling svarede til eksempel 5. C-N-analysen af den færdige prøve 6.2 gav et proteinindhold på 10,2 mg/g.

EKSEMPEL 7

10 g af bæreren 3 (hyppigste porediameter 18 nm) blev suspenderet i 40 ml af en 0,05 M fosfatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,5 g glucoseisomerase.

Den videre behandling svarede til eksempel 5. Den færdige prøve 7.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 11,2 mg/g.

Til fremstilling af prøven 7.2 blev yderligere 10 g af bæreren 3 suspenderet i 40 ml af en 0,05 M fosfatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,25 g glucoseisomerase. Den videre arbejdsmåde svarede til præparationen 5.1.

C-N-analysen af den færdige prøve 7.2 gav et proteinindhold på 5,1 mg/g.

EKSEMPEL 8

10 g af den i eksempel 4 nævnte bærer (hyppigste porediameter 34 nm, behandlet med vandig glutardialdehydopløsning) blev suspenderet i 40 ml af en 0,05 M phosphatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,5 g glucoseisomerase. Den videre behandling svarede til eksempel 5. Den færdige prøve 8.1 udviste efter C-N-analysen et proteinindhold på 21,3 mg/g.

Til fremstilling af prøven 8.2 blev yderligere 10 g af den samme bærer suspenderet i 40 ml af en 0,05 M phosphatpufferopløsning (pH 7), som indeholdt 0,25 glucoseisomerase. Den videre arbejdsmåde svarede til præparationen 5.1. C-N-analysen af den færdige prøve 8.2 gav et proteinindhold på 9,8 mg/g.

EKSEMPEL 9

Aktiviteten af de i eksemplerne 1-4 beskrevne præparater 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 4.1, 4.2 samt af det til fikseringen anvendte enzym (amylomylase, Merck 1330) blev bestemt efter dinitrosalicylsyremetoden (jvf. Rick, W., Stegbauer, H.P. i: Bergmeyer, H.U. "Meth. d. Enzymatischen Analyse", Verlag Chemie 1970 side 848 ff). En aktivitetseenhed svarer til den enzyemmængde, som under inkubationsbetingelser frisætter 1 μ ækv. reducerende grupper (beregnet som glucose) pr. minut.

Inkubationsbetingelser

2 pcts. substratopløsning (Zulkowsky-stivelse Merck 12257) i 0,1 M acetatpuffer pH 5,0, 30 min., 25 °C.

Bærerfikserede præparater blev under de ovenfor anførte betingelser suspenderet i en 40 ml reaktor ved en omrøringshastighed på 600 omdr./min. (Produktdannelseshastighed uafhængig af omrøringshastigheden).

Præparaternes proteinindhold blev bestemt på basis af middelværdierne af C-N-bestemmelsen. Bærerens hyppigste porediameter blev bestemt af porefordelingen (målt med højtryksporosimeter).

I den følgende tabel 1 er sammenstillet resultaterne for prøverne 1-4. De anvendte symboler defineres som følger:

Hyppigste porediameter	D (nm)
Enzymoptagelse	c_E (mg enzym/g bærer)
Aktivitet	U (enh./g prøve)
Spec. aktivitet	$U_s = U/c_E$ (enh./mg enzym)
Spec. aktivitet i fri tilstand	U_{SF} (enh./mg enzym)
Relativ aktivitet	$U_{rel} = 100 \cdot \frac{U_s}{U_{SF}}$ (%)

Tabel 1 (Fixeret amyloglucosidase)

Prøve	Hyppigste pore-diameter D	Enzymop-tagelse		Aktivitet		
		c_E	U	U_s	U_{rel}	U_{SF}
1.1	140	16,5	98,4	5,96	51	11,75
1.2		9,0	100,5	11,16	95	
2.1	34	30,8	208,8	6,77	58	
2.2		17,4	203,9	11,71	100	
3.1	18	26,2	150,0	5,72	49	
3.2		12,7	149,5	11,77	100	
4.1	34	29,8	199,7	6,70	57	
4.2		17,9	209,4	11,70	100	

EKSEMPEL 10

Aktiviteten af de i eksemplerne 5-8 beskrevne præparater 5.1, 5.2, 6.1, 6.2, 7.1, 7.2, 8.1, 8.2 samt af den til fikseringen anvendte glucoseisomerase blev bestemt efter Takasaki-metoden (jvf. Y. Takasaki: Agr.Biol.Chem. Vol.30, Nr. 12, 1247-1253, 1966 og Z.Dische og E. Borenfreund: J.Biol. Chem.192, 583, 1951). En aktivitetseenhed er defineret som den enzymmængde, som under inkubationsbetingelser danner 1 mg fructose.

Inkubationsbetingelser

Temperatur 65°C
 Reaktionsid 1 h
 Substrat 0,1 m glucose xH₂O (Merck 8342)
 i 0,05 M phosphatpuffer, pH 8,0
 med 0,0004 M MgSO₄

De bærerfikserede præparater blev suspenderet under standard-

betingelser i omrøringsreaktoren som beskrevet i eksempel 9.

Præparaternes proteinindhold blev bestemt på basis af middelværdierne af C-N-bestemmelsen.

I den følgende tabel 2 er resultaterne af prøverne 5-8 sammenstillet.

Definitionen af de anvendte symboler er angivet i eksempel 9.

Prøve	Hyppigste poreradius	Enzymoptagelse	Aktivitet			
			U	U_s	U_{rel}	U_{SF}
5.1	140	4,8	115,4	24,0	41	58,9
5.2		2,0	117,3	58,7	99	
6.1	34	22,0	558,5	25,4	43	
6.2		10,2	556,1	54,5	93	
7.1	18	11,2	291,0	26,0	44	
7.2		5,1	292,3	57,3	97	
8.1	34	21,3	543,2	25,5	43	
8.2		9,8	544,0	55,5	94	

Resultaterne i de foranstående eksempler viser:

1. De undersøgte prøvers aktivitet U forløber over et maksimum, som er afhængigt af bærerens hyppigste poreradius.

2. Den specifikke aktivitet U_s afhænger af enzymoptagelsen og bevarer op til en bestemt enzymkoncentration c_E værdien for enzymets aktivitet i fri tilstand U_{SF} , således at U_{rel} bliver 100. Overskrides denne enzyemmængde, synker den specifikke aktivitet, hvorved produktet af U_s og c_E forbliver konstant.

3. Den af bæreren optagne enzyemmængde er en funktion af den hyppigste porediameter. Systemet enzym/bærer udviser maksimal aktivitet ved den mindst mulige enzyemmængde, når den optimale bærer 2 (hyppigste porediameter 34 nm) har optaget 17,4 mg amyloglucosidase/g eller 10,2 mg glucose-isomerase/g (prøverne 2.2 hhv. 6.2).

4. De undersøgte prøvers enzympoptagelse og aktivitet er uafhængige af koblingsmidlet.

Dette skal i det følgende belyses nærmere med henvisning til de vedføjede tegninger, på hvilke fig. 1 - 3 viser tre diagrammer, der bygger på enzympreparater med amyloglucosidase-aktivitet.

Ifølge diagrammet i fig. 1 omsættes fem forskellige bærere, nemlig

1. en bærer med en hyppigste porediameter på 180 Å (svarer til bærer 3 ifølge eksemplerne 3 og 7),
2. en bærer med en hyppigste porediameter på 340 Å (svarer til bærer 2 ifølge eksemplerne 2 og 6),
3. en bærer med en hyppigste porediameter på 550 Å,
4. en bærer med en hyppigste porediameter på 660 Å,
5. en bærer med en hyppigste porediameter på 1400 Å (svarer til bærer 1 ifølge eksemplerne 1 og 5)

hver for sig med

a) en enzymopløsning, som indeholder 25 mg amyloglucosidase pr. g bærer (25 mg/g).

For de således opnåede fem enzympræparater bestemtes den absolutte aktivitet U , dvs. aktiviteten pr. g enzympræparat, og de opnåede aktivitetsværdier blev indført i diagram 1 over for de hyppigste porediametre. Værdierne giver tilsammen den nedre kurve i diagram 1. Kurven viser, at bæreren med en hyppigste porediameter på 340 Å ved det nævnte enzymtilbud har givet præparatet med den højeste absolutte aktivitet.

Når man omsætter de samme fem bærere hver for sig med

- b) en enzymopløsning, som indeholder 50 mg amyloglucosidase pr. g bærer (50 mg/g),

bestemmer de opnåede præparaters absolutte aktivitet, og indfører de opnåede værdier i diagram 1, så får man den øvre kurve. Også denne kurve viser, at bæreren med en hyppigste porediameter på 340 Å ved det nævnte enzymtilbud har givet præparatet med den højeste absolutte aktivitet.

Når man endelig omsætter de samme fem bærere hver for sig med

- c) en enzymopløsning, som indeholder 100 mg amyloglucosidase pr. g bærer (100 mg/g),

bestemmer de opnåede præparaters absolutte aktivitet, og indfører de opnåede værdier i diagram 1, så får man en kurve, som falder sammen med den øvre kurve. Også denne tredje kurve viser, at bæreren med en hyppigste porediameter på 340 Å ved det nævnte enzymtilbud har givet præparatet med den højeste absolutte aktivitet.

Kurverne i diagrammet i fig. 1 viser altså, at det er muligt blandt flere i betragtning kommende bærere at udvælge den optimale bærer allerede med nogle få enzymop-

løsninger af forskellig koncentration - ja endog med enzymopløsninger af samme koncentration - og at enzymkoncentrationen ikke spiller nogen udslagsgivende rolle for udvælgelsen af den optimale bærer.

Kurverne i diagram 1 viser imidlertid også, at det ikke er tilstrækkeligt for at nå til et optimalt enzympræparat kun at udvalge den optimale bærer, men at også enzymkoncentrationen spiller en rolle.

Derved synes det først at være nærliggende, at præparatet bliver mere aktivt, jo mere enzym der ved fremstillingen af præparatet tilbydes bæreren. Dette modsiges imidlertid af den kendsgerning, at kurverne 2 og 3, som blev opnået ved et enzymtilbud på henholdsvis 50 og 100 mg enzym/g bærer, falder sammen. Disse kurver viser, at "mere" enzym ikke ubetinget giver "mere" aktivitet.

Denne erkendelse tydeliggøres i diagrammet i fig. 2.

Ifølge diagram 2 blev den optimale bærer med en hyppigste porediameter på 340 Å tilbudt henholdsvis

1. 25 mg amyloglucosidase/g bærer,
2. 50 mg amyloglucosidase/g bærer (svarer til eksempel 2.2),
3. 100 mg amyloglucosidase/g bærer (svarer til eksempel 2.1),
4. 150 mg amyloglucosidase/g bærer.

Af det nævnte enzymtilbud har bæreren ved omsætningen gjort brug på den måde, at det færdige enzympræparat har optaget

i tilfælde 1: 9,3 mg enzym/g bærer ($c_E = 9,3 \text{ mg/g}$),
 i tilfælde 2: 17,4 mg enzym/g bærer ($c_E = 17,4 \text{ mg/g}$),
 i tilfælde 3: 30,8 mg enzym/g bærer ($c_E = 30,8 \text{ mg/g}$),
 i tilfælde 4: 44 mg enzym/g bærer ($c_E = 44 \text{ mg/g}$).

Når man nu bestemmer den absolutte aktivitet U af de opnåede enzympræparater og indfører dem i diagrammet over for enzymoptagelsen c_E , ser man, at aktiviteten i begyndelsen ligeledes stiger med stigende enzymoptagelse, men at en større enzymoptagelse fra et bestemt enzymtilbud eller en bestemt enzymoptagelse ikke længere medfører nogen aktivitetsstigning.

Dette modsiger alle os bekendte publikationer, ifølge hvilke der altid er arbejdet efter mottoet "meget giver meget". Kurven viser imidlertid, at fra et bestemt enzymtilbud eller en bestemt enzymoptagelse er enhver forøgelse i enzym et spild af enzym, da denne forøgelse ikke bidrager til aktiviteten.

Optimum nås, når man (som vist ved amyloglucosidase) pr. g bærer tilbyder 50 mg enzym svarende til at 1 g bærer har optaget 17,4 mg enzym.

Dette tydeliggøres også af diagrammet i fig. 3, hvori den relative aktivitet U_{rel} er indført over for enzymoptagelsen c_E for de samme præparater som i diagrammet i fig. 2.

Den relative aktivitet U_{rel} er resultatet af en regneoperation og giver forholdet mellem den specifikke aktivitet U_S (dvs. aktiviteten pr. mg bundet enzym) og den specifikke aktivitet i fri tilstand U_{SF} (dvs. aktiviteten pr. mg enzym i friubundet tilstand), udtrykt i procent.

Diagram 3 viser, at ved lavt enzymtilbud henholdsvis lav enzymoptagelse først alt bundet enzym er lige så aktivt som enzymet i fri tilstand, dvs. den relative aktivitet er 100% eller næsten 100%, men at den relative aktivitet fra et bestemt enzymtilbud henholdsvis fra en bestemt enzymoptagelse falder meget stærkt, dvs. at en stadig større andel af det bundne enzym foreligger i inaktiv form, eller udtrykt på en anden måde, at en stadig større andel af det bundne enzym ikke kan udfolde nogen aktivitet, hvad der, som forklaret ovenfor, betyder spild af enzym.

Til optimal udnyttelse af enzymets egenaktivitet må der altså tilstræbes en relativ aktivitet U_{rel} af det bundne enzym på nær ved eller lig med 100% (hvad der ifølge diagram 3 er tilfældet for den viste amyloglucosidase ved en enzymoptagelse c_E på op til 17,4 mg/g bærer), men samtidig må der også med henblik på en størst mulig omsætning i praktisk brug (dvs. maksimalt rum-tid-udbytte) tilstræbes en maksimal absolut aktivitet af præparatet (hvad der ifølge diagram 2 er tilfældet for den viste amyloglucosidase ved en enzymoptagelse på fra 17,4 mg/g bærer).

Man har således fundet den bestemte porestørrelse af bæreren og det bestemte enzymtilbud, som skal anvendes for at fremstille et maksimalt aktivt enzympræparat ved ringest muligt enzymforbrug.

Da enzymomkostningerne er betragtelige og stiger stærkt med den krævede renhedsgrad, altså spiller en betydelig rolle for den økonomiske indsats, er der med fremgangsmåden ifølge opfindelsen for første gang skabt mulighed for også at anvende dyre enzymer teknisk, da fremgangsmåden gør det muligt ved anvendelse af den ifølge opfindelsen udvalgte bærer at optimere den for maksimal aktivitet nødvendige enzymmængde.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et i vand uopløseligt enzympræparat, hvorved man bringer en uorganisk bærer, som har en gennemsnitlig porediameter mellem 100 og 1000 Å og indeholder funktionelle grupper til til kovalent binding af et enzym, i kontakt med en opløsning af et enzym, binder enzymet til bæreren ved i sig selv kendte fremgangsmåder og isolerer de opnåede enzympræparater, k e n d e t e g n e t ved, at man først bringer bærere, der adskiller sig fra hverandre ved deres hyppigste porediameter inden for de ovennævnte grænser på 100 - 1000 Å, i kontakt med enzymopløsninger, der adskiller sig fra hverandre ved deres enzymindhold, binder enzymet til bærerne, isolerer enzympræparaterne, bestemmer deres aktivitet og blandt de benyttede bærere udvalger den med en bestemt hyppigste porediameter, som uanset den dertil bundne enzymmængde har givet præparatet med den højeste aktivitet, og at man derpå bringer den udvalgte bærer i kontakt med enzymopløsninger, der adskiller sig fra hverandre ved deres enzymindhold, binder enzymet til bæreren, isolerer enzympræparaterne, bestemmer deres aktivitet og specifikke aktivitet og af de benyttede forskellige enzymopløsninger udvalger den, som har givet præparatet med den maksimale aktivitet og en specifik aktivitet nær ved eller lig med enzymets specifikke aktivitet i den frie tilstand.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man som bærer udvalger en SiO_2 -gel, som efter indstilling af et alkalimetallindhold på 0,1 - 0,5 vægt pct., beregnet som Na_2O , og tørring er glødet i 5 - 10 timer i en vanddampholdig luftstrøm ved 400 - 850 °C, fortrinsvis ved 570 - 750 °C.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at tørringen er udført i vanddampmættet luft ved 180 - 200 °C.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e - t e g n e t ved, at glødningen er udført i en vanddampholdig luftstrøm med en relativ fugtighed på 40 - 80%.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n d e - t e g n e t ved, at der som enzym anvendes amyloglucosidase.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at bæreren ved anvendelse af en amyloglucosidase med en specifik aktivitet i fri tilstand på fra omkring 10 til omkring 15 enheder/mg bringes i kontakt med en opløsning, som indeholder 25-75 mg, fortrinsvis 50 mg amyloglucosidase pr. g bærer.

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n d e - t e g n e t ved, at der som enzym anvendes glucoseisomerase.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at bæreren ved anvendelse af en glucoseisomerase med en specifik aktivitet i fri tilstand på fra omkring 50 til omkring 70 enheder/mg bringes i kontakt med en opløsning, som indeholder 20-50 mg, fortrinsvis 25 mg glucoseisomerase pr. g bærer.

Fremdragne publikationer:

DK patent nr. 120432

DE offentliggørelsesskrift nr. 2514225

US patenter nr. 3850751, 3892580.



