

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 156775 B



(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 11/02

(21) Patentansøgning nr.: 2716/86

(22) Indleveringsdag: 10 jun 1986

(41) Alm. tilgængelig: 13 dec 1986

(44) Fremlagt: 02 okt 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 12 jun 1985 DK 2620/85 12 jun 1985 DK 2619/85

(71) Ansøger: *Novo-Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Shmuel *Amotz; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Frømgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt**

(56) Fremdragne publikationer

EP pat. nr. 35121

(57) Sammen drag:

2716-86

Immobiliseret enzymprodukt og anvendelse deraf.

Det immobiliserede enzymprodukt er tiltænkt anvendt i en enzymatisk proces, hvorved enzymproduktet suspenderes i substratet, hvorefter den enzymatiske proces bringes til at forløbe og enzymproduktet fjernes fra substratet ved væskefaststof-separation, og det omfatter ud over enzym en polyamin og et salt med en anion, der har 3-6 ioniserbare grupper. Det immobiliserede enzymprodukt er meget billigt, det udviser ingen enzymlækning, og det udviser overlegen filtrerbarhed og suspenderbarhed.

DK 156775 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt.

Anvendelse af opløselige enzymer hører til kendt teknik, idet fordelene hovedsageligt er en simpel drift, eftersom man 5 ikke behøver nogen søjle med ledsagende tryktab og tilstopning (Fo 1), og idet ulemperne hovedsageligt er det forhold, at enzymet (aktivt eller inaktiveret) foreligger i det udgåede materiale, som er det ønskede reaktionsprodukt (Uo 1).

Anvendelsen af immobiliserede enzymer hører også til 10 kendt teknik, hvorved fordelene hovedsageligt er den gode økonomi, der hidrører fra den gentagne anvendelse (i modsætning til anvendelsen af opløselige enzymer, som kun anvendes en gang) (Fu 1); på den anden side er enzymudbyttet i det immobiliserede produkt relativt lavt, og det immobiliserede produkt er relativt 15 dyrt (Uu 1), hvortil kommer, som tidligere anført, at søjleprocessen er ret vanskelig at udføre, især over lange tidsrum (Uu 2).

Det er muligt at kombinere de to anvendelser ved at gøre brug af en meget billig immobilisering (billig både hvad 20 angår immobiliseringsudbytte og immobiliseringsparametre), hvorved det immobiliserede enzym ikke nødvendigvis foreligger som i fysisk henseende stabile partikler, men f.eks. som en filterkage eller en flydende suspension, hvorved de eneste krav ud over en minimal enzymlækage fra det immobiliserede enzym under drift er 25 evnen af det immobiliserede enzym til at blive suspenderet i og kunne filtreres fra substratet; herved opnås en simpel drift, god økonomi og udelukkelse af enzymet i det udgåede materiale, hvis det immobiliserede enzym fjernes (ved filtrering eller centrifugering) efter den enzymatiske reaktion.

30 På denne måde tilvejebringes der et produkt, som udviser alle de angivne fordele (Fo 1, Fu 1), og som ikke udviser nogen af de angivne ulemper (Uo 1, Uu 1, Uu 2). Et produkt af denne art er beskrevet i DE offentliggørelsesskrift nr. 2522484, selv om det ikke definitivt fremgår af dette offentliggørelsesskrift, at det immobiliserede enzym skulle være meget billigt og 35 at det skulle være tilsigtet, at det kun blev anvendt en gang.

En ulempe, der knytter sig til immobiliserede enzymprodukter af denne art, er den kendsgerning, at suspenderbarheden og filtrerbarheden deraf ikke er tilfredsstillende, således at der foreligger et behov for forbedring deraf.

- 5 Opfindelsens formål er således tilvejebringelsen af en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt, der skal anvendes i en enzymatisk proces, hvorved enzymproduktet suspenderes i substratet, hvorefter den enzymatiske proces gennemføres og enzymproduktet fjernes fra substratet ved væske-
10 tørstof-separation, hvilket enzymprodukt skal være yderst billigt og ikke-lækkende samt udvise en overlegen filtrerbarhed og suspenderbarhed.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

- 15 Det må forstås, at det er tilsigtet, at betegnelsen "enzym" skal dække alle arter af enzymer, herunder enzympulver, levende, enzymholdige celler og homogeniserede celler. Opfindelsen er principielt heller ikke begrænset til nogen specifikke enzymgrupper; ikke begrænsende eksempler på enzymer, som kan
20 anvendes i fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er glucose-isomeraser, glucoseoxidaser, amyloglycosidaser, proteaser, amylaser, især termostabile α -amylaser, lipaser, pullulanaser, invertaser, inulinaser, α -acetolactat-decarboxylaser (ALDC), fructosyl-transferaser og nitrilaser.

- 25 Betegnelsen "polyamin" omfatter i denne beskrivelse med krav alle polymere, der indeholder et større antal aminogrupper, enten primære, sekundære, tertiære eller quarternære, enten i deres frie form eller som salte. Ikke begrænsende eksempler er chitosan, polyethyleniminer, polyvinylaminer og cationiske
30 flokkuleringsmidler.

- Ikke begrænsende eksempler på salte, der har en anion med 3-6 ioniserbare grupper, er følgende: phosphater, herunder hypo- og pyrophosphater, tripolyphosphater, thiophosphater, trimetaphosphater, polymetaphosphater, phosphomolybdate,
35 citrater, ferri- og ferro-cyanider, silicater og EDTA.

Det har overraskende vist sig, at både suspenderbarhed og filtrerbarhed af enzymproduktet i høj grad forøges ved tilsætning af saltet med en anion med 3-6 ioniserbare grupper til

den flokkulerede masse omfattende polyamin og enzym. Hvis saltet med en anion med 3-6 ioniserbare grupper erstattes med et salt med mere end 6 ioniserbare grupper (f.eks. alginater eller polyacrylater) eller et salt med en anion med mindre end 3 ioniserbare grupper, bliver suspenderbarheden og filtrerbarheden af enzymproduktet ikke forbedret væsentligt.

I europæisk patentansøgning med publikationsnummer 35121 er der beskrevet et immobiliseret enzym omfattende chitosan og et polyphosphat. Dette kendte immobiliserede enzym er ikke let 10 suspenderbart som det immobiliserede enzym ifølge opfindelsen, og det ville også frembyde høj diffusionsmodstand, ligeledes i modsætning til det immobiliserede enzym ifølge opfindelsen.

En foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det immobiliserede enzymprodukt 15 er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 2 angivne. Det har vist sig, at denne selektion af chitosan og tripolyphosphat er særlig velegnet for AMG hvad angår den forbedrede suspenderbarhed og filtrerbarhed. Hvis chitosan anvendes som polyaminen og enzymet er AMG, har det vist sig, at 20 enzymudbyttet udviser et optimum for et vist forhold chitosan/AMG.

En foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden til fremstilling af det immobiliserede enzymprodukt ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 3 25 angivne. Herved opnås et meget billigt, men alligevel effektivt produkt.

Opfindelsen skal illustreres yderligere ved de følgende eksempler. Eksempel 1 illustrerer fremstillingen af det immobiliserede enzympræparat ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, 30 eksempel 2 illustrerer anvendelsen af det immobiliserede enzympræparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, og i eksempel 3 påvises virkningen på lækagen af saltet med en anion med 3-6 ioniserbare grupper.

Eksempel 1

100 ml kommercielt AMG-præparat 200 L blev fortyndet med afioniseret vand til 400 ml og derpå koncentreret i en Amicon
5 ultrafiltreringscelle model 402 til 60 ml. Der skal henvises til NOVO publikation AMG (B 020i-GB 2500 April 1984). 4 ml af dette koncentrat blev fortyndet til 100 ml med afioniseret vand, 8 g kaolin, 4 ml 10% w/v glutaraldehyd, hvis pH var indstillet på 6,0 med KOH, og 50 ml 0,5% chitosan i 0,1% eddikesyre blev tilsat i
10 den angivne rækkefølge, alle komponenter under konstant omrøring, og man lod blandingen omrøre i to timer. 60 ml 1% natriumtripolyphosphat blev derpå tilsat, og omrøringen blev fortsat i yderligere en time, hvorefter partiklerne blev opsamlet ved vacuumfiltrering, hvorved der opnåedes 30,8 g vådt præparat. Til ølbehand-
15 ling (se eksempel 2) anvendte man ca. 75 mg af det våde præparat (svarende til ca. 3 oprindelige enheder enzym, se NOVO publikation AMG (B 020i-GB 2500 April 1984)) per 100 ml urt.

20 Eksempel 2

Urtkoncentrat af typen stærk pilsner blev købt fra MATAS. Det blev fortyndet med afioniseret vand, filtreret, og indstillet på 12° Balling. Derpå blev det afkølet til 15°C i et
25 bad, og presset Sacch. carlsbergensis gær blev tilsat med en hastighed af 2 g per 100 ml urt, sammen med enten opløseligt enzym (kommerciel AMG 200 L, 0,005 ml/100 ml urt) eller det immobiliserede enzymprodukt fra eksempel 1 (en mængde svarende til 3 oprindelige enheder per 100 ml urt). Man gennemførte parallelle
30 forsøg både med beholdere, hvori der ikke fandt nogen omrøring sted, og med beholdere, hvori der fandt omrøring sted. Der blev udtaget prøver med regelmæssige intervaller, der blev kogt, filtreret og analyseret for indholdet af kulhydrater. Som det fremgår af tabel 1, kunne det immobiliserede enzymprodukt konkur-
35 rere rimeligt godt med det opløselige enzym.

Tabel 1

	% nedbrydning af DP ₄ + fraktioner			
	160 timer		320 timer	
	ikke omrørt	omrørt	ikke omrørt	omrørt
5 enzym				
opløseligt	54	56	74	77
immobiliseret	50	59	66	79

Ved DP₄+ forstås kulhydrater med en polymerisationsgrad over 4.

10

Ved slutningen af gæringen blev der udtaget prøver, der blev filtreret uden kogning, og der blev analyseret for AMG-aktivitet. Man fandt ca. 100% af den oprindelige aktivitet i 15 forsøgene med det opløselige enzym, medens man ikke kunne konstatere nogen aktivitet i forsøgene med det immobiliserede enzym.

Eksempel 3

20

For at påvise virkningen af visse salte på lækagen gentog man metoden i eksempel 1 med et antal præparater, hvor man anvendte andre medier end polyphosphatopløsninger til behandling af de med chitosan flokkulerede masser. Hvert af præparaterne 25 blev derpå undersøgt for aktivitet og lækage, som beskrevet i eksempel 2, med følgende resultater:

° Tabel 2

			% aktivitets- udbytte	% aktivitets- lækage
	medium			
5	-	H ₂ O	72	2,1
	0,06M	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	72	0,6
	0,06M	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	73	0,5
	0,05M	Na ₃ citrat	72	0,4
	0,03M	Na ₅ O ₁₀ P ₃ *	72	0,2
10	0,03M	Na ₅ O ₁₀ P ₃ **	73	0,2

* natriumtripolyphosphat

** natriumtripolyphosphat indstillet til pH 6 med HCl

PATENTKRAV

5

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt til brug ved en enzymatisk proces, hvori enzym-
10 produktet suspenderes i substratet, hvorefter den enzymatiske proces gennemføres og enzymproduktet fjernes fra substratet ved væske-tørstof-separation, kendetegnet ved, at man til en opløsning af enzymet tilsætter et fyldstof, et tværbindingsmiddel og en polyamin, hvorpå man under omrøring tilsætter et salt med
15 en anion med 3-6 ioniserbare grupper, hvorefter det immobiliserede enzymprodukt isoleres som en flokkuleret masse.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at enzymet er AMG, at polyaminen er chitosan og at saltet med en
20 anion med 3-6 ioniserbare grupper er et tripolyphosphat.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at tværbindingsmidlet er glutaraldehyd og/eller at fyldstoffet er kaolin.

25

30