



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 0060/82
(22) Indleveringsdag: 08 jan 1982
(41) Alm. tilgængelig: 10 jul 1982
(44) Fremlagt: 13 maj 1991
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 09 jan 1981 JP 2410/81

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 11/10
C 12 N 11/04

- (71) Ansøger: *TANABE SEIYAKU CO., LTD.; 2-10 Doshomachi 3-chome, Chuo-ku; Osaka, JP
(72) Opfinder: Ichiro *Chibata; JP, Tetsuya *Tosa; JP, Isao *Takata; JP

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans og fremgangsmåde til fremstilling af samme

(56) Fremdragne publikationer

GB pat. nr. 1568328
US pat. nr. 4138292

(57) Sammendrag:

60-82

En immobiliseret, enzymatisk aktiv substans med forbedret stabilitet af enzymatisk aktivitet omfatter en enzymatisk aktiv substans, der er indesværret i en gelmatrix af et polysaccharid, hvori der er indført en eventuelt substitueret aminogruppe, og med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet. Den immobiliserede, enzymatisk aktive substans fremstilles ved sammenblanding af den enzymatisk aktive substans og en vandig opløsning af polysaccharidet med efterfølgende geldannelse af polysaccharidet.

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt, immobiliseret, enzymatisk aktiv substans og en fremgangsmåde til fremstilling af samme.

Enzymatiske reaktioner er blevet benyttet ved fremstilling af forskellige værdifulde materialer og ved dekomponering af forskellige uønskede materialer eller stofskifteprodukter, der er skadelige for mennesker og husdyr, og for effektivt at udføre enzymatiske reaktioner er der ved reaktionerne blevet anvendt immobiliserede, enzymatisk aktive substanser såsom enzymer eller mikrobielle celler.

Der kendes forskellige fremgangsmåder til fremstilling af immobiliserede, enzymatisk aktive substanser. Ved én sådan fremgangsmåde indespærres en enzymatisk aktiv substans i en gelmatrix af et polysaccharid såsom agar eller carragenan ved afkøling af en vandig blanding af substansen og polysaccharidet til opnåelse af et immobiliseret præparat. Et sådant immobiliseret præparat har imidlertid nogle ulemper. Fx. er det immobiliserede præparat, der opnås ved anvendelse af agar, tilbøjeligt til at miste sin netværkstruktur og blive omdannet til sol inden for et kort tidsrum, når det anvendes i en enzymatisk reaktion ved høj temperatur. Når der anvendes carragenan, er gelmatrixen i det resulterende præparat ustabil og forårsager udsivning af den enzymatisk aktive substans fra præparatet, hvilket resulterer i en sænkning af den enzymatiske aktivitet under anvendelse af præparatet.

Opfinderne har tidligere fundet ud af, at en immobiliseret, enzymatisk aktiv substans med udmærkede egenskaber uden de ovenfor nævnte ulemper kan opnås ved at indespærre en enzymatisk aktiv substans i en gelmatrix af et polysaccharid med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest ($-SO_3H$) i molekylet under specielle betingelser, bl.a. ved tilstedeværelse af ammoniumioner eller en vandopløselig amin under gelatineringen, og har indleveret patentansøgninger, der angår den immobiliserede substans og dens fremstilling (US patentskrift nr. 4.138.292 svarende til japansk offentliggørelsesskrift nr. 6483/1978).

Som et resultat af yderligere intensive studier har nærværende opfindere nu fundet ud af, at stabiliteten af immobiliserede substansers enzymatiske aktivitet kan forøges bemærkelsesværdigt ved som gelmatrix for disse at anvende et polysaccharid med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, til hvilket der covalent er bundet eventuelt substituerede aminogrupeer.

I overensstemmelse hermed tilvejebringer opfindelsen en immobiliseret, enzymatisk aktiv substans, hvor en enzymatisk aktiv substans er

indespærret i en gelmatrix af et polysaccharid med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, hvilken immobiliserede, enzymatisk aktive substans er ejendommelig ved, at der covalent er bundet eventuelt substituerede aminogru-
per til polysaccharidet.

- 5 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man sammenblender en enzymatisk aktiv substans og en vandig opløsning af et polysaccharid, hvortil der er bundet en eventuelt substitueret aminogruppe, og med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, og derefter lader polysaccharidet danne gel i blandingen, således at den enzymatisk
10 aktive substans indespærres i den resulterende gelmatrix.

Den ifølge opfindelsen anvendte gelbasis er et polysaccharid med mindst 10 vægt/vægt %, sædvanligvis ca. 10 til 65 vægt/vægt % sulfatrest (-SO₃H) i molekylet, hvortil der er bundet en aminogruppe eller substitueret aminogruppe. Eksempler på polysaccharider med mindst 10 vægt/vægt
15 % sulfatrest i molekylet indbefatter carragenan, furcellaran og cellulosesulfat. Carragenan er et polysaccharid med 20 til 30 vægt/vægt % sulfatrest, som opnås ved raffinering af en ekstrakt af alger tilhørende Rhodophyceae såsom Gigartinaceae og Solievianaceae. I forbindelse med
nærværende opfindelse kan der anvendes kommercielt tilgængelig carrage-
20 nan, fx. "GENU® GEL WG", "GENU® GEL CWG" og "GENU® VISCO J" (dette er handelsbetegnelser for carragenan fremstillet af Københavns Pektinfabrik A/S). Furcellaran er et polysaccharid med 12 til 16 vægt/vægt % sulfatrest, som opnås ved at ekstrahere en type alger, der tilhører Rhodophyceae, dvs. Furcellaria fastigiata, og der kan fx. anvendes furcellaran
25 fremstillet af Litex Co., Danmark. Et eksempel på cellulosesulfat er "KELCO SCS" fremstillet af Kelco Co.

Den substituerede aminogruppe, der bindes til polysaccharidet med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, kan fx. være en monoalkylaminogruppe med 1 til 12 carbonatomer i alkyl-
30 aminogruppe, en monoethylaminogruppe, en monopropylaminogruppe eller en monobutylaminogruppe, og en dialkylaminogruppe med 1 til 12 carbonatomer i alkyl-
delen såsom en dimethylaminogruppe, en diethylaminogruppe, en dipropylaminogruppe eller en dibutylaminogruppe.

Aminogruppen eller den substituerede aminogruppe kan fx. bindes til
35 polysaccharidet med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, ved aktivering af polysaccharidet med en epoxyforbindelse (fx. epichlorhydrin) eller et cyanhalogenid (fx. cyanbromid) og omsætning af det aktiverede polysaccharid med ammoniumhydroxid, en monoalkylamin eller en di-

alkylamin. Hvis man anvender en epoxyforbindelse, gennemføres indføringen fortrinsvis ved fx. omsætning af polysaccharidet med en epoxyforbindelse ved pH ca. 7 til 14 ved 5 til 85⁰C i ca. 10 minutter til 48 timer og efterfølgende omsætning af det resulterende aktiverede polysaccharid med ammoniumhydroxid, en monoalkylamin eller en dialkylamin ved pH ca. 7 til 14 ved 5 til 85⁰C i ca. 10 minutter til 72 timer. Hvis der anvendes et cyanhalogenid, gennemføres indføringen fortrinsvis ved fx. at indstille pH af en vandig opløsning af polysaccharidet til ca. 8 til 12, tilsætte en passende mængde af et cyanhalogenid, yderligere indstille pH af den resulterende blanding til ca. 8 til 12 og dernæst omsætte blandingen med ammoniumhydroxid, en monoalkylamin eller en dialkylamin ved ca. 5 til 30⁰C i ca. 1 til 24 timer.

Indholdet af aminogruppen eller den substituerede aminogruppe i det resulterende polysaccharid med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, hvori der er indført en sådan gruppe, er normalt således, at mængden af nitrogen pr. 1 g (tør vægt) af polysaccharidet er 0,1 til 20 mg, fortrinsvis 1 til 10 mg.

Den ifølge opfindelsen anvendte enzymatisk aktive substans kan være enzymer, mikrobielle celler o.l.

Enzymerne, der anvendes ifølge opfindelsen, er ikke specificerede og omfatter fx. oxidoreduktaser (fx. aminosyreoxidase, uricase, catalase, etc.), transferaser (fx. aspartatacetyltransferase, glycinamino-transferase, aminosyrettransferase, etc.), hydrolaser (fx. asparaginase, acetylcholinesterase, aminoacylase, etc.), lyaser (fx. fumarase, aspartatdecarboxylase, aspartase, citratlyase, etc.), isomeraser (alaninracemase, glucoseisomerase, glutamatracemase, etc.) og lygaser (fx. asparaginsyntetase, glutathionsyntetase, glutaminsyntetase, etc.).

De mikrobielle celler, der anvendes ifølge opfindelsen, er heller ikke specificerede, for så vidt de kan anvendes som enzymkilder. Eksempler på mikrobielle celler omfatter mikrobielle celler af bakterier, gær, skimmelsvampe, lav og protozoer indeholdende de ovenfor nævnte enzymer. De mikrobielle celler kan være levende celler, frysetørrede celler eller celler opnået ved nedfrysning og optøning af levende celler, ved behandling af levende celler med acetone eller ved opvarmning af levende celler.

Den enzymatisk aktive substans, der anvendes ifølge opfindelsen, kan have et enkelt enzymesystem eller et multipelt enzymesystem. Ydermere kan der anvendes to eller flere enzymatisk aktive substanser på samme

tid.

Ved udførelsen af fremgangsmåden til fremstilling af de immobiliserede, enzymatisk aktive substanser ifølge opfindelsen fremstilles fx. først en vandig opløsning af polysaccharidet, hvortil der er bundet en eventuelt substitueret aminogruppe, og med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet. Fremstillingen af den vandige opløsning kan let gennemføres ved tilsætning af polysaccharidet til varmt vand ved 30 til 90°C. Polysaccharidets koncentration i opløsningen er fortrinsvis 0,1 til 20 vægt/vægt %, især ca. 1 til 10 vægt/vægt %. Den enzymatisk aktive substans sættes så til den resulterende vandige opløsning af polysaccharidet til opnåelse af en blanding. Det foretrækkes at fremstille blandingen ved at opløse eller suspendere den enzymatisk aktive substans i vand, en fysiologisk saltvandsopløsning eller en passende pufferopløsning (pH 1 til 13, fortrinsvis 5 til 9) og blande den resulterende opløsning eller suspension med den vandige opløsning af polysaccharidet. Mængden af den enzymatisk aktive substans, der skal anvendes, afhænger af den specielle substans, der vælges, det specielle substrat, der skal behandles o.l., men generelt kan det ønskede resultat opnås ved at anvende substansen i en mængde på 0,001 til 50 g pr. 1 g polysaccharid.

Dernæst får polysaccharidet i den ovenfor opnåede blanding lov til at danne en gel, således at den enzymatisk aktive substans indespærres i den resulterende gelmatrix af polysaccharidet. Denne geldannelse kan let gennemføres ved at afkøle blandingen af polysaccharidet og den enzymatisk aktive substans. Fx. danner polysaccharidet gel, når blandingen får lov til at henstå ved ca. 0 til 10°C i ca. 30 minutter til 4 timer, og den enzymatisk aktive substans indespærres samtidig i den resulterende gelmatrix af polysaccharidet. Den således opnåede gel kan udformes i en passende form.

Iøvrigt kan geldannelsen også gennemføres ved, at man bringer blandingen af polysaccharidet og den enzymatisk aktive substans i kontakt med en metalion med et atomvægt på mindst 24, såsom en kaliumion, magnesiumion, calciumion, aluminiumion o.l., ved at man bringer blandingen i kontakt med en forbindelse med to eller flere basisk funktionelle grupper i molekylet, såsom methyldiamin, ethyldiamin, p-phenylen-diamin o.l., eller ved at man bringer blandingen i kontakt med et vandblandbart organisk opløsningsmiddel, såsom acetone, methanol, ethanol, propanol, dioxan, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid o.l.

Den således opnåede immobiliserede, enzymatisk aktiv substans iføl-

ge opfindelsen kan anvendes ved forskellige enzymatiske reaktioner med substrater på samme måde som konventionelle immobiliserede præparater. Det immobiliserede præparat ifølge opfindelsen udviser et forøget højt niveau af enzymatisk aktivitet i sammenligning med konventionelle immobiliserede præparater, da den enzymatisk aktive substans næsten ikke siver ud fra gelmatrixen af polysaccharidet, når den anvendes ved en enzymatisk reaktion. Yderligere kan den immobiliserede, enzymatisk aktive substans ifølge opfindelsen vedblivende anvendes over et langt tidsrum i en enzymatisk reaktion, da den overgår konventionelle immobiliserede præparater med hensyn til formbestandighed, styrke, elasticitet o.l. Især kan den immobiliserede, enzymatisk aktive substans ifølge opfindelsen, endda i fravær af et gelformbevaringsmiddel såsom kaliumion, opfylde sin normale funktion uden at gelstrukturen går i stykker, da dens gel-sol transformationstemperatur bliver ekstremt høj. Ydermere kan den immobiliserede, enzymatisk aktive substans ifølge opfindelsen anvendes selv under sådanne betingelser, hvor det er nødvendigt at gennemføre en enzymatisk reaktion i nærværelse af et organisk opløsningsmiddel såsom ethanol eller acetone, som denaturerer den enzymatisk aktive substans, da stabiliteten af det immobiliserede præparat over for det organiske opløsningsmiddel er høj. Desuden har den immobiliserede, enzymatisk aktive substans ifølge opfindelsen en høj stabilitet over for et proteindenaturerende middel såsom urinstof, guanidinhydrochlorid eller lignende. Desuden kan en enzymatisk reaktion gennemføres ved forhøjet temperatur, da den immobiliserede, enzymatisk aktive substans ifølge opfindelsen selv ved forhøjet temperatur har en enzymatisk aktivitet af høj stabilitet, og derved kan produktiviteten af det ønskede produkt per timeenhed forøges.

Opfindelsen belyses nærmere ved de efterfølgende eksempler og forsøg.

30

Eksempel 1

(1) Fremstilling af carragenan, hvortil der er bundet aminogrupeer
"GENU® GEL WG" (carragenan fremstillet af København Pektinfabrik A/S) (5,0 g) suspenderedes i 1 N kaliumhydroxid (50 ml). Epichlorhydrin (185 mg) sættes til den resulterende suspension, og blandingen rystedes ved 60°C i 30 minutter. Efter afkøling af reaktionsblandingen til 5°C sættes afkølet (5°C) ethanol (50 ml) til blandingen. Det resulterende

35

bundfald frafiltreredes og vaskedes med afkølet (5°C) ethanol (20 ml x 3) til opnåelse af en epoxyaktiveret carragenan. Den epoxyaktiverede carragenan suspenderedes i 0,9 M ammoniumhydroxid (40 ml), og suspensionen rystedes ved 60°C i 2 timer. Ethanol (50 ml) sættes til reaktionsblanding, og det resulterende bundfald frafiltreredes. Bundfaldet vaskedes med ethanol indeholdende 0,1 N natriumhydroxid (20 ml x 2) og ethanol (flere gange) til opnåelse af carragenan, hvortil der er bundet aminogrupeer (4,3 g, tør vægt).

10 (2) Fremstilling af immobiliseret Brevibacterium flavum cellepræparat
Brevibacterium flavum ATCC 14067 podedes i et medium (pH 7,0, 500 ml) indeholdende majsstøbevæske (2,0 %), malonsyre (2,0 %), diammoniumcitrat (0,5%), monokaliumphosphat (0,2 %) og magnesiumsulfatheptahydrat (0,05 %) og inkuberedes under rystning ved 30°C i 48 timer. Dernæst opsamledes de mikrobielle celler ved centrifugering. Cellerne (8,0 g, våd vægt) suspenderedes i en fysiologisk saltvandsopløsning (8 ml), og suspensionen tilsattes 5% vandig opløsning af den ovenfor i (1) (34 ml) opnåede carragenan, som forinden var opvarmet til 50°C . Blandingen omrøres grundigt og henstilledes ved 4°C i 30 minutter. Den således opnåede gel udformedes som terninger med en kantlængde på 3 mm. Terningerne dypedes i 1 M vandig natriumfumaratopløsning (120 ml) indeholdende 0,6 % galdepulver og henstilledes ved 37°C i 24 timer. Terningerne vaskedes med 2% vandig kaliumchloridopløsning til opnåelse af et immobiliseret Brevibacterium flavum cellepræparat med fumaraseaktivitet (50,0 g, våd vægt).

1 M vandig natriumfumaratopløsning (pH 7,0, 40 ml) sættes til det ovenfor opnåede immobiliserede Brevibacterium flavum cellepræparat (6,35 g) og fik lov til at reagere ved 37°C under rystning. 15 og 30 minutter efter påbegyndelse af reaktionen opsamledes en 1 ml prøve af reaktionsblanding. Saltsyre sættes til prøven for at udfælde uomsat fumarisyre, og L-malonsyre-indholdet i den resulterende supernatant bestemtes kolorimetrisk ved at omsætte den med 2,7-naphthalendiol. Når fumaraseaktiviteten beregnedes på basis af en forøgelse i mængden af L-æblesyre i reaktionsblandingen i løbet af et tidsrum på 15 minutter, var den 1140 μ mol/h/ml gel. Dette svarede til 63% af den enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

Eksempel 21) Fremstilling af carragenan, hvortil der er bundet monoethylamino-
grupper

5 Ved at følge samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 1 (1) opnåedes den ønskede carragenan, hvortil der er bundet monoethylaminogrupper (4,0 g, tør vægt) ved anvendelse af "GENU® GEL WG" (5,0 g), epichlorhydrin (247,5 mg) og monoethylamin (1,62 g).

10 (2) Fremstilling af immobiliseret Brevibacterium flavum cellepræparat
Den samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 1 (2) blev gentaget, med undtagelse af, at 5% vandig opløsning af den ovenfor opnåede carragenan, hvortil der er bundet monoethylaminogrupper, (34 ml) anvendes i stedet for 5% vandig opløsning carragenan, hvortil der er bundet
15 aminogrupper, (34 ml) til opnåelse af et immobiliseret Brevibacterium flavum cellepræparat med fumaraseaktivitet (50,2 g, våd vægt). Dets fumaraseaktivitet var 909 μ mol/h/ml gel, og dette svarede til 50% af den enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

20 Eksempel 3(1) Fremstilling af carragenan, hvortil der er bundet diethyl-
aminogrupper

25 Ved at følge samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 1 (1) opnåedes den ønskede carragenan, hvortil der er bundet diethylaminogrupper, (4,4 g, tør vægt) ved at anvende "GENU® GEL WG" (5,0 g), epichlorhydrin (247,5 mg) og diethylamin (2,63 g).

30 (2) Fremstilling af immobiliseret Brevibacterium flavum cellepræparat
Samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 1 (2) blev gentaget med undtagelse af, at 5% vandig opløsning af den ovenfor opnåede carragenan, hvortil der er bundet diethylaminogrupper, (34 ml) anvendtes i stedet for 5% vandig opløsning af carragenan, hvortil der er bundet aminogrupper, (34 ml) til opnåelse af et immobiliseret Brevibacterium flavum
35 cellepræparat med fumaraseaktivitet (50,3 g, våd vægt). Fumaraseaktiviteten var 956 μ mol/h/ml gel, og dette svarede til 53% af den enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

Eksempel 4(1) Fremstilling af immobiliseret Brevibacterium ammoniagenes
cellepræparat

5 Brevibacterium ammoniagenes IAM 1645 podedes i et medium (pH 7,0, 500 ml) indeholdende glukose (2,0 %), fumarsyre (0,5 %), urinstof (0,2 %), monokaliumphosphat (0,2 %), magnesiumsulfatheptahydrat (0,05 %) og majsstøbevæske (1,0 %) og inkuberedes under rystning ved 30⁰C i 48 ti-
10 mer. Dernæst opsamledes de mikrobielle celler ved centrifugering. Cel-
lerne (8,0 g, våd vægt) suspenderedes i en fysiologisk saltvandsopløs-
ning (8 ml), og til suspensionen sattes 5% vandig opløsning (34 ml) af
den i eksempel 2 (1) opnåede carragenan, hvortil der er bundet mono-
ethylaminogrupeer, hvilken forinden var opvarmet til 50⁰C. Blandingen
omrørtes grundigt og henstilledes ved 4⁰C i 30 minutter. Den således op-
15 nåede gel udformedes som terninger med en kantlængde på 3 mm. Terninger-
ne vaskedes med 2% vandig kaliumchloridopløsning til opnåelse af et im-
mobiliseret Brevibacterium ammoniagenes cellepræparat med fumaraseakti-
vitet (50,0 g, våd vægt). L-æblesyreproduktiviteten af det immobilise-
rede præparat var 525 μ mol/h/ml gel, og dette svarede til 60% af den
20 enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

Forsøg 1

De efterfølgende tests A til E gennemførtes under anvendelse af det
i eksempel 1 (2) opnåede immobiliserede Brevibacterium flavum cellepræ-
25 parat (herefter kaldet præparat A), det i eksempel 2 (2) opnåede immobi-
liserede Brevibacterium flavum cellepræparat (herefter kaldet præparat
B), det i eksempel 3 (2) opnåede immobiliserede Brevibacterium flavum
cellepræparat (herefter kaldet præparat C) og, som kontrol, et immobili-
seret Brevibacterium flavum cellepræparat opnået ved anvendelse af en
30 carragenan uden indføring af en aminogruppe eller substitueret amino-
gruppe (herefter kaldet præparat D).

Det som kontrol anvendte præparat D fremstilledes som følger:

De mikrobielle celler, der var opnået på samme måde som beskrevet i
eksempel 1 (2) (8,0 g, våd vægt) suspenderedes i en fysiologisk salt-
35 vandopløsning (8 ml), og til suspensionen sattes 5% vandig opløsning af
"GENU® GEL WG" (34 ml), der forinden var opvarmet til 50⁰C. Blandingen
omrørtes grundigt og henstilledes ved 4⁰C i 30 minutter. Den således op-
nåede gel udformedes som terninger med en kantlængde på 3 mm. Terninger-

ne dyppedes i 1 M vandig natriumfumaratopløsning (120 ml) indeholdende 0,6 % galdepulver og henstilledes ved 37°C i 24 timer. Terningerne vaskedes med 2% vandig kaliumchloridopløsning til opnåelse af præparat D (50,0 g, våd vægt). Når fumaraseaktiviteten af præparat D bestemtes på samme måde som beskrevet i eksempel 1 (2), var den 900 μ mol/h/ml gel, og dette svarede til 49% af den enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

Test A

10 Stabilitet ved kontinuert enzymatisk reaktion

Præparater A til D underkastedes en kontinuert enzymatisk reaktion ved at pakke hver enkelt præparat (6,3 g) i en søjle (1,6 cm x 12 cm) med kappe og kontinuert lede 1 M vandig natriumfumaratopløsning (pH 7,0) gennem søjlen ved 37°C med en strømningshastighed på 6 ml/h i nogle 15 døgn. Eluatet opsamledes lejlighedsvis, og præparatets fumaraseaktivitet bestemtes i.h.t. den ovenfor nævnte fremgangsmåde. Ydermere beregnedes det antal dage, der var nødvendigt for at reducere præparatets enzymatiske aktivitet til 50% af dets begyndelsesaktivitet (halveringstid) i.h.t. følgende formel:

20

$$K_d = \frac{2,303}{t} \log \frac{n_0}{n} \qquad t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,693}{K_d}$$

25 hvori K_d er forringelseshastighedskonstanten (dag^{-1}), t er reaktionstiden (dage), n_0 er den indledende enzymatiske aktivitet, n er den enzymatiske aktivitet efter t dage, og $t_{\frac{1}{2}}$ er halveringstiden (dage).

Resultaterne er vist i tabel I.

30

35

Tabel I

Præparater	Den foreliggende opfindelse			Kontrol		
	A	B	C	D		
5	<hr/>					
Gruppe bundet til carragenan	amino	monoethyl-amino	diethyl-amino	ingen		
	<hr/>					
	1	1140	909	956	900	
10	9	1095	899	928	873	
	15	1095	895	908	844	
Fumarase-aktivitet (μ mol/h/ml gel)	Kon-	21	1050	887	898	820
	tinuert	30	1015	850	870	791
	drifts-	42	969	828	833	745
	periode	50	946	801	800	723
15	(dage)	64	901	780	771	674
		80	855	760	735	620
		100	798	712	692	584
<hr/>						
20	Halveringstid af fumaraseaktivitet (dage)	194	241	216	160	
<hr/>						

Test B25 Varmestabilitet

Præparater A til D (2,0 g af hvert) dyppedes hver især i 0,1 M kaliumphosphatpufferopløsning (pH 7,0, 2 ml) og opvarmedes til 60°C i 15 timer. Efter opvarmning bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes i.h.t. følgende

30 formel:

$$\begin{array}{l}
 \text{Grad af} \\
 \text{resterende} \\
 \text{fumarase-} \\
 \text{35 aktivitet}
 \end{array}
 (\%) = \frac{\text{Fumaraseaktivitet efter opvarmning}}{\text{fumaraseaktivitet før opvarmning}} \times 100$$

Resultaterne er vist i tabel II.

Tabel II

Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
5		
	A amino	30
Den foreliggende opfindelse	B monoethylamino	47
	C diethylamino	26
10	D ingen	12
Kontrol		

Test CStabilitet i opløsning med pH 4,5

15 Præparaterne A til D (2,0 g af hvert) dyppedes hver især i 0,5 M acetatpufferopløsning (pH 4,5, 5 ml) og henstilledes ved 37°C i 1 time. Efter behandling med pufferopløsningen bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes i.h.t. følgende formel:

20

$$\begin{array}{l}
 \text{Grad af resterende} \\
 \text{fumarase} \\
 \text{aktivitet}
 \end{array}
 (\%) = \frac{\text{Fumaraseaktivitet} \\
 \text{efter behandling} \\
 \text{med pufferopløsning}}{\text{fumaraseaktivitet} \\
 \text{før behandling med} \\
 \text{pufferopløsning}} \times 100$$

25

Resultaterne er vist i tabel III.

30

35

Tabel III

Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
5		
	A amino	100
Den foreliggende opfindelse	B monoethylamino	93
	C diethylamino	83
10 Kontrol	D ingen	3

Test DStabilitet i ethanolholdig opløsning

15 Præparaterne A til D (2,0 g af hvert) dyppedes hver især i 2% vandig kaliumchloridopløsning (2,0 ml) indeholdende ethanol (0,46 g) og henstilledes ved 37⁰C i 30 minutter. Efter behandling med den ethanolholdige opløsning bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes i.h.t. følgende for-

20 mel:

$$\begin{array}{l}
 \text{Grad af resterende} \\
 \text{fumarase} \\
 \text{25 aktivitet}
 \end{array}
 (\%) = \frac{\text{Fumaraseaktivitet} \\
 \text{efter behandling med} \\
 \text{ethanolholdig opløsning}}{\text{fumaraseaktivitet} \\
 \text{før behandling med} \\
 \text{ethanolholdig opløsning}} \times 100$$

Resultaterne er vist i tabel IV.

30

35

Tabel IV

Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
5		
	A amino	88
Den foreliggende opfindelse	B monoethylamino	83
	C diethylamino	85
10 Kontrol	D ingen	73

Test EStabilitet i urinstofholdig opløsning

- 15 Præparaterne A til D (2,0 g af hvert) dyppedes hver især i 2% vandig kaliumchloridopløsning (2,0 ml) indeholdende urinstof (0,36 g) og henstilledes ved 37°C i 30 minutter. Efter behandling med den urinstofholdige opløsning bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes
- 20 i.h.t. følgende formel:

$$\begin{array}{l}
 \text{Grad af resterende} \\
 \text{fumarase} \\
 \text{aktivitet}
 \end{array}
 (\%) =
 \frac{\text{Fumaraseaktivitet} \\
 \text{efter behandling med} \\
 \text{urinstofholdig opløsning}}{\text{fumaraseaktivitet} \\
 \text{før behandling med} \\
 \text{urinstofholdig opløsning}}
 \times 100$$

25

Resultaterne er vist i tabel V.

30

35

Tabel V

Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
5	A amino	70
Den foreliggende opfindelse	B monoethylamino	93
	C diethylamino	65
10 Kontrol	D ingen	56

Forsøg 2

De følgende tests F til I gennemførtes under anvendelse af det i eksempel 4 (1) opnåede, immobiliserede *Brevibacterium ammoniagenes* cellepræparat (herefter kaldet præparat E) og som kontrol et immobiliseret *Brevibacterium ammoniagenes* cellepræparat opnået under anvendelse af carragenan uden indføring af en aminogruppe eller substitueret aminogruppe (herefter kaldet præparat F).

20 Det som kontrol anvendte præparat F fremstilledes som følger:

De mikrobielle celler, der blev opnået på samme måde som beskrevet i eksempel 4 (1), (8,0 g våd vægt) suspenderedes i en fysiologisk saltvandsopløsning (8 ml) og oparbejdedes på samme måde som præparat D i forsøg 1 til opnåelse af præparat F (49,7 g, våd vægt). L-æblesyreproduktiviteten af præparat F var 509 μ mol/h/ml gel, og dette svarede til 25 58% af den enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

Test FStabilitet ved kontinuert enzymatisk reaktion

30 På samme måde som beskrevet i forsøg 1, Test A, underkastedes hvert af præparaterne E og F (6,3 g af hvert) en kontinuert enzymatisk reaktion. Fumaraseaktivitet og halveringstid af hvert præparat bestemtes som i forsøg 1, Test A.

Resultaterne er vist i tabel VI.

Tabel VI

Præparater	Opfindelsen		Kontrol
	E		F
5			
Gruppe bundet til carragenan	Monoethylamino		Ingen
10	1	525	509
	9	499	477
	15	478	441
Fumarase- aktivitet	Kontinuert drifts- periode	21	458
		30	437
15 (μ mol/h/ ml gel)	(dage)	42	410
		50	401
		64	366
		80	341
		100	303
20	Halveringstid for fumaraseaktivitet (dage)		127
			75

25 Test GStabilitet i opløsning med pH 4,5

Præparaterne E og F (2,0 g af hvert) dyppedes hver især i 0,5 M acetatpufferopløsning (pH 4,5, 5 ml) og henstilledes ved 37⁰C i 1 time. Efter behandling med pufferopløsningen bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes i.h.t. samme formel som i forsøg 1, Test C. Resultaterne er vist i tabel VII.

Tabel VII

Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
5 Den foreliggende opfindelse	E monoethylamino	47
10 Kontrol	F ingen	12

Test HStabilitet i ethanolholdig opløsning

15 Præparaterne E og F (2,0 g af hvert) dyppedes hver især i 2% vandig kaliumchloridopløsning (2,0 ml) indeholdende ethanol (0,46 g) og henstilledes ved 37⁰C i 30 minutter. Efter behandling med den ethanolholdige opløsning bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes i.h.t. samme formel som i forsøg 1, Test D. Resultaterne er vist i tabel VIII.

20

Tabel VIII

Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
25 Den foreliggende opfindelse	E monoethylamino	28
30 Kontrol	F ingen	3

Test IStabilitet i urinstofholdig opløsning

35 Præparaterne E og F (2,0 g af hvert) dyppedes i 2% vandig kaliumchloridopløsning (2,0 ml) indeholdende urinstof (0,36 g) og henstilledes ved 37⁰C i 30 minutter. Efter behandling med den urinstofholdige opløsning bestemtes fumaraseaktiviteten af hvert præparat, og graden af resterende fumaraseaktivitet beregnedes i.h.t. samme formel som i

forsøg 1, Test E. Resultaterne er vist i tabel IX.

Tabel IX

5	Præparater	Gruppe bundet til carragenan	Grad af resterende fumaraseaktivitet (%)
	Den foreliggende opfindelse	E monoethylamino	81
10	Kontrol	F ingen	13

Forsøg 3

15 De følgende tests A til C udførtes under anvendelse af det i eksempel 1 (2) opnåede immobiliserede *Brevibacterium flavum* cellepræparat (gelbasis: carragenan, hvortil der er bundet aminogru-
 20 pper, i det følgende kaldet præparat A), det i eksempel 2 (2) opnåede immobiliserede *Brevibacterium flavum* cellepræparat (gelbasis: carragenan, hvortil der er bundet monoethylaminogru-
 25 pper, i det følgende kaldet præparat B), det i eksempel 3 (2) opnåede immobiliserede *Brevibacterium flavum* cellepræparat (gelbasis: carragenan, hvortil der er bundet diethylaminogru-
 per, i det følgende kaldet præparat C), og som kontrol de ved fremgangsmåden beskrevet i US patentskrift nr. 4.138.292 opnåede immobiliserede *Brevi-
 bacterium flavum* cellepræparater (gelbasis: carragenan uden indføring af aminogruppe eller substitueret aminogruppe, i det følgende kaldet præpa-
 rat G, H, I og J).

De som kontrol anvendte præparater G til J fremstilledes som følger:

30 De mikrobielle celler, der var opnået på samme måde som beskrevet i eksempel 1 (2) (8,0 g, våd vægt), suspenderedes i en fysiologisk saltvandsopløsning (8 ml), og til suspensionen sattes 5% vandig opløsning af "GENU® GEL WG" (34 ml), der forinden var opvarmet til 50°C. Blandingen omrørtes godt og sattes dråbevis til en vandig 0,3 M ammoniumchloridop-
 35 løsnings (præparat G), ethylendiaminopløsning (præparat H), N-ethyl-ethylendiaminopløsning (præparat I) eller N,N-diethyl-ethylendiaminopløsning (præparat J). De resulterende gelpartikler (ca. 3 mm i diameter) opsamledes ved filtrering. Perlerne dyppedes i 1 M vandig natriumfumaratop-

løsning (120 ml) indeholdende 0,6% gallepulver og henstilledes ved 37°C i 24 timer. Perlerne vaskedes med 2% vandig kaliumchloridopløsning til opnåelse af de respektive præparater G til J (50 g, våd vægt). Når fuma-
5 raseaktiviteten af præparat G til J bestemtes på samme måde som beskrevet i eksempel 1 (2), var den hhv. 803 (G), 760 (H), 765 (I) og 755 (J) $\mu\text{mol/h/ml}$ gel, og dette svarede til hhv. 47% (G), 41% (H), 42% (I) og 42% (J) af den enzymatiske aktivitet af de anvendte mikrobielle celler.

Test A

10 Stabilitet ved kontinuert enzymatisk reaktion

Præparaterne A til C og G til J underkastedes en kontinuert enzymatisk reaktion som beskrevet under Forsøg 1, Test A.

Resultaterne fremgår af den efterfølgende tabel (X).

15 Test B

Varmestabilitet

Præparat A til C og G til J underkastedes en test for varmostabilitet som beskrevet under Forsøg 1, Test B.

Resultaterne fremgår af tabel (XI).

20

Test C

Stabilitet i opløsning med pH 4,5

Præparaterne A til C og G til J underkastede en test for stabilitet i opløsning med pH 4,5 som beskrevet under Forsøg 1, Test C.

25 Resultaterne fremgår af tabel (XII).

Tabel XI

Varmestabilitet

Præparater		Gruppe bundet til carragenan	Geldannelses- midler	Grad af reste- rende fumarase- aktivitet (%)
5	Den foreliggende opfindelse	A amino	---	30
		B monoethyl- amino	---	47
		C diethylamino	---	26
10		G ---	$\text{NH}_4^+(\text{NH}_4\text{Cl})$	13
		H ---	ethylendiamin	10
	Kontrol	I ---	N-ethylethylen- diamin	12
		J ---	N,N-diethyl- ethylendiamin	10

Tabel XII

Stabilitet i opløsning med pH 4,5

Præparater		Gruppe bundet til carragenan	Geldannelses- midler	Grad af reste- rende fumarase- aktivitet (%)
20	Den foreliggende opfindelse	A amino	---	100
		B monoethyl- amino	---	93
		C diethylamino	---	83
25		G ---	$\text{NH}_4^+(\text{NH}_4\text{Cl})$	8
		H ---	ethylendiamin	4
	Kontrol	I ---	N-ethylethylen- diamin	3
		J ---	N,N-diethyl- ethylendiamin	4

Som det fremgår af resultaterne af ovenstående forsøg er præparaterne A til C ifølge opfindelsen 1,34 til 2,15 gange bedre end præparaterne G til J opnået ved fremgangsmåden beskrevet i US patentskrift nr. 4.138.292 hvad stabiliteten ved kontinuert enzymatisk reaktion angår, 5 2,3 til 4,7 gange bedre hvad varmostabiliteten angår, og 10,3 til 33,3 gange bedre hvad stabiliteten i opløsning med pH 4,5 angår. Endvidere har præparaterne A til C højere begyndelsesaktivitet (909 til 1140 $\mu\text{mol/h/ml}$ gel) end præparaterne G til J (755 til 803 $\mu\text{mol/h/ml}$ gel).

PATENTKRAV

1. Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans, hvor en enzymatisk aktiv substans er indespærret i en gelmatrix af et polysaccharid med
5 mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet, KENDETEGNET ved, at der covalent er bundet eventuelt substituerede aminogru- per til polysaccharidet.

2. Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans ifølge krav 1, KENDE-
10 TEGNET ved, at indholdet af eventuelt substituerede aminogru- per i polysaccharidet er således, at mængden af nitrogen per 1 g (tør vægt) polysaccharid er 0,1 til 20 mg.

3. Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans ifølge krav 1, KENDE-
15 TEGNET ved, at den til polysaccharidet bundne, eventuelt substituerede aminogrupe er amino, monoalkylamino eller dialkylamino, hvor hver alkyldel indeholder 1 til 12 carbonatomer.

4. Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans ifølge krav 1, KENDE-
20 TEGNET ved, at polysaccharidet er carragenan, hvortil der er bundet en amino-, monoalkylamino- eller dialkylaminogrupe, hvor hver alkyldel har 1 til 12 carbonatomer.

5. Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans ifølge krav 1, 2, 3 el-
25 ler 4, KENDETEGNET ved, at den enzymatisk aktive substans er mikrobielle celler.

6. Immobiliseret, enzymatisk aktiv substans ifølge krav 5, KENDE-
TEGNET ved, at polysaccharidet er carragenan, hvortil der er bundet en
30 aminogrupe, en monoethylaminogrupe eller en diethylaminogrupe.

7. Fremgangsmåde til fremstilling af en immobiliseret, enzymatisk aktiv substans ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man sammenblender en enzymatisk aktiv substans og en vandig opløsning af et polysaccharid,
35 hvortil der er bundet en eventuelt substitueret aminogrupe, og med mindst 10 vægt/vægt % sulfatrest i molekylet og derefter lader polysaccharidet danne gel i blandingen, således at den enzymatisk aktive substans indespærres i den resulterende gelmatrix.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, at den vandige opløsning af polysaccharidet fremstilles ved, at man sætter polysaccharidet til varmt vand ved 30 til 90°C til opnåelse af en opløsning indeholdende 0,1 til 20 vægt/vægt % af polysaccharidet.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, at man opløser eller suspenderer den enzymatisk aktive substans i vand, en fysiologisk saltvandsopløsning eller pufferopløsning og så blander den med den vandige opløsning af polysaccharidet.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, at geldannelsen gennemføres ved, at man lader blandingen af den enzymatisk aktive substans og polysaccharidet henstå ved ca. 0 til 10°C i ca. 30 minutter til 4 timer.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, at den til polysaccharidet bundne, eventuelt substituerede aminogruppe er amino, monoalkylamino eller dialkylamino, hvor hver alkyldele indeholder 1 til 12 carbonatomer.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, at polysaccharidet er carragenan, hvortil der er bundet en amino-, monoalkylamino- eller dialkylaminogruppe, hvor hver alkyldele indeholder 1 til 12 carbonatomer.

13. Fremgangsmåde ifølge krav 7, 8, 9, 10, 11 eller 12, KENDETEGNET ved, at den enzymatisk aktive substans er mikrobielle celler.

30

35