

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 11/14

C12N 9/96

C12N 9/26 C12N 9/34

C12N 9/30

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94116866.2

[45] 授权公告日 2001 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1061090C

[22] 申请日 1994.9.1 [24] 颁证日 2000.10.21

[21] 申请号 94116866.2

[30] 优先权

[32] 1993.9.1 [33] US [31] 114,143

[73] 专利权人 詹伦卡国际印第安那州有限公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 O·J·兰特罗 J·W·布鲁瓦

S·M·沙巴

[56] 参考文献

EP - A - 0216272 1987. 1. 1 _

审查员 孙广秀

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 制备固定化酶共轭体的方法及由此制备的固定化酶共轭体

[57] 摘要

一种制备固定化酶共轭体的方法,其中用多官能胺活性物质处理酶,以在固定于固体支持物前形成处理过的含酶加合物,所述固体支持物已与多胺化合物溶液接触过。对于使用葡糖淀粉酶、真菌 α -淀粉酶和 β -淀粉酶,该方法是特别优选的。用该方法形成的固定化酶共轭体包括处理过的含酶加合物。本文公开的固定化酶共轭体比其它方法得到并提供的更稳定,而且固定于其中的酶被束缚得更紧。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种制备固定化酶共轭体的方法，包括下列步骤：
 - (a) 将多孔硅藻土颗粒与含有至少一个侧链胺基的多胺化合物溶液接触，形成载体；
 - (b) 将酶与至少一种胺活性物质溶液接触，所述胺活性物质选自：多官能醛、多官能有机卤化物、多官能酐、多官能偶氮化合物、多官能异硫氰酸盐（酯）、多官能异氰酸盐（酯）及两种或多种这些胺活性物质的混合物，由此形成处理过的含酶加合物；和
 - (c) 将载体和处理过的加合物接触，以使载体和处理过的加合物反应形成固定化酶共轭体。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中胺活性物质是戊二醛。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中多胺化合物是聚乙烯亚胺。
4. 根据权利要求 1 的方法，其中所述酶含有能与胺活性物质反应的氨基。
5. 根据权利要求 1 的方法，其中胺活性物质与酶的比率为每 ml 酶约 0.10g 到约 1.50g 胺活性物质。
6. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在包括搅拌的条件下完成。
7. 根据权利要求 1 的方法，步骤(c)后还包括用水洗涤固定化酶共轭体。
8. 根据权利要求 1 的方法，其中，处理过的加合物与载体之间的比率为每克载体约 0.05ml 到约 0.6ml 处理过的加合物。
9. 根据权利要求 1—8 的方法，其中所述酶是葡糖淀粉酶。
10. 根据权利要求 1—8 的方法，其中所述酶是真菌 α -淀粉酶。
11. 根据权利要求 1—8 的方法，其中所述酶是 β -淀粉酶。
12. 一种固定化酶共轭体，含有载体和处理过的加合物，载体包

括具有至少一个侧链胺基的多胺化合物及与多胺化合物结合的固体支持物，由此形成载体，处理过的加合物包括至少一种选自下列的胺活性物质：多官能醛、多官能有机卤化物、多官能酐、多官能偶氮化合物、多官能异硫氰酸盐（酯）、多官能异氰酸盐（酯）及两种或多种这些胺活性物质的混合物，处理过的加合物还包括至少一种与至少一种胺活性物质接触的酶，从而处理了酶并形成处理过的含酶加合物，并且载体与处理过的含酶加合物结合，从而形成稳定、有活性的固定化酶共轭体。

13. 根据权利要求 12 的固定化酶共轭体，其中胺活性物质是戊二醛。

14. 根据权利要求 12 的固定化酶共轭体，其中多胺化合物是聚乙烯亚胺。

15. 根据权利要求 12 的固定化酶共轭体，其中所述酶含有能与胺活性物质反应的氨基。

16. 根据权利要求 12 的固定化酶共轭体，其中胺活性物质与酶之间的比率为每 ml 酶约 0.10g 到约 1.50g 胺活性物质。

17. 根据权利要求 12 的固定化酶共轭体，其中处理过的含酶加合物与载体之间的比率为每克载体约 0.05ml 到约 0.6ml 处理过的加合物。

18. 根据权利要求 12-17 的固定化酶共轭体，其中所述酶是葡糖淀粉酶。

19. 根据权利要求 12-17 的固定化酶共轭体，其中所述酶是真菌 α -淀粉酶。

20. 根据权利要求 12-17 的固定化酶共轭体，其中所述酶是 β -淀粉酶。

21. 一种固定化酶共轭体，含有固体载体和处理过的加合物，处理过的加合物包括至少一种选自下列的胺活性物质：多官能醛、多官能有机卤化物、多官能酐、多官能偶氮化合物、多官能异硫氰酸盐（酯）、

多官能异氰酸盐（酯）及两种或多种这些胺活性物质的混合物，处理过的加合物还包括至少一种与至少一种胺活性物质接触的酶，由此处理了所述酶并形成处理过的含酶加合物，并且载体与处理过的含酶加合物结合，形成稳定、有活性的固定化酶共轭体。

22. 一种用于制备固定化酶共轭体的处理过的液体加合物，其中处理过的加合物包括至少一种选自下列的胺活性物质：多官能醛、多官能有机卤化物、多官能酐、多官能偶氮化合物、多官能异硫氰酸盐（酯）、多官能异氰酸盐（酯）及两种或多种这些胺活性物质的混合物，并且其中处理过的加合物还包括至少一种与至少一种胺活性物质接触的酶，由此处理了酶并形成处理过的含酶加合物。

制备固定化酶共轭体的方法 及由此制备的固定化酶共轭体

本发明涉及制备固定化酶共轭体的方法及用该方法制备的稳定的固定化酶共轭体。

酶一般是水溶性的，因此，若未将其固定在支持物上(游离的酶)就用于反应介质，则很难将其从中回收以便再使用。由于必须经常更换，因此造成与使用所述酶有关的成本的提高。此外，尽管可在间歇法中有效地使用游离(未固定的)酶，但不适用于连续的工业化方法。

为了降低酶更换造成的高成本，已设计了各种使用前固定酶的方法。所述固定使得可以很方便地从反应介质中回收酶，以便连续地再使用。根据生物催化反应底物的性质，可以在各种反应器系统，如填充柱和搅拌式反应罐中使用这些固定化酶。

用于固定酶的方法包括使用由无机或有机物质制成的固体支持物形式的载体。所述物质包括：如， γ -矾土，二氧化钛，活性碳颗粒，硅藻土颗粒，玻璃珠，多孔玻璃，浮石，硅胶，金属氧化物和氧化铝。可以用化合物或化合物的混合物将酶粘附到所述载体上，特别值得一提的是聚乙烯亚胺和戊二醛。但是，所述方法的缺点是不能将酶紧紧缚于载体上(或与其键合或载留在其中)。因此，酶可以与载体分开(不结合)，在反应介质中成为“游离

的”。实际上，酶和载体间存在的使其结合在一起的力常常很弱，以致被加工的底物存在时，很容易从载体中放出酶，从而丢失在反应介质中。

美国专利No. 4,713, 333 公开了一种方法，其中将酶固定在硅藻土颗粒上。该方法涉及将多孔硅藻土颗粒与聚乙烯亚胺溶液接触。然后，将含聚乙烯亚胺的硅藻土与戊二醛接触。最后，向其中加入酶水溶液，由此将酶固定于其上。尽管它是特别有用的，然而从其稳定性及半衰期看，仍可改善用这种方法形成的固定化酶共轭物。

因此，可以看出，仍有必要提供酶共轭体形式的将酶固定的方法，以便将酶紧缚(或保持)在由此形成的共轭体内，从而使固定化酶不能从共轭体的剩余部分“脱离出来”并丢失于反应介质中。进一步看出，仍有必要提供使酶紧缚于其上和/或其中的(稳定的)固定化酶共轭体，以便在所述共轭体的使用期间，减少酶从反应介质中丢失，从而实现其生产率的明显改善。

本发明的主要目的是提供一种制备固定化酶共轭体的方法，其中将酶紧缚于(稳定的)由此制备的固定化酶共轭体内和/或其上。

本发明的另一主要目的是提供一种制备固定化酶共轭体的方法，以便使由此获得的固定化酶共轭体不失活，并且使由此制备的固定化酶共轭体比用其它方法得到的同类产品具有改善的半衰期。

本发明的另一主要目的是提供固定化酶共轭体，它具有比用其它方法得到的同类产品改善的半衰期，以实现其生产率的显著改善。

本发明的另一主要目的是提供稳定的固定化酶共轭体，即使共轭体的酶紧缚于共轭体之内(或其上)，以减少酶丢失于反应介质中。

按本发明的指导，公开了制备固定化酶共轭体的方法。该方法包括将固体支持物，如多孔硅藻土颗粒与含有至少一个侧链胺基的聚胺化合物溶液接触。用这种方法，可以得到载体。将酶与至少一种胺活性物质溶液接触，从而使酶得到处理。所述胺活性物质选自多官能醛，多官能有机卤化物，多官能酐，多官能偶氮化合物，多官能异硫氰酸盐(酯)，多官能异氰酸盐(酯)和两种或多种这些胺活性物质的混合物。用这种方法，形成处理过的含酶和处理过的加合物相互接触，以使载体与处理过的加合物形成稳定、有活性的固定化酶共轭体(下文有时各称为“固定化共轭体”，“酶共轭体”，“处理过的含酶共轭体”，“处理过的共轭体”和“共轭体”)。在这方面，载体和处理过的加合物反应是优选的，以使处理过的加合物的胺活性物质与多胺载体化合物结合。

优选的是在与处理过的加合物接触前，洗涤载体，以从中除去过量的多胺化合物。

优选的，多胺化合物选自：聚乙二胺，聚乙烯亚胺(如聚二亚乙基三胺，聚三亚乙基四胺，聚五亚乙基六胺或聚六亚甲基二胺)；聚亚甲基环己胺；聚亚甲基二苯胺；聚四亚乙基五胺，聚亚苯基二胺及两种或多种这些多胺化合物的混合物。更优选的多胺化合物选自分子量为500-100,000道尔顿且水溶性的上述化合物。最优选的多胺化合物是聚乙烯亚胺。

优选的，胺活性物质选自多官能醛，多官能有机卤化物，多

官能酐，多官能偶氮化合物，多官能异硫氰酸盐(酯)，多官能异氰酸盐(酯)及两种或多种这些胺活性物质的混合物。更优选的胺活性物质选自戊二醛，琥珀醛，对苯二醛，二重氮基联苯胺-2, 2'-二磺酸，4', 4'-二氟-3, 3'-二硝基二苯基砷，二苯基-4, 4'-二硫氰酸酯-2, 2'-二磺酸，3-甲氧基-二苯基甲烷-4, 4'-二异氰酸酯，甲苯-2-异氰酸酯-4-异硫氰酸酯，甲苯-2, 4-二异硫氰酸酯，重氮基联苯胺，重氮基联苯胺-3, 3'-联茴香胺，N, N'-六亚甲基二碘乙酰胺，1, 6-己二异氰酸酯，氰尿酸氯，1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯及两种或多种这些胺活性物质的混合物。最优选的胺活性物质选自多官能醛。特别优选的胺活性物质选自戊二醛，琥珀醛，对苯二醛。用戊二醛已得到最好的结果。

优选的处理过的含酶加合物与洗涤过的载体间的比率为每克载体约0.05ml到0.6ml处理过的加合物。优选的胺活性物质与酶之间的比率为ml酶约0.10g到约1.50g胺活性物质。

在优选的实施方案中，在包括搅拌的条件下，将酶与胺活性物质溶液接触。

在另一优选的实施方案中，固定化酶共轭体形成后用水洗涤。

本文公开的方法适用于制备任何酶的固定化酶共轭体，所述酶含有能与胺活性物质反应的氨基。也可以固定两种或多种酶。这些酶包括胰蛋白酶，木瓜蛋白酶，己糖激酶，无花果蛋白酶，菠萝蛋白酶，乳酸脱氢酶，乳糖酸，葡萄糖异构酶，葡糖淀粉酶，胰凝乳蛋白酶，链霉蛋白酶，酰基转移酶，蔗糖酶，淀粉酶，支链淀粉酶，转葡萄糖苷酶，葡萄糖氧化酶，胃蛋白酶，蛋白酶，过氧化氢酶，羟化酶，凝乳酶，转移酶及其混合物。这些酶优选地

包括葡萄糖异构酶，葡糖淀粉酶，蔗糖酶， β -淀粉酶，细菌 α -淀粉酶，真菌 α -淀粉酶，转葡萄糖苷酶及其混合物。更优选地这些酶包括葡糖淀粉酶，细菌 α -淀粉酶， β -淀粉酶及其混合物。用由SOLVAY ENZYMES, Inc. (Elkhart, Indiana)以 DIAZYME L-200 商标销售的葡糖淀粉酶已经得到了满意的结果。用由SOLVAY ENZYMES, Inc. (Elkhart, Indiana) 以CLARASE L-40,000 商标销售的真菌 α -淀粉酶已得到了满意的结果。最后，用以 SPEZYME BBA 1500 商标销售的 β -淀粉酶也得到了满意的结果。

根据本发明的指导，公开了制备固定化葡糖淀粉酶共轭体的方法。该方法包括将固体支持物与聚乙烯亚胺溶液接触。用该方法，得到载体。将葡糖淀粉酶与戊二醛溶液接触，由此处理葡糖淀粉酶。用该方法形成处理过的含葡糖淀粉酶的加合物。最后，将载体和处理过的含葡糖淀粉酶的加合物相互接触，使载体和处理过的含葡糖淀粉酶的加合物反应，形成稳定、有活性的固定化葡糖淀粉酶共轭物。

优选的，固体支持物是多孔的。更优选的，固体支持物是多孔硅藻土颗粒。

根据本发明的指导，公开了制备固定化真菌 α -淀粉酶共轭体的方法。该方法包括将固体支持物与聚乙烯亚胺溶液接触。用该方法得到了载体。将真菌 α -淀粉酶与戊二醛溶液接触，由此处理了 α -淀粉酶。用该方法形成了处理过的含 α -淀粉酶的加合物。最后，将载体和处理过的含 α -淀粉酶加合物彼此接触，使载体和处理过的含 α -淀粉酶加合物反应，形成稳定、有活性的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体。

进一步根据本发明的指导，公开了制备固定化 β -淀粉酶共轭体的方法。该方法包括将固体支持物与聚乙烯亚胺溶液接触。用该方法，得到了载体。将 β -淀粉酶与戊二醛溶液接触，从而处理了 β -淀粉酶。用该方法，形成了处理过的含 β -淀粉酶的加合物。最后，将载体和处理过的含 β -淀粉酶的加合物彼此接触，使载体与处理过的 β -淀粉酶加合物反应，形成稳定的、有活性的固定化 β -淀粉酶共轭体。

另一方面，本发明公开了稳定的、有活性的固定化酶共轭体，它具有比用其它方法得到的同类产品改善的半衰期，由此实现了其生产率的显著提高。

根据本发明的指导，公开了固定化酶共轭体。这些固定化酶共轭体包括载体和处理过的加合物。该载体包括具有至少一个侧链胺基的多胺化合物。将固体支持物与多胺化合物结合，形成载体。处理过的加合物包括至少一种胺活性物质。所述胺活性物质选自多官能醛，多官能有机卤化物，多官能酐，多官能偶氮化合物，多官能异硫氰酸盐(酯)，多官能异氰酸盐(酯)及两种或多种这些胺活性物质的混合物。将至少一种酶与(至少一种)胺活性物质结合，由此处理酶并形成处理过的含酶加合物。最后，将载体与包括处理过的酶的处理过的加合物结合，从而形成稳定、有活性的固定化酶共轭体。

优选的，固体支持物是多孔的。特别优选的固体支持物是多孔硅藻土颗粒。

优选的，多胺化合物选自聚乙二胺，聚乙烯亚胺(如，聚二亚乙基三胺，聚三亚乙基四胺，聚五亚乙基六胺或聚六亚乙基二胺)，

聚亚甲基二环己胺，聚亚甲基二苯胺，聚四亚乙基五胺，聚亚苯基二胺及两种或多种这些多胺化合物的混合物。更优选的多胺化合物选自分子量为500-100,000道尔顿及水溶性的化合物。最优选的多胺化合物是聚乙烯亚胺。

优选的，胺活性物质选自多官能醛，多官能有机卤化物，多官能酐，多官能偶氮化合物，多官能异硫氰酸盐(酯)，多官能异氰酸盐(酯)及两种或多种这些胺活性物质的混合物。更优选的胺活性物质选自戊二醛，琥珀醛，对苯二醛，二重氨基联苯胺-2, 2'-二磺酸，4,4'-二氟-3,3'-二硝基二苯基砷，二苯基-4,4'-二硫氰酸酯，2, 2'-二磺酸，3-甲氧二苯基甲烷-4,4'-二异氰酸酯，甲苯-2-异氰酸酯-4-异硫氰酸酯，甲苯-2,4-二异硫氰酸酯，重氨基联苯胺，重氨基联苯胺-3, 3'-联茴香胺，N, N'-六亚甲基二碘乙酰胺，1, 6-己二异氰酸酯，氰尿酸氯，1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯及两种或多种这些胺活性物质的混合物。优选的胺活性物质选自多官能醛。更优选的，胺活性物质选自戊二醛，琥珀醛，对苯二醛。用戊二醛得到了最好的结果。

处理过的含酶加合物与载体间优选的比率为每克载体约0.05ml到约0.6ml处理过的加合物。胺活性物质与酶之间优选的比率为每ml酶0.10g到约1.50g胺活性物质。

本文公开的固定化酶共轭体可以包括含能与胺活性物质反应的氨基的任何酶。

根据本发明的教导，公开了固定化葡萄糖淀粉酶共轭体。该固定化葡萄糖淀粉酶共轭体包括载体和处理过的加合物。载体包括聚乙烯亚胺。将固体支持物与聚乙烯亚胺结合，由此形成载体。

处理过的加合物包括戊二醛。将葡糖淀粉酶与戊二醛结合，从而处理了葡糖淀粉酶，并形成了处理过的加合物。最后，将载体与包括处理过的葡糖淀粉酶的处理过的加合物结合，从而形成稳定、有活性的固定化葡糖淀粉酶共轭体。

根据本发明的教导，公开了固定化真菌 α -淀粉酶共轭体。所述固定化真菌 α -淀粉酶包括载体和处理过的加合物。载体包括聚乙烯亚胺。将固体支持物与聚乙烯亚胺结合，形成载体。处理过的加合物包括戊二醛。将真菌 α -淀粉酶与戊二醛结合，由此处理真菌 α -淀粉酶，并形成处理过的加合物。最后，将载体与处理过的含 α -淀粉酶的加合物结合，从而形成稳定、有活性的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体。

根据本发明的进一步教导，公开了固定化 β -淀粉酶共轭体。所述固定化 β -淀粉酶共轭体包括载体和处理过的加合物。载体包括聚乙烯亚胺。将固体支持物与聚乙烯亚胺结合，形成载体。处理过的加合物包括戊二醛。将 β -淀粉酶与戊二醛结合，从而处理 β -淀粉酶，并形成处理过的加合物。最后，将载体与含 β -淀粉酶的加合物结合，形成稳定、有活性的固定化 β -淀粉酶共轭体。

根据本发明的教导，公开了含有载体和处理过的加合物的固定化酶共轭体。处理过的加合物包括至少一种胺活性物质，它选自多官能醛，多官能有机卤化物，多官能酐，多官能偶氮化合物，多官能异硫氰酸盐(酯)，多官能异氰酸盐(酯)及两种或多种这些胺活性物质的混合物。处理过的加合物还包括至少一种与至少一种胺活性物质结合的酶。用这种方法处理酶，并形成处理过的含

酶加合物。最后，载体与处理过的含酶加合物结合，由此形成稳定有、活性的固定化酶共轭体。

另一方面，本发明公开了用于制备固定化酶共轭体的处理过的加合物。处理过的加合物包括至少一种胺活性物质，它选自多官能醛，多官能有机卤化物，多官能酐，多官能偶氮化合物，多官能异硫氰酸盐(酯)，多官能异氰酸盐(酯)及两种或多种这些胺活性物质的混合物。处理过的加合物还包括至少一种与至少一种胺活性物质结合的酶。用该方法处理酶，并形成处理过的含酶加合物。

通过阅读与说明性实施例相结合的本发明的下列描述，本发明的这些及其它目的和优点将是显而易见的。

本发明的方法适用于制备有活性且稳定的新的固定化酶共轭体，其酶紧缚于其中。

对于本文公开的方法有用的酶包括含有能与胺活性物质反应的氨基的任何酶。在同一共轭体中也可固定两种或多种酶。这些酶包括：胰蛋白酶，木瓜蛋白酶，己糖激酶，无花果蛋白酶，菠萝蛋白酶，乳酸脱氢酶，乳糖酶，葡萄糖异构酶，葡糖淀粉酶，胰凝乳蛋白酶，链霉蛋白酶，酰基转移酶，蔗糖酶，淀粉酶，支链淀粉酶，转葡萄糖苷酶，葡萄糖氧化酶，胃蛋白酶，蛋白酶，过氧化氢酶，羟化酶，凝乳酶，转移酶及其混合物。这些酶优选地包括：葡萄糖异构酶，葡糖淀粉酶，蔗糖酶， β -淀粉酶，细菌 α -淀粉酶，真菌 α -淀粉酶，转葡萄糖苷酶及其混合物。这些酶更优选地包括葡糖淀粉酶，细菌 α -淀粉酶，真菌 α -淀粉酶， β -淀粉酶及其混合物。用由SOLVAY ENZYMES, Inc. (Elkhart, Indiana) 以

DIAZYME L-200 商标销售的葡糖淀粉酶得到了满意的结果。 用由 SOLVAY ENZYMES, Inc. (Elkhart , Indiana) 以 CLARASE L- 40, 000 商标销售的真菌 α - 淀粉酶也已得到满意的结果。 用以 SPEZYME BBA 1500 商标销售的 β - 淀粉酶也获得了很好的结果。

本发明的方法不同于以前公开的方法； 即在将处理过的含酶加合物与载体结合前，包括了使酶与胺活性物质溶液(如 戊二醛) 接触的步骤，以形成(处理过的含酶)处理过的加合物。 尽管不能准确地理解，但应相信，用该方法，在与载体反应(结合) 前处理酶，以便当处理过的加合物与载体随后接触(反应)时，处理过的酶能更紧地结合和/或更紧密地缚(截留)于由此形成的固定化酶共轭体中[通过从中除去固定化共轭体后，反应介质中的酶活性量(数量)测量。 所述的酶活性量等于在使用共轭体时，从酶共轭体丢失了反应介质中的酶活性]。

本文所用的关于使酶与胺活性物质接触以得到由此形成的加合物和化合物、组合物及组成的术语“处理过的”指酶与胺活性物质接触形成加合物的实际过程，以及作为所述接触(或处理)结果的酶、化合物和/或组合物的结构。 因此，如本文所用的“处理过的”酶是已与胺活性物质接触过的酶，按本文描述的，和，作为所述接触的结果，该酶形成有更强“缚束”力，如(仅为说明)涉及酶的强(紧)共价键，和/或涉及和/或截留酶的交键的化合物。

用本发明的方法，能够提供固定化酶共轭体，它具有改善的长期稳定性及提高的总活性。

本发明的固定化酶共轭体包括载体和处理过的含酶加合物。 在这些共轭体中，在处理过的含酶加合物与载体结合前，通过与

加合物的胺活性物质接触(反应)处理酶。相信酶的上述处理导致固定化酶共轭体具有：(1)数量增多的键，包括涉及共轭体和/或其酶的共价键；和/或(2)在处理过的酶和固定化酶共轭体剩余部分之间提高的交联，由此提供使酶紧缚(或截留)于其中的基体(或改善的基体)。

本文公开的优选方法包括：通过使固体支持物与具有至少一个侧链胺基的多胺化合物溶液接触，从处理过的加合物独立地形成载体。对于上述步骤，其中固体支持物是在美国专利4,713,333中充分描述过的多孔硅藻土颗粒，该文献内容引入本文作文参考。

术语“具有至少一个侧链胺基的多胺化合物”，在本文中指具有至少一个胺基的多胺化合物，所述胺基能与胺活性物质有效地反应。适用于本发明的所述多胺化合物的具体实例包括：聚乙二胺，聚乙烯亚胺(如，聚二亚乙基三胺，聚三亚乙基四胺，聚五亚乙基六胺或聚六亚甲基二胺)，聚亚甲基二环己胺，聚亚甲基二苯胺，聚四亚乙基五胺，聚亚苯基二胺及两种或多种这些多胺化合物的混合物。优选的是上述提到的水溶性多胺化合物。尽管认为多胺化合物的分子量是不重要的，但是优选的是分子量为500到100,000道尔顿的上述多胺化合物。最佳为聚乙烯亚胺。

可以将水溶性多胺化合物用于来自其水溶液的硅藻土颗粒，而非水溶性聚合物可使用来自有机溶剂(如甲醇，乙醇，丙醇)中的。

一般对于载体，每克固体支持物(如，多孔硅藻土颗粒)使用至少约10mg多胺化合物。优选的，每克固体支持物使用至少约

15mg多胺化合物。

一般，对于载体，每克固体支持物(如，多孔硅藻土颗粒)使用不超过约60mg多胺化合物。优选的，每克固体支持物使用不超过约25mg多胺化合物。

多胺化合物与硅藻土之间优选的比率为每克固体支持物约10mg到约60mg多胺化合物。最佳比率为，每克固体支持物(如，多孔硅藻土颗粒)约15mg到约25mg多胺化合物。

所用的多胺化合物溶液的浓度为多胺化合物比溶剂(如，水)约1%(重量/体积)到约0.01%(重量/体积)。以约10ml硅藻土颗粒比约50ml多胺化合物溶液的比率，将多胺化合物溶液加到硅藻土颗粒中。

本文可使用任何固体支持物，它适用于与多胺化合物反应并支持处理过的加合物中的处理过的酶。优选的固体支持物是多孔的。以该观点看，特别优选的所用的固体支持物是多孔硅藻土颗粒。

根据本发明，可以使用任何硅藻土颗粒。特别适合的硅藻土颗粒粒度为大于约72目，粒度大于约52目的颗粒是优选的，最佳的粒度为大于约40目。特别适合的硅藻土颗粒粒度也可以是小于约10目的，优选的粒度小于约14目。用粒度小于约16目的硅藻土颗粒已得到了特别好的结果。(按美国筛测量上述筛目。)

硅藻土颗粒孔的半径优选为约35埃到约1000埃。硅藻土颗粒的表面积优选为约20m²/g到约60m²/g。

然后优选地用任何适宜的化合物洗涤上述形成的载体以有效地除去载体的游离多胺化合物。优选的是用水完成上述洗涤。

在美国专利4, 713, 333 中详细描述了所述洗涤, 该文献的内容引入本文作为参考。

从形成的载体, 独立地形成处理过的加合物。通过使酶与胺活性物质溶液接触, 形成处理过的加合物; 以使用胺活性物质处理酶, 形成处理过的含酶加合物。

术语“胺活性物质”在本文指能与胺基有效反应的任何化合物。胺活性物质选自多官能醛, 多官能有机卤化合物, 多官能酐, 多官能偶氮化合物, 多官能异硫氰酸盐(酯), 多官能异氰酸盐(酯)及两种或多种这些胺活性物质的混合物。

用术语“多官能”指含有胺活性物质的各种化合物, 本文指与酶接触时, 任何具有或能够具有至少两个可以与不同胺基反应的化学功能团的化合物, 功能团之一能与来自载体多胺化合物的胺基反应, 另一功能团能与来自处理过的加合物中酶的胺基反应。

通常, 胺活性物质选自戊二醛, 琥珀酐, 对苯二醛, 二重氮基联苯胺 -2,2' - 二磺酸, 4,4' - 二氟 -3,3' - 二硝基二苯基砜, 二苯基 -4,4' - 二硫氰酸酯 -2,2' - 二磺酸, 3-甲氧基二苯基甲烷 -4,4' -二异氰酸酯, 甲苯 -2-异氰酸酯 -4-异硫氰酸酯, 甲苯 -2,4 - 二异硫氰酸酯, 重氮基联苯胺, 重氮基联苯胺 -3,3' - 二联茴香胺, N, N' - 六亚甲基二碘乙酰胺, 1,6 - 己二异氰酸酯, 氰尿酸氯, 1,5 - 二氟 - 2,4 - 二硝基苯及两种或多种这些胺活性物质的混合物。优选的, 胺活性物质选自多官能醛。更优选的, 胺活性物质选自戊二醛, 琥珀醛, 对苯二醛。用戊二醛得到了最佳结果。

可将水溶性胺活性物质用于来自其水溶液中的酶。可将非水

溶性胺活性物质用于来自有机溶剂(如, 甲醇, 乙醇, 丙醇) 中的酶。 水溶性胺活性物质是优选的。

通常, 使用酶水溶液。 优选的, 所述水溶液是缓冲水溶液。 根据所涉及的酶及溶液组分不同, 所用的酶准确的有效浓度和准确的最佳浓度及溶液组成(如, 水缓冲液)不同。 但是, 在本公开的指导下, 经简单常规试验后, 所述浓度对于本领域专业人员是显而易见的。 在此应注意在任何情况下, 优选所述溶液在每ml 酶溶液(或每克固体酶)中含有70至100ml的缓冲水溶液。

通常, 在胺活性物质的溶液(水)中, 胺活性物质的浓度至少为约0.05%(重量/体积), 优选的是至少约0.1%(重量/体积)。 进一步说, 通常胺活性物质的溶液(水)中胺活性物质的浓度不超过约0.4%, 优选的是不超过约0.2%(重量/体积)。

处理过的加合物在每ml酶溶液中(在加入水缓冲液前)含有至少约0.10g胺活性物质。 优选的, 处理过的加合物在每ml 酶溶液中(加入水缓冲液前)含有至少约0.15g胺活性物质。 最优选的是, 每ml酶溶液(加入水缓冲液前)使用至少约0.2g胺活性物质。

处理过的加合物在每ml酶溶液中(加入水缓冲液前)含有的胺活性物质不超过约1.50g。 优选的, 处理过的加合物在每ml 酶溶液中(加入水缓冲液前)含有不超过约1.0g的胺活性物质。 最佳是在每ml酶溶液中(加入水缓冲液前)使用不超过约0.3g 的胺活性物质。

然而, 在此应注意, 胺活性物质与酶之间的比率取决于所用酶的活性。

例如, 若戊二醛是胺活性物质, 且葡糖淀粉酶(含200DU/ml)

是酶时，优选每ml葡萄糖淀粉酶至少约0.15g戊二醛，最佳为每ml葡萄糖淀粉酶至少约0.2g戊二醛，且优选的是每ml葡萄糖淀粉酶使用不超过约1.00g的戊二醛，最佳为每ml葡萄糖淀粉酶使用不超过0.3g的戊二醛。

一个Dialzyme Unit (Du)是指用可溶性淀粉作为底物，在pH4.2和60°C的检测条件下，1小时内催化生产一克葡萄糖的活性。

作为另一实例，若戊二醛是胺活性物质且真菌 α -淀粉酶(含40,000SKBU/g)是酶时，优选的是每ml α -淀粉酶用至少约0.15g的戊二醛，最佳是每ml α -淀粉酶用至少约0.2g戊二醛，并且每ml α -淀粉酶使用不超过约1.00g的戊二醛是优选的，每ml α -淀粉酶使用不超过0.3g的戊二醛是最佳的。

一个 α -淀粉酶(SKBU)单位指在检测条件下，每小时糊精化1.0g极限糊精底物的活性。

相似地，作为最后的实例，若戊二醛作为胺活性物质且 β -淀粉酶(每ml含1500单位淀粉糖化活性)作为酶，则优选的是每ml β -淀粉酶使用至少约0.15g戊二醛，最佳为每ml β -淀粉酶使用至少约0.2g戊二醛，并且每ml β -淀粉酶使用不超过约1.00g戊二醛是优选的，每ml β -淀粉酶使用不超过0.3g戊二醛最佳。

用Food Chemical Codex, Vol. III (1981)第484页中公开的方法确定淀粉糖化活性，并将其表达为糖化力的程度(DP°)。

一般酶与胺活性物质接触(并随即反应)的温度为至少约10°C，优选的温度为至少约18°C，最佳温度为至少约20°C。作为上限，一般温度不超过约30°C，不超过约28°C是优选的，不超过约25°C最佳。

酶与胺活性物质接触(并随即反应)至少约2小时, 接触时间至少约3小时是优选的, 至少4小时最佳。酶与胺活性物质接触(并随即反应)不超过约24小时, 接触时间不超过约6小时是优选的, 最佳为不超过约4小时。

在由酶活性pH范围决定的pH将酶与胺活性物质接触(并随即反应), 在该pH酶活性可以耐受而不明显失去酶活性。

若葡糖淀粉酶是酶时, 与胺活性物质接触(并随即反应)的pH为至少约3.5, 至少约4.5的pH是优选的, 并且pH不大于约6.0, 优选pH不大于约5.0。

若用真菌 α -淀粉酶作为酶时, 与胺活性物质接触(并随即反应)的pH至少为约4.5, 至少约5.0的pH是优选的, 并且pH不大于约7.0, 优选pH不大于约5.5。

若用 β -淀粉酶作为酶时, 与胺活性物质接触(并随即反应)的pH至少为约4.5, 至少约5.0的pH是优选的, 并且pH不大于约7.0, 优选pH不大于约5.5。

在特别优选的实施方案中, 于搅拌条件下, 使酶与胺活性物质接触(并随即反应)以形成处理过的含酶加合物。在混合以通过溶液提供匀质混合物的条件下, 使酶与胺活性物质接触(并随即反应)。优选足够缓慢地搅拌, 以便没有气泡形成。

用上述方法及在上述条件下, 完成载体与处理过的含酶加合物的接触, 以使载体和处理过的加合物相互反应, 形成固定化酶共轭体。

通常, 对于本发明的固定化酶共轭体, 每克载体包括至少约0.05ml处理过的含酶加合物。优选的是, 每克载体含至少0.07ml

处理过的含酶加合物。进一步说，对于本发明的固定化酶共轭体，每克载体含有不超过约0.6ml处理过的含酶加合物，优选的是每克载体含有不超过约0.5ml处理过的含酶加合物。

若将由处理过的葡萄糖淀粉酶与戊二醛形成的处理过的加合物与由聚乙烯亚胺和硅藻土颗粒形成的载体接触，优选的比率为每克载体约0.11ml到约0.13ml处理过的加合物。若将由处理过的真菌 α -淀粉酶与戊二醛形成的处理过的加合物与由聚乙烯亚胺和硅藻土颗粒形成的载体接触，优选的比率为每克载体约0.14ml到约0.16ml处理过的加合物。若将由处理过的 β -淀粉酶和戊二醛形成的处理过的加合物与由聚乙烯亚胺和硅藻土颗粒形成的载体接触，优选的比率为每克载体约0.15ml到约0.17ml处理过的加合物。

通过搅拌或再循环使载体和处理过的含酶加合物接触。应足够缓慢地搅拌。

载体与处理过的含酶加合物接触的温度为至少约5°C，优选的温度为至少约15°C，特别优选的温度为至少20°。载体与处理过的含酶加合物接触的温度不超过约30°C，优选的温度是不超过约28°C，特别优选的温度为不超过约25°C。

载体与处理过的含酶加合物接触至少约2小时，至少约4小时是优选的。载体与处理过的含酶加合物接触不超过约24小时，不超过约6是优选的，最优选不超过约4小时。

载体与处理过的含酶加合物接触的pH至少为约4.0，优选的pH为至少约4.5。载体与处理过的含酶加合物接触的pH不大于约7.0，pH不大于约6.0是优选的。

用适宜的溶液洗涤如此得到的固定化酶共轭体以除去游离的

加合物和游离的载体是特别优选的。优选该溶液是水。在与上述载体和处理过的含酶加合物接触的步骤相同的条件下实现该洗涤步骤。

可以冷冻贮存固定化酶共轭体几个月以上,而不会明显丧失酶活性。优选的,在贮存共轭体前,将含0.3%(重量/体积)苯甲酸钠、0.15%(重量/体积)山梨酸钾和5%(重量/体积)玉米糖浆的0.02M乙酸盐组合物(pH4.2)加至固定化酶共轭体中。

本发明未预料到的一个观察结果是,用上述方法得到的固定化酶共轭体实际上比按美国专利4,713,333得到的那些固定化酶共轭体更稳定(通过测量在其使用期间丢失于反应介质中的共轭体的酶活性百分数而确定的)。另外,在相同使用条件下,它们比用美国专利4,713,333制备的固定化酶共轭体有更好的热稳定性,按本发明制备的固定化酶共轭体的半衰期比按美国专利4,713,333制备的固定化酶共轭体的半衰期更长。这说明显著提高了酶的生产率。

本发明另一令人满意的方面是可以很容易地回收本文公开的固定化酶共轭体,并在使用涉及酸碱洗涤的简单方法再生后通过固定化作用制备该共轭体并再使用。具体说,在水、0.5N NaOH、水、0.5N HCl以及然后是水,混合用过的固定化酶共轭体。本发明的该方面是非常有意义的,因为它减少了与其相关的一次性使用问题,并通过提高酶的生产率提供了可能的经济节约。

通过下列实施例进一步说明本发明。这些实施例是为了说明优选的具体方案,而不意味着由此限定本发明。

实施例1

制备固定化葡糖淀粉酶共轭体。

将700ml 16到40日 (美国筛)的多孔硅藻土颗粒(美国专利4,713,333中描述的,该文献引入本文作为参考)转移至直径5cm、高100cm的玻璃柱反应器中。

将一层4cm的12目小石子(aquarium gravel)铺在柱的端板以便在操作过程中溶液上流时,帮助分散液体。

以一定的速度将水向上泵,以膨胀或流体化约20%的硅藻土颗粒,从而除细砂。一般在1小时内,水流出物中没有了细砂。将水引至硅藻土颗粒层的顶部。

然后,将3500ml 0.1%(重量/体积)聚乙烯亚胺水溶液(PEI-600,分子量40,000-60,000道尔顿, pH9.8)向上泵,并使流出物在该层内再循环2小时。然后从柱中将聚乙烯亚胺水溶液排至硅藻土颗粒层的顶部。

室温下,用水上流洗涤硅藻土颗粒2小时以除去游离的聚乙烯亚胺。用这种方法,得到了硅藻土颗粒-聚乙烯亚胺载体。

将以DIAZYME L-200 (SOLVAY ENZYMES, Inc., Elkhart, Indiana) 商标销售的35ml 葡糖淀粉酶加至3500ml pH5.0的0.02M 乙酸盐缓冲液中。葡糖淀粉酶DIAZYME L-200含 200DU/ml的葡糖淀粉酶活性。

边缓慢混合,边将17.5g 50%(重量/重量)戊二醛(在水中)缓慢加至葡糖淀粉酶水溶液中,在20-25°C,边缓慢搅拌边使戊二醛与葡糖淀粉酶水溶液反应4小时。结果是形成了含有处理过的葡糖淀粉酶的处理过的葡糖淀粉酶-戊二醛加合物。

然后，使处理过的葡糖淀粉酶-戊二醛加合物循环通过上述制备的硅藻土颗粒-聚乙烯亚胺载体。在缓慢搅拌下，于约20-25°C使所述循环保持4小时，然后用水洗涤掉载体中过量的处理过的加合物。结果是结成了稳定、有活性的固定化葡糖淀粉酶共轭体。

然后从柱中除去洗涤过的共轭体，并贮存于pH4.2含0.3%（重量/体积）苯甲酸钠、0.15%（重量/体积）山梨酸钾和5%（重量/体积）玉米糖浆固体的0.02M 乙酸盐中以备将来使用。

然后，可将上述形成的固定化葡糖淀粉酶共轭体贮存于经数月仍不会明显丧失活性的冷藏条件下。

用50ml pH4.2的在0.02M乙酸盐中的33%（W/V）玉米淀粉作为底物，在55°C检测固定化酶共轭体。为了完成检测，将底物和酶置于250ml烧瓶中并于55°C水浴振荡培养。在反应时间达到15和75分钟时，取出0.2ml反应混合物并加入0.5ml 0.2N H_2SO_4 以终止反应。加入5.3ml蒸馏水稀释这些样品，然后用0.45 μ 的滤器过滤。用碳水化合物高压液相色谱（HPLC）分析产物。一单位活性表示在检测条件下，1分钟内生产1微摩尔葡萄糖的酶量，并表示为U/g（每克共轭体的活性单位数）。

发现该制剂的酶活性为881单位/g（以干重计）。发现总活性的84.6%是以固定化酶表现的，15.4%是非固定的。固定化酶的密度为0.43g/ml。

实施例2

在提取介质中固定化葡糖淀粉酶共轭体的稳定性

该实施例证明了共轭体的稳定性（酶是怎样很好地缚于共轭体

中)。本方法的原理是在提取介质中培养固定化酶共轭体。所述培养后，除去共轭体，检测提取物介质以确定从共轭体中脱离的(未结合的)并丢失于提取介质中的酶量(通过测量其酶活性来确定)。

将按实施例1制备的5ml固定化酶共轭体样品放入15ml 锥形塑料管中，并用水洗涤数次。然后倒出液体，随后加入5ml pH5.0含5%(重量/体积)NaCl的0.02N 乙酸盐缓冲液。

混合数分钟后，在30°C水浴中将试管培养18小时。培养后，通过WHATMAN N°1 滤纸重力过滤酶浆。

然后，将0.1ml 滤物加至1.0ml底物(20% (w/v) pH 5.0的在0.02N乙酸盐中的玉米淀粉)中，在60°C水浴中放置60分钟。60分钟后，将试管在沸水浴中放10分钟，终止反应。

然后用流动相0.01N H_2SO_4 将样品(称为样品A)稀释10倍，用HPLC分析碳水化合物图。

为了比较，按美国专利4, 713, 333的实施例1 制备固定化葡萄糖淀粉酶共轭体样品(称为样品B)，并按上段中描述的方法检测。

样品A和B的检测结果列于表1中。

表 1

样品	起始活性	提取后活性	丢失的活性
	U/ml	(U/ml)	%
A	379	369	2.6
B	332	293	12.0

结果清楚地说明，在共轭体基质中按本发明方法生产的固定化葡糖淀粉酶共轭体的处理过的葡糖淀粉酶明显比按美国专利4,713,333制备的固定化葡糖淀粉酶共轭体的更稳定(紧缚的)，由上，减少了从共轭体中酶的丢失和进入反应介质中，正如本发明共轭体所经历的。

实施例3

在玻璃柱中固定化葡糖淀粉酶共轭体的稳定性

将50ml按实施例1所述制备的固定化葡糖淀粉酶共轭体放入直径1.5cm、高50cm的带套玻璃柱中。

用循环水浴将该柱保持于55°C。然后，于55°C以50ml/小时的流速经24小时，使由在pH5.0的0.02N乙酸盐缓冲液中的10%(W/W)干固体(DS) 43DE浆和5%(W/V) NaCl组成的提取介质通过该柱。

提取结束时，检测由此得到的固定化葡糖淀粉酶共轭体样品(

称为样品C)以评估其稳定性。

为了对比, 用与上段描述的相同的方法检测按美国专利4,713,333的实施例1制备的固定化葡糖淀粉酶共轭体样品(称为样品D)。

样品C和D的检测结果列于表2

表 2

样品	起始活性(U/g)	提取后活性(U/g)	丢失的活性%
C	881	653	26
D	771	396	49

结果清楚地表明, 在共轭体基质中按本发明方法制备的固定化葡糖淀粉酶共轭体的处理过的葡糖淀粉酶明显比按美国专利4,713,333制备的固定化葡糖淀粉酶共轭体的更稳定(紧缚的), 由此减少了酶从共轭体中的丢失以及进入反应介质中, 正如本发明共轭体所经历的。

实施例4

制备固定化 α -淀粉酶共轭体

取44ml 由SOLVAY - ENZYMES, Inc. (Elkhart, Indiana) 以CLARASE L-40,000商标销售的真菌 α -淀粉酶, 并按实施例1的固定化方法制成固定化真菌 α -淀粉酶共轭体样品(称为样品E)。

以CLARASE L-40, 000 商标销售的真菌 α -淀粉酶具有 40, 000SKBU/g的酶活性。1个(SKBU) α -淀粉酶单位是指在检测条件下, 每小时糊精化1.0g极限糊精底物的活性。

发现固定化酶共轭体的活性为638U/g。

实施例5

在提取介质中固定化 α -淀粉酶共轭体的稳定性。

按实施例4, 制备5ml固定化酶共轭体样品, 按实施例1中描述的酶活性检测方法(只是底物的pH6.0), 完成下列检测。

按实施例2中所述, 通过在30°C, 将酶培养过夜, 评估固定化真菌 α -淀粉酶共轭体的稳定性。NaCl 乙酸盐缓冲液的pH为6.0, 与实施例1固定化葡萄糖淀粉酶5.0的pH形成对照, 并且溶解的真菌 α -淀粉酶活性的检测温度是50°C而不是60°C。

为了对比, 按与上段所述相同的方法, 检测按美国专利4,713, 333中实施例1所用方法制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体样品(称为样品F)。

样品E和F的检测结果显示于表3。

表 3

样品	起始活性(U/ml)	提取后活性(U/ml)	丢失的活性%
E	274	266.5	3.0
F	366	156.0	57.0

结果清楚地说明, 在共轭体基质中, 按本发明方法制备的固定化 α -淀粉酶共轭体的处理过的 α -淀粉酶明显比按美国专利4, 713, 333制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体的更稳定(紧缚的), 由此减少了酶从共轭体中的丢失以及进入反应介质中, 正如本发明共轭体所经历的。

实施例6

玻璃柱中固定化 α -淀粉酶共轭体的稳定性

得到50ml按实施例4中所述制备的固定化 α -淀粉酶共轭体(称为样品E)。

为了对比, 按美国专利4, 713, 333实施例1制备固定化 α -淀粉酶共轭体样品(称为样品F)。

除了在5.0%(w/v)NaCl的0.02M乙酸盐中, 10%DS(干固体)浆的pH是6.0而不是5.0, 柱温度是50°C而不是55°C外, 按实施例3中描述的柱方法检测两种固定化真菌 α -淀粉酶共轭体样品(样品E和F)的稳定性。

使用柱方法检测的样品E和F的结果列于表4。

表 4

样品	起始活性(U/g)	提取后活性(U/g)	丢失的活性%
E	638	608	4.7
F	851	518	39.0

这些结果清楚地说明，在共轭体基质中，按本发明制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体的处理过的真菌 α -淀粉酶比按美国专利4,713,333制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体的更稳定(紧缚的)，由此降低了酶从共轭体中的丢失以及进入反应介质中，正如本发明共轭体所经历的。

实施例7

固定化 α -淀粉酶共轭体的稳定性(半衰期)

另一种观察稳定性的方法是将固定化酶共轭体放在柱中，然后监测底物通过酶共轭体层的活性。

将15ml按实施例4中的描述得到的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体(称为样品G)置于直径1.5cm、高50cm的玻璃套柱中。将该柱保持于60°并以每小时约45ml的恒定流速，使喂入的浆液渗透通过柱床。喂入的浆液由pH调至6.0的40%DS(干固体)的43DE浆组成并

加入下列防腐剂:0.3%(w/v)苯甲酸钠、0.15%(w/v)山梨酸钾、125ppm羟苯甲酸甲酯和250ppm SO₂。

每天取样,用HPLC分析得到碳水化合物图。通过计算每ml固定化酶共轭体每分钟形成的麦芽糖 μmol 数,用二糖部分计算活性。

为了对比,按与上段所述相同的方法检测由美国专利4,713,333实施例1中所用的方法制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体样品(称为样品H)。

样品G和H的检测结果列于表5。

表 5

样品	起始活性U/ml	半衰期(天数)
G	1700	29
H	1500	18

这些结果清楚地说明,按本发明制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体的处理过的真菌 α -淀粉酶比按美国专利4,713,333制备的固定化真菌 α -淀粉酶共轭体更稳定,它具有明显提高的半衰期。

实施例8

制备固定化 β -淀粉酶共轭体

制备48ml β -淀粉酶(每ml含1500单位糖化活性), 并按实施例1的固定化方法制成固定化 β -淀粉酶共轭体样品(称为样品I)。

用Food Chemical Codex Vol. III, (1981), P. 484上公开的
有关糖化活性的方法, 确定活性并将其表达为糖化力的程度(DP°)。

发现该制品的酶活性是860单位/g(以干重计)。

实施例9

在提取介质中固定化 β -淀粉酶共轭体的稳定性

按实施例8制备5ml固定化酶共轭体样品(称为样品I), 并按
实施例1中描述的检测酶活性的检测方法(除底物pH是5.5外)检测。

按实施例2中的描述, 通过在30°C将酶培养过夜, 评估固定化
 β -淀粉酶共轭体的稳定性。NaCl乙酸盐缓冲液的pH是5.5, 而不
是实施例2固定化葡糖淀粉酶的pH5.0, 检测溶解的 β -淀粉酶活性
的温度是55°C而不是60°C。

为了对比, 按与上段所述相同的方法检测按美国专利4, 713,
333实施例1中所用方法制备的固定化 β -淀粉酶共轭体样品(称为
样品J)。

样品I和J的检测结果列于表6。

表 6

样品	起始活性 (U/ml)	提取后活性 (U/ml)	丢失的活性%
I	370	369	<0.5
J	201	188	6.5

这些结果清楚地说明：在共轭体基质中，按本发明方法制备的固定化 β -淀粉酶共轭体的处理过的 β -淀粉酶比按美国专利 4,713,333 制备的固定化 β -淀粉酶的更稳定(紧缚的)，由此减少了酶从共轭体中的丢失以及进入反应介质中，正如本发明共轭体所经历的。

显然，根据上述教导，可以对本发明进行大量的修改及改变。因此应理解在后附的权利要求范围内，也可按其它方式实施本发明，而不仅限于本文具体描述的。