

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 151638 B



(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 11/16

(21) Patentansøgning nr.: 3776/79

(22) Indleveringsdag: 10 sep 1979

(41) Alm. tilgængelig: 12 mar 1980

(44) Fremlagt: 21 dec 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 11 sep 1978 US 941152

(71) Ansøger: *MILES LABORATORIES INC.; P.O. Box 40; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46515, US

(72) Opfinder: Anthony Hing *Chen; US, Yun-Chi *Jao; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et formet bakteriecelleaggregat

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4060456

(57) Sammendrag:

SAMMENDRAG

3776-79

Et formet bakteriecelleaggregat med forøget hårdhed fremstilles ved at tilsætte tidligere fremstillet, tørret, findelt bakteriecelleaggregat til et bakteriecelleaggregat efter dets dannelse, men før dets formning.

DK 151638 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et formet aggregat af bakterieceller, ved hvilken fremgangsmåde en bakteriecellemasse kontaktes med et tværbindingsmiddel. De fremstillede bakteriecelleaggregater kan finde anvendelse til udførelse af enzymatiske processer, især hvis bakteriecellerne indeholder glucoseisomeraseaktivitet.

Glucoseisomerase er et enzym, som kan anvendes til at katalysere omdannelsen af glucose (dextrose) til fruktose (lævulose). Det er kendt, at glucoseisomerase kan fremstilles ved fermentering med visse organismer, såsom Streptomyces flavovirens, Streptomyces echinatur, Streptomyces achromogenus, Streptomyces albus, Streptomyces olivaceus, Bacillus coagulans og lignende i passende næringsmedier. Glucoseisomerasen dannes inden i bakteriecellerne, som vokser, medens det produceres. Cellerne kan filtreres fra fermentationsmediet og anvendes direkte som glucoseisomerasekilde. Direkte kommerciel anvendelse af sådanne enzymholdige bakterieceller har imidlertid været besværliggjort af en væsentlig ulempe. Cellerne mistede enzymaktiviteten under anvendelsen, og derved reduceredes cellernes brugstid. Denne ulempe blev overvundet ved at behandle bakteriecellerne med glutaraldehyd som beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.779.869. Andre metoder til immobilisering af enzymaktiviteten i bakterieceller samt til dannelse af aggregater af disse enzymholdige bakterieceller er beskrevet f.eks. i beskrivelsen til US patent nr. 3.821.086 og US reissue patent nr. 29.130 og 29.136 samt i beskrivelsen til sydafrikansk patent nr. 73/5917. Beskrivelserne til ovennævnte US patenter angår anvendelsen af visse anioniske og kationiske polyelektrolytflokkuleringsmidler. I beskrivelsen til det sydafrikanske patent omtales forskellige kombinationer af bindemidler, forstærkningsmidler og tværbindingsmidler. Skønt ovennævnte teknik tilvejebragte bakteriecelleaggregater, der almindeligvis bevarede deres enzymaktivitet under anvendelsen, var der stadig behov for at øge aggregaternes hårdhed, således at de kunne anvendes kommercielt i reaktionslag med større dybde. I beskrivelsen til US patent nr. 3.935.069 er der beskrevet en tilsætning af visse metalliske forbindelser i forbindelse med polyelektrolytflokkuleringsmidler til forbedring af hårdheden. Denne teknik har imidlertid begrænset anvendelighed.

Ved fremstillingen af formede bakteriecelleaggregater dannes en vis mængde findelt produkt, der har en partikelstørrelse, som er for

lille til kommerciel brug. Forskellige metoder til udnyttelse af disse småpartikler er blevet foreslået. I beskrivelsen til US patent nr. 4.060.456 er der omtalt en recirkulation af produktpartikler til en flokkuleringstank, hvor der tilsættes et flokkuleringsmiddel til dannelsen af bakteriecelleaggregater. Medens denne teknik tilvejebringer en anvendelse af recirkulerede småstykker ved fremstilling af et flokkuleret aggregat, er der ikke nævnt noget om nogen effekt på produktets hårdhed. Anvendelse af recirkulerede enzytbærere er også omtalt i beskrivelserne til US patenterne nr. 4.002.576, 4.078.970 og 4.087.330, men i intet tilfælde er der en omtale af eller et forslag om, at sådanne recirkulerede materialer kan hjælpe med til at forbedre hårdheden af de formede produkter.

Det har nu vist sig, at hårdheden af et formet bakteriecelleaggregat kan forbedres ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er ejendommelig ved, at bakteriecellemassen kontaktes med et tværbindingmiddel, som er et reaktionsprodukt af (1) et materiale udvalgt fra klassen bestående af glutaraldehyd, cyanursyrehalid eller kombinationer heraf og (2) en vandopløselig kationpolymer opnået ved polymerisation af en epihalohydrin med en alkylpolyamin, der har formlen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en alkylengruppe, der har fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver er en alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet epihalohydrin til polyamin er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken polymerisation omfatter, at der med alkylpolyaminen omsættes fra ca. 50 til ca. 90% af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reaktionen får lov til at fortsætte, indtil reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den resterende portion af epihalohydrinet omsættes trinvis til opnåelse af den kationiske polymer, idet polymerisationstemperaturen er på fra ca. 60°C til ca. 120°C, hvorpå det resultrende aggregat tilsættes en portion tidligere fremstillet, tørret findelt bakteriecelleaggregat af samme sammensætning med en partikelstørrelse mindre end 0,71 mm sigtemaskestørrelse, hvorefter blandingen formes, tørres, formales og adskilles til frembringelse af de ønskede partikler med en partikelstørrelse over ca. 0,71 mm sigtemaskestørrelse og partikler med en partikelstørrelse under ca. 0,71 mm sigtemaskestørrelse, som recirkuleres.

Fremgangsmåden er navnlig nyttig, når det resulterende aggregat tørres og derefter rehydreres til efterfølgende brug.

I beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 1223/79 er der be-

skrevet en fremgangsmåde til fremstilling af et aggregat af bakterieceller, ved hvilken fremgangsmåde en bakteriecellemasse kontaktes med et tværbindingsmiddel, hvorpå det resulterende aggregat udvindes og, om ønsket, tørres, hvorhos tværbindingsmidlet er et reaktionsprodukt af (1) et materiale udvalgt fra en klasse betstående af glutaraldehyd, cyanursyrehalid og kombinationer heraf og (2) en vandopløselig kationisk polymer tilvejebragt ved polymerisation af en epihalohydrin med en alkylpolyamin, som har formelen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en alkylgruppe, der har fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver er en alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet epihalohydrin til polyamin er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken polymerisation omfatter, at der med alkylpolyaminen omsættes fra ca. 50 til ca. 90% af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reaktionen får lov til at fortsætte, indtil reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den resterende portion epihalohydrin omsættes trinvis til opnåelse af den kationiske polymer, hvor polymerisationstemperaturen er på fra ca. 60°C til ca. 120°C. - Denne fremgangsmåde udgør dog kun § 2.2.2. teknik i forhold til den foreliggende opfindelse.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes til forskellige enzymholdige bakterieceller, og resten af beskrivelsen vil angå anvendelse af fremgangsmåden til bakterieceller indeholdende glucoseisomeraseaktivitet.

De glucoseisomeraseaktivitetsholdige baktericeller, der er anvendelige ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, kan tilvejebringes ved velkendte procedurer. De foretrukne enzymholdige celler frembringes ved under submerse, aerobe forhold at dyrke en kultur af Streptomyces olivaceus NRRL 3583 eller mutanter heraf i et medium, der indeholder passende næringsstoffer. Dette er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.625.828. De resulterende baktericeller separeres fra fermentationsmediet ved filtrering eller centrifugering.

De ingredienser, som anvendes ved tværbindingen er let opnåelige. Glutaraldehyd og cyanursyrehalid, såsom cyanursyretetrachlorid, cyanursyretetrabromid, cyanursyretetriiodid og lignende, er kommercielt tilgængelige eller kan fremstilles ved velkendte metoder. Den specielle epihalohydrin-polyaminpolymer, der anvendes ved tværbindingen, er kommercielt opnåelig under varemærket BETZ 1180 fra

Betz Laboratories, Inc. Trevose, Pennsylvania. BETZ 1180 har en molekylvægt på mindre end en million, indeholder ca. 0,288 millimol aminogru-
pper pr. gram opløsning (baseret på en ninhydrinanalyse) og markedsføres som en opløsning, der indeholder 30 vægtprocent
5 tørstof baseret på opløsningens samlede vægt. Denne forbindelse er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.915.904. Forbindelsen er
deri beskrevet som en vandopløselig kationisk polymer, der opnås ved polymerisation af en epihalohydrin med en alkylpolyamin, som
har formelen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en lavere alkyl med fra 2 til
10 ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver er et lavere alkyl på fra ca. 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet epihalohydrin til polyamin
er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken polymerisation omfatter, at der med alkylpolyaminen omsættes fra ca. 50 til ca. 90 procent
af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reak-
15 tionen får lov til at fortsætte indtil reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den resterende portion af
epihalohydrinen omsættes trinvis til opnåelse af den kationiske polymer, idet polymerisationstemperaturen er på fra ca. 60°C til ca.
120°C. Dette materiale vil herefter blive omtalt som "polyamin-
20 polymeren".

Glutaraldehydet og/eller cyanursyrehalidet, som kollektivt identificeres som komponent (1), omsættes med polyaminpolymeren,
der identificeres som komponent (2), ved et pH omkring 6 til 10 og ved ca. 0° til 30°C i ca. 0,5 til 2,5 timer. Det samlede
25 tværbindende reaktionsprodukt indeholder fra ca. 12 til 77 vægtprocent af komponent (1) og fra ca. 23 til ca. 88 vægtprocent af
komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2). Reaktionsproduktets glutaraldehyd-
indhold er på fra ca. 0 til ca. 77 vægtprocent, og cyanursyrehalid-
30 indholdet er på fra ca. 0 til ca. 22 vægtprocent baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2).

Reaktionen mellem glutaraldehyd og polyaminpolymeren udføres fortrinsvis ved pH 8 til 9 og ved ca. 18° til 25°C i ca. 0,5 time.
Glutaraldehydet bør være til stede i et molforhold på mindst ét mol
35 pr. mol aminogruppe i polyaminen for at undgå uønsket tværbinding af polyaminpolymeren med glutaraldehyd.

Reaktionen mellem cyanursyrehalid alene og polyaminpolymeren udføres fortrinsvis ved pH 8 til 9 og ved 0° til 10°C i ca. 1 til 2
timer. Cyanursyrehalidet bør være til stede i et molforhold på mindst

ét mol pr. mol aminogruppe i polyaminpolymeren for at undgå uønskelig tværbinding af polyaminpolymeren med cyanursyrehalid. Cyanursyrehalider, såsom cyanursyretetrachlorid, har tre halogenreaktive steder. Et af disse steder vil reagere ved 0°C eller 5 derover. Efter omsætning ved det første sted vil det andet sted reagere ved 30° til 50°C , og det sidste sted vil reagere ved 90° til 100°C . Det er ønskeligt indledningsvis kun at omsætte det første sted på cyanursyrehalidet med polyaminpolymeren. Når det resulterende tværbindende reaktionsprodukt senere omsættes med 10 bakteriecellerne og opvarmes til højere temperaturer under tørring vil de tilbageværende reaktive steder på cyanursyrehalidet derpå reagere med polyaminpolymeren til tilvejebringelse af yderligere tværbinding til bakteriecelleaggregatet.

Reaktionen mellem polyaminpolymeren og kombinationen af glutaraldehyd og cyanursyrehalid udføres i trin. Først omsættes cyanursyrehalidet med polyaminpolymeren ved pH 8 til 9 og 0° til 10°C i 15 ca. 1 til 2 timer. I denne situation har reaktanterne fortrinsvis et molforhold på 1 mol cyanursyrehalid til 2 mol aminogrupeer på polyaminpolymeren. Derpå tilsættes en overskydende mængde glutaraldehyd, og reaktionen fortsættes ved samme pH- og temperaturbetingelser i ca. 0,5 time. 20

Det tværbindende reaktionsprodukt, som anvendes ved dannelsen af bakteriecelleaggregatet, er ikke en kationisk polyelektrolyt, eftersom de aminogrupeer på polyaminpolymeren, der initialt tilvejebragte den kationiske karakter, er blevet omsat med glutaraldehydet og/eller cyanursyrehalidet og således ikke længere er til rådighed. 25

Bakteriecelleaggregaterne fremstilles ved at kontakte en bakteriecellemasse med det tværbindende reaktionsprodukt, der er fremstillet som beskrevet ovenfor, ved pH ca. 8 til 9 og ved ca. 0° 30 til 30°C i ca. 0,5 til 1,5 time. Det tværbindende reaktionsprodukt anvendes i en sådan mængde og koncentration, at bakteriecellerne kontaktes med fra ca. 4,5 til ca. 60 vægtprocent af de aktive bestanddele i det tværbindende reaktionsprodukt baseret på cellernes tørvægt.

Efter at ovennævnte reaktion har fundet sted, anbringes den resulterende bakteriecelleaggregatopslæmning fordelagtigt i en opbevarings- eller strømmetank anbragt opstrøms for et filtreringsapparat, såsom et roterende vakuumfilter. Opslæmningen filtreres derefter til dannelsen af en filterkage af fugtigt bakteriecelleaggregat. 35

Dette fugtige bakteriecelleaggregat bliver derefter udpresset eller på anden måde formet til de ønskelige former og derefter tørret ved omkring 60°C i adskillige timer.

5 Det ovenfor fremstillede tørrede aggregat sønderdeles og størrelsessorteres til frembringelse af de ønskede aggregatpartikler med en størrelse, der passerer gennem en sigte med maskeåbninger på 1,19 mm, men tilbageholdes af en sigte med maskeåbninger på 0,71 mm. Det produktmateriale, der har en partikelstørrelse, som er større end 1,19 mm, sønderdeles igen, medens det produktmateriale, 10 der har en partikelstørrelse mindre end ca. 0,71 mm og et fugtindhold på omkring 12 vægtprocent, recirkuleres i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse.

Det tidligere fremstillede tørrede findelte bakteriecelleaggregat eller -findele, som passerer igennem 0,71 mm sigten, tilsættes til 15 bakteriecelleaggregatet efter at det er dannet, men før det formes, såsom ved udpresning. Dette kan bekvemt opnås på i det mindste to måder. Ved en procedure blandes findelene med bakteriecelleaggregatopslæmningen i opbevarings- eller strømmetanken anbragt opstrøms for filteret. Ved en anden procedure kan findelene blandes 20 med det fugtige bakteriecelleaggregat, før det kommer ind i strengpressen.

Det tørrede findelte bakteriecelleaggregat tilsættes til bakteriecelleaggregatet i en mængde på op til omkring 70 vægtprocent baseret på den samlede vægt af blandingstørstofferne. Fortrinsvis 25 tilsættes findelene til bakteriecelleaggregatet i en mængde på fra omkring 5 til omkring 70 vægtprocent baseret på den samlede vægt af blandingstørstofferne. Allerhelst tilsættes findelene i en mængde på fra omkring 30 vægtprocent, baseret på den samlede vægt af blandingstørstofferne.

30 Blandingen af findelt og fugtigt bakteriecelleaggregat formes, fortrinsvis ved at ekstrudere denne blanding gennem en matrice med reduceret tværsnitsareal, den formede blanding eller extrudat tørres, og det tørrede aggregat sønderdeles og adskilles til frembringelse af det ønskede partikelstørrelsesområde. Alle frembragte småpartikler 35 kan ifølge denne opfindelse recirkuleres. En ekstruderingsmatrice, der har åbninger på omkring 3,18 mm (1/8 in.) til omkring 1,59 mm (1/16 in.) foretrækkes på nuværende tidspunkt.

Det resulterende tørrede aggregat kan opbevares indtil det skal bruges i en enzymatisk proces. På dette tidspunkt rehydreres det

tørrede aggregat og konditioneres til brug. En illustrativ konditioneringsproces er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.974.036.

En hovedfordel ved den foreliggende opfindelse er en forøgelse af hårdheden af bakteriecelleaggregatet efter rehydrering sammenlignet med de hidtil kendte bakteriecelleaggregater. Hårdheden sættes i relation til bakteriecelleaggregatpartiklernes modstand mod komprimering. En Instron Universal Tester Model 1102 blev brugt på lignende måde som det er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.935.069. Dette instrument kan leveres fra Instron Corporation, Canton, Massachusetts.

Den belastnings- eller prøvecelle, der blev anvendt til den ovenfor nævnte Instron Tester består af en gennemsigtig acrylsyreplastcylinder, der har en indre diameter på 4,37 cm, en yderdiameter på 6,45 cm og en højde på 21,8 cm. Bunddelen har en afsats med en tykkelse på 0,635 cm og en åbning på 3,81 cm, som danner en støtte for et mikrofilter. Et bekvemt mikrofilter er en spindeplade, der anvendes til tekstilspinding, og som har 14500 åbninger med en diameter på omkring 0,2032 mm.

Et 304-type rustfri stålpressestempel med en diameter på 4,3 cm og en længde på 13,66 cm monteres således, at den bevæger sig koaksialt ind i den ovenfor nævnte cylinder. Passende mærker er anbragt langs belastningscellen til at vise en prøvedybde på 10,17 cm. Der er også draget omsorg for at kunne påføre bunden af belastningscellen reduceret tryk eller vakuum og for at kunne opsamle eventuel væske, der passerer gennem mikrofilteret.

Hvis en prøve af bakteriecelleaggregat placeres i den ovenfor nævnte belastningscelle og prøven påføres tryk gennem pressestemplet, vil prøven blive komprimeret. Det tryk, der behøves for at komprimere prøven i et vist omfang, er en indikation for prøvens hårdhed.

Det efterfølgende er genhydreringshårdhedsprøveproceduren, som den anvendes i eksemplerne i nærværende beskrivelse:

En 33 vægtprocent vandig opløsning af glucose justeres til pH 8,1. En portion på 130 g tørret bakteriecelleaggregat blandes med 1300 ml af denne glucoseopløsning ved forsigtig omrystning ved 24°C i en time. Den resulterende blanding drænes over en sigte med maskeåbninger på 0,84 mm i omkring 30 sekunder. De faste stoffer resuspenderes derefter i en frisk portion af den ovenfor nævnte

glucoseopløsning og omrøres i fem minutter ved 24°C. Den resulterende opslæmning bundfældes i 5 minutter og drænes derefter som ovenfor beskrevet. De faste stoffer resuspenderes derefter i en frisk portion af den ovenfor nævnte glucoseopløsning og omrøres i 5 minutter ved 24°C. Omkring halvdelen af den resulterende opslæmning hældes derefter over i prøvecellen til en højde af 10,17 cm. Et reduceret tryk eller vakuum på 2,54 cm kviksølv påføres bunden af prøvecellen i 3 minutter for at suge væsken gennem mikrofilteret. Pressestemplet bliver derefter sænket indtil det netop rører toppen af prøven. Krydshovedet på Instron instrumentet sættes fast på pressestemplet og den bliver sat til at bevæge sig nedad med en hastighed på 1,27 cm/min og stopper ved en indtrængning på 2,54 cm. Optægningspapirhastigheden sættes til 12,7 cm /min. Efter indtrængningen tillades pressestemplet en hvileperiode på nøjagtig 1 minut. Pressestemplet placeres igen i kontakt med toppen af prøven og Instron instrumentet sættes til at stoppe ved en indtrængning på 2,54 cm. Det tryk, der er nødvendigt for at opnå den anden indtrængning, er målet for prøvens hårdhed.

Opfindelsen bliver beskrevet i yderligere detaljer i de efterfølgende illustrative eksempler.

EKSEMPEL 1

En opløsning af polyaminpolymer blev tilberedt ved at fortynde 1750 g af en BETZ 1180 opløsning indeholdende 525 g af aktivt materiale med destilleret vand til frembringelse af ialt 15 liter. pH Blev justeret til 9. En opløsning af glutaraldehyd blev tilberedt ved at fortynde 2670 ml af en 25 vægtprocent glutaraldehyd indeholdende 667 g aktivt materiale med destilleret vand til ialt 15 liter. pH Blev justeret til 9. Disse to opløsninger blev derefter sammenblandet og destilleret vand blev tilsat til ialt 42 liter. Reaktionen fandt sted ved et pH på omkring 9 og en temperatur på omkring 25°C i ca. 0,5 time. Det resulterende produkt blev dannet fra en reaktionsblanding indeholdende 56 vægtprocent glutaraldehyd og 44 vægtprocent polyaminpolymer baseret på den samlede vægt af glutaraldehyd (komponent 1) og polyaminpolymeren (komponent 2).

En kultur af en mutant af Streptomyces olivaceus NRRL 3583 blev dyrket i en omrystet, gennemluftet fermentor indeholdende et passende næringsmedium som beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.625.828. Den resulterende fermentorsuppe indeholdende en bakteriecellemasse blev justeret til pH 8-9 ved tilsætning af passende

puffermateriale. Den ovenfor nævnte opløsning blev tilsat til fermentorsuppen i en mængde på 6 ml pr. gram celletørvægt for at give 17 vægtprocent totalreaktionsprodukt baseret på tørvægten af bakteriecellerne. Efter en reaktionstid på ca. 30 min. ved 25°C og pH 8-9 blev den behandlede suppe indeholdende bakteriecelleaggregatet anbragt i en opbevaringstank, fra hvilken den blev ført videre til et roterende vakuumfilter. Den resulterende våde filterkage blev skåret i mindre stykker på omkring 1 cm² i en ituskærer. De ituskårne fugtige filterkagestykker, der havde et fugtighedsindhold på omkring 76 vægtprocent, blev derefter opdelt i 4 portioner. En portion blev derefter ekstruderet gennem en matrice med 6 åbninger med en diameter på 3,18 mm (1/8-in.) under anvendelse af en ikke-komprimerende ekstruderingsnegl med en skruerotation på 100 omdr/min. Det resulterende ekstruderede bakteriecelleaggregat blev derefter tørret ved 60°C i 4 til 6 timer og formalet. De sønderdelte partikler blev derefter adskilt til opsamling af den ønskede fraktion, som passerede gennem en sigte med maskeåbninger på 1,19 mm, men som blev tilbageholdt på en sigte med maskeåbninger på 0,71 mm. Findelene, som passerede gennem 0,71 mm sigten, blev opsamlet til efterfølgende brug. -1,19 mm + 0,71 mm Fraktionen blev betegnet som "kontrol". Dens indhold af glucoseisomeraseaktivitet blev ved anvendelse af den analysemetode, der er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.779.869, målt til at være 430 glucoseisomeraseenheder (G.I.U.) pr. gm. Dens hårdhed blev også målt ved den ovenfor beskrevne genhydreringshårdhedsprøveprocedure. De resterende 3 portioner fugtig bakteriecelleaggregatfilterkage blev derefter individuelt blandet i en blander med kontrolleret mængde af tidligere tørret Streptomyces olivaceus bakteriecelleaggregat, der havde en partikelcelle på mindre end omkring 0,71 mm, og som havde et fugtindhold på 12 vægtprocent. Hver af de tre blandede portioner (prøve 1B, 1C og 1D) blev derefter individuelt ekstruderet, tørret, sønderdelt og adskilt som ovenfor beskrevet for kontrollen til dannelsen af portioner af bakteriecelleaggregat, der havde en partikelstørrelse, som passerede gennem en sigte med maskeåbninger på 1,19 mm og blev tilbageholdt på en sigte med maskeåbninger på 0,71 mm. Hårdheden og enzymaktiviteten af hver portion produkt blev derefter målt. Resultaterne er vist nedenfor i tabel I.

Prøvernes hårdhed er udtrykt som procentforøgelse i forhold til hårdheden af kontrolprøven.

TABEL I

<u>Prøve</u>	<u>Total fugtindhold</u>	<u>Vægtprocent baseret på total tørstof</u> <u>Recirkulerede</u>	<u>Filterkage</u>	<u>Procent forøget hårdhed</u>	<u>Aktivitet G.l.U./gm</u>
	<u>Vægtprocent</u>	<u>findele</u>			
1A (kontrol)	76,0	0	100	-	430
1B	69,5	28,1	71,9	42,46	459
1C	56,5	60,1	39,9	49.01	433
1D	43,5	77,9	22,1	133,15	231

Reduktionen af enzymaktiviteten i prøve 1D formodes at skyldes inaktivering forårsaget af forhøjet temperatur og tryk frembragt i ekstruderen ved det lavere fugtighedsindhold. Det fremgår, at en
5 tilsætning af findele på op til omkring 70 vægtprocent baseret på total tørstof kan benyttes uden at svække enzymaktiviteten.

EKSEMPEL 2

Fremgangsmåden i eksempel 1 blev gentaget med følgende ændringer. Tre portioner af den fugtige filterkage blev individuelt
10 blandet med 46,8 vægtprocent recirkuleret bakteriecelleaggregatfindele baseret på total tørvægt. Disse tre portioner blev derefter separat ekstruderet gennem matricer med 6 åbninger med en diameter på 3,18 mm (1/8-in.), 8 åbninger med en diameter på 1,59 mm (1/26 in.) og 10 åbninger med en diameter på 1,19 mm (3/64-in.).
15 Resultaterne er vist i den efterfølgende tabel II.

20

25

30

35

TABEL II

<u>Prøve</u>	<u>Fugtindhold</u>	<u>Vægtprocent baseret på total tørstof</u>	<u>Filterkage</u>	<u>Stempeldiameter mm</u>	<u>(Inch)</u>	<u>Procent forøget hårdhed</u>	<u>Aktivitet G.l.U./gm.</u>
	<u>Vægtprocent</u>	<u>Genbrugt findele</u>					
2A (kontrol)	80,32	0	100	3,18	(1/8)	-	576
2B	73,87	46,8	53,2	3,18	(1/8)	36,22	542
2C	73,87	46,8	53,2	1,59	(1/16)	53,58	557
2D	73,87	46,8	53,2	1,19	(3/64)	14,82	533

Den foretrukne matricediameter på 3,18 mm (1/8-in.) til 1,59 mm (1/16-in.) giver en ønskelig høj forøgelse af hårdheden uden samtidig tab af aktivitet.

5

EKSEMPEL 3

Fremgangsmåden i eksempel 1 blev gentaget med følgende ændringer. Tre portioner af den fugtige filterkage blev individuelt blandet med 60,1 vægtprocent recirkulerede bakteriecelleaggregatfindele baseret på samlet tørstof. Alle 4 portioner blev derefter
10 ekstruderet gennem 8 åbninger med diameter på 1,59 mm (1/16-in.). Kontrolportionen (prøve 3A) blev ekstruderet ved at bruge en ikke komprimerende snegl roterende med 60 omdr/min. Den første portion (prøve 3B) blandet med findele blev ekstruderet under de samme betingelser som kontrollen. En anden portion (prøve 3C) blandet med
15 findele blev ekstruderet under anvendelse af et enkeltgevind 3:1 kompressionssnegl ved 40 omdr/min. En tredje portion (prøve 3D) blandet med findele blev ekstruderet under anvendelse af et dobbeltgevind 3:1 kompressionssnegl ved 30 omdr/min. Resultaterne er vist i den efterfølgende tabel III.

20

25

30

35

TABEL III

<u>Prøve</u>	<u>Fugtindhold</u>	<u>Vægtprocent baseret på total tørstof</u>	<u>Recirkulerede findele</u>	<u>Filterkage</u>	<u>Procent forøget hårdhed</u>	<u>Aktivitet G.I.U./gm</u>
3A (kontrol)	78,30	0	100	-		650
3B	58,11	60,1	39,9	114,58		506
3C	58,11	60,1	39,9	117,20		517
3D	58,11	60,1	39,9	178,01		484

Alle prøver med recirkulerede findelev havde ønskelige forøgelse af hårdheden under bibeholdelse af acceptable aktivitetsniveauer.

EKSEMPEL 4

5 Fremgangsmåden i eksempel 1 blev gentaget med følgende ændringer. En portion (prøve 4B) af den fugtige filterkage blev blandet med 46,8 vægtprocent recirkulerede bakteriecelleaggregatfindelev baseret på samlet tørvægt. En anden prøve (prøve 4C) blev 10 tørret ved 60°C i 10 min forud for ekstrudering. En yderligere prøve (prøve 4D) blev tørret ved 60°C i 20 min før ekstrudering. Endnu en anden del (prøve 4E) blev tørret ved 60°C i 30 minutter før ekstrudering. En slutprøve (prøve 4F) blev tørret ved 60°C i 40 min 15 før ekstrudering. En ubehandlet kontrolportion (prøve 4A) og de andre behandlede prøver blev alle ekstruderet gennem 8 åbninger med en diameter på 1,59 mm (1/16-in.) ved at anvende en ikke-komprimerende snegl med 80 omdr/min. Resultaterne er vist i den efterfølgende tabel IV.

20

25

30

35

TABEL IV

<u>Prøve</u>	<u>Fugtindhold</u>	<u>Vægtprocent baseret på total tørstof</u>	<u>Recirkulerede findele</u>	<u>Filterkage</u>	<u>Procent forøget hårdhed</u>	<u>Aktivitet G.I.U./gm</u>
4A (kontrol)	74,36	0		100	-	440
4B	61,69	46,8		53,2	58,14	440
4C	68,90	0		100	-21,65	446
4D	67,20	0		100	2,29	465
4E	65,10	0		100	9,22	471
4F	57,00	0		100	18,37	452

Det ses af de ovenfor anførte data, at alene tørring af filterkagen, uden recirkulerede findele, ikke kan præstere den forøgede hårdhed, der frembringes ved kontrolleret tilsætning af findele.

I alle de ovennævnte eksempler er recirkulerede findele tilsat den fugtige filterkage lige før ekstrudering. Det efterfølgende eksempel beskriver effekten af at tilsætte recirkulerede findele til bakteriecelleaggregater før filtrering.

EKSEMPEL 5

Fremgangsmåden i eksempel 1 blev fulgt til fremstilling af en bakteriecelleaggregatopslæmning i en opbevaringstank før filteret. Recirkulerede findele af bakteriecelleaggregat blev derefter tilsat til en portion af tankens indhold i en mængde på 30 vægtprocent baseret på den samlede tørvægt. Den resulterende blanding såvel som den ubehandlede portion blev separat filtreret, ekstruderet gennem 8 huller med en diameter på 1,59 mm (1/16-in.) under anvendelse af en ikke-komprimerende snegl med 80 omdr/min, tørret, formalet og adskilt ifølge eksempel 1. Den behandlede prøve, der fik tilført recirkulerede findele, havde en hårdhed der var 45,15% større end den ubehandlede kontrol. Det ses således, at tilsætning af recirkulerede findele af bakteriecelleaggregat efter dannelsen og før ekstrudering af et bakteriecelleaggregat væsentligt kan forbedre hårdheden af de resulterende, formede aggregatpartikler.

Bakterieaggregater fremstillet på den måde, der er beskrevet ovenfor, var alle i stand til at omdanne glucose til fructose. Glucose-isomeraseaktiviteten var ikke svækket ved brug af denne nye metode.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et formet bakteriecelle-
aggregat, hvor en bakteriecellemasse kontaktes med et tværbindings-
5 middel, k e n d e t e g n e t ved, at bakteriecellemassen kontaktes
med et tværbindingsmiddel, som er et reaktionsprodukt af (1) et
materiale udvalgt fra klassen bestående af glutaraldehyd, cyanur-
syrehalid eller kombinationer heraf og (2) en vandopløselig
10 kationpolymer opnået ved polymerisation af en epihalohydrin med en
alkylenpolyamin, der har formelen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en alkylen-
gruppe, der har fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver er
en alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet
epihalohydrin til polyamin er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken
15 polymerisation omfatter, at der med alkylenpolyaminen omsættes fra
ca. 50 til ca. 90% af den mængde epihalohydrin, der skal
polymeriseres, idet reaktionen får lov til at fortsætte, indtil
reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den
resterende portion af epihalohydrinet omsættes trinvis til opnåelse af
20 ca. 60°C til ca. 120°C, hvorpå det resulterende aggregat tilsættes en
portion tidligere fremstillet, tørret findelt bakteriecelleaggregat af
samme sammensætning med en partikelstørrelse mindre end 0,71 mm
sigtemaskestørrelse, hvorefter blandingen formes, tørres, formales og
adskilles til frembringelse af sigtede ønskede partikler med en
25 partikelstørrelse over ca. 0,71 mm sigtemaskestørrelse og partikler
med en partikelstørrelse under ca. 0,71 mm sigtemaskestørrelse, som
recirkuleres.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
at det tørrede, findelte bakteriecelleaggregat tilsættes til bakterie-
30 celleaggregatet i en mængde på op til ca. 70 vægtprocent baseret på
blandingens samlede tørstofvægt.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
at det tørrede, findelte bakteriecelleaggregat tilsættes til bakterie-
celleaggregatet i en mængde på fra ca. 5 til ca. 70 vægtprocent
35 baseret på blandingens samlede tørstofvægt.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
at det tørrede, findelte bakteriecelleaggregat tilsættes til bakterie-
celleaggregatet i en mængde på omkring 30 vægtprocent baseret på
blandingens samlede tørstofvægt.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at bakteriecellerne er af arten Streptomyces olivaceus.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at tværbindingsmidlet er fremkommet ved omsætning af fra ca. 12 til
5 ca. 77 vægtprocent af komponent (1) og fra ca. 23 til ca. 88 vægtprocent af komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive ingredienser i komponenterne (1) og (2).

10

15

20

25

30

35