
Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8006772**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze voor het desinfecteren van geïmmobiliseerde enzymen.**
- ⑤1 Int.Cl.³: A61L 2/18, C12N 11/00.
- ⑦1 Aanvrager: Corning Glass Works te Corning, New York, Ver. St. v. Am.
- ⑦2 Uitvinder(s): - -
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8006772.
- ②2 Ingediend 12 december 1980.
- ③2 Voorrang vanaf 13 december 1979.
- ③3 Land van voorrang: Frankrijk (FR).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 7930598 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 16 juli 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusies(en) en eventuele tekening(en).

VO 1228

Titel: Werkwijze voor het desinfecteren van geïmmobiliseerde enzymen

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het desinfecteren van geïmmobiliseerde enzymen, zoals geïmmobiliseerde enzymen gebruikt voor de hydrolyse van lactose tot glucose en galactose.

5 In het algemeen kan de uitvinding worden toegepast voor elk geïmmobiliseerd enzym, zolang dit niet door het desinfecteermiddel nadelig wordt beïnvloed. Gemakshalve wordt echter de navolgende uiteenzetting beperkt tot geïmmobiliseerde enzymen, gebruikt bij de hydrolytische omzetting van lactose in glucose en galactose, doch dit mag niet worden opgevat als een beperking van de
10 geest en omvang van de uitvinding.

In 1976 bereikte de Franse kaasproductie het niveau van ongeveer een miljoen ton, waarbij meer dan 6 miljoen ton wei als bijproduct werd verkregen. Dergelijke wei bevat per liter
15 ongeveer 6-9 g proteïne, 45-50 g lactose, 6-8 g minerale zouten en 1-2 g vet. Over de gehele wereld bedroeg de hoeveelheid uit wei beschikbare lactose in 1977 in totaal bijna 3,5 miljoen ton.

Wei werd in het verleden beschouwd als een afvalproduct en werd geloosd in riolen of stromen en rivieren. In verband met de
20 toenemende bezorgdheid over milieuverontreiniging werd veel wei verwerkt tot een variëteit van dierlijke en menselijke voedingsmiddelen. Zo is bij voorbeeld door de ontwikkeling van ultrafilters de mogelijkheid ontstaan om weiproteïne uit de wei af te scheiden. Dergelijk proteïne is van uitzonderlijke waarde. Zo
25 kan bij voorbeeld een 35 %'s concentraat van weiproteïne vetvrije melkpoeder in vele voedingsproducten vervangen, bij voorbeeld in bakwaren, dranken en bevroren desserts. De afscheiding van proteïnen uit wei leidt echter tot een vloeistoffractie, het zogenaamde permeaat, dat tot voor kort weinig of geen waarde had.

8006772

Door de komst van geïmmobiliseerde enzymen is echter de hydrolyse van de lactose in het permeaat, met of zonder demineralisering, commercieel haalbaar geworden. Door de aanwezigheid van glucose en galactose is gehydrolyseerde lactose veel zoeter en meer oplosbaar
5 dan lactose alleen. Het gehydrolyseerde produkt is derhalve een functionele zoetstof, die toegepast kan worden bij de bereiding van gebak, desserts op melkbasis en bevroren lekkernijen, zoals consumptie-ijs. Bovendien is het gehydrolyseerde produkt een doelmatig fermenteerbaar mengsel, dat geschikt is voor toepassing als
10 fermentatiesubstraat in bij voorbeeld de brouwerij-industrie en farmaceutische industrie.

Ook is het mogelijk de hydrolyse van de lactose in wei uit te voeren zonder een voorafgaande ultrafiltratie en met of zonder demineralisatie. Het produkt, dat nog proteïne bevat, is analoog aan
15 gehydrolyseerd permeaat en kan dan ook in de voedingsmiddelenindustrie worden toegepast, zoals reeds beschreven.

De deskundigen zijn uiteraard verschillende methoden bekend voor het hydrolyseren van lactose. Enzymatische hydrolyse is bijzonder geschikt voor de bereiding van voedingsmiddelverwante produkten
20 en de toepassing van geïmmobiliseerde enzymen is bijzonder aantrekkelijk.

Zo wordt bij voorbeeld in Biotechnol. Bioeng. 16 (1974) 295 de bereiding van geïmmobiliseerd lactase en de toepassing daarvan voor de enzymatische hydrolyse van zure wei besproken. Het van zowel
25 schimmels als gist geïsoleerde enzyme werd geïmmobiliseerd op met zirconiumoxyde beklede poreuze glasdeeltjes. Het substraat bestond uit hetzij een waterige lactoseoplossing, hetzij uit zuur weipermeaat.

In Biotechnol. Bioeng. 16 (1974) 397 wordt melding gemaakt van
30 de hydrolyse van lactose in zure wei met behulp van lactase (β -galactosidase), geïmmobiliseerd op poreuze glasdeeltjes, met de nadruk op de bereiding en karakterisering van een herhaald bruikbare katalysator voor de bereiding van zuivelprodukten met een laag lactosegehalte. Gedeeltelijk gezuiverde lactases van Aspergillus niger,

Lactobacillus helveticus en Saccharomyces Lactis werden op poreuze glasdeeltjes geïmmobiliseerd. Het substraat bestond uit zure weipoeder, dat in water tot de geschikte vastestofconcentratie was gereconstitueerd. In sommige gevallen werd de gereconstitueerde zure wei van proteïne ontdaan door verhitting in een kokend waterbad gedurende 5 minuten.

Verder wordt in Biotechnol. Bioeng. 16 (1974) 689 de bereiding beschreven van geïmmobiliseerde lactase als onderdeel van voortgezet onderzoek van de enzymatische hydrolyse van lactose. Gebruik werd gemaakt van een schimmellactase, geïmmobiliseerd op met zirconiumoxyde beklede poreus glas en poreuze titaanoxyde-deeltjes. De verkregen geïmmobiliseerde enzympreparaten werden gebruikt voor de hydrolyse van lactose in gehele zoete wei, gehele zure wei, ultrafiltraat van zure wei en zuivere lactose.

Zoals vermeld in Biotechnol. Bioeng. 16 (1974) 295 was bacteriële verontreiniging van het weisubstraat een belangrijk probleem. De kolommen raakten verstopt door de voortdurende groei van micro-organismen. Toepassing van 2 % gluteraldehyde bij een pH van 4,0 bleek de bacteriën te doden, zonder dat de activiteit van het geïmmobiliseerde enzym werd vernietigd. Ter plaatse wordt vermeld, dat in fabriekssituaties hygiënische maatregelen absoluut noodzakelijk zijn.

Het is echter duidelijk, dat commercieel mogelijke hygiënische of desinfecterende maatregelen nagenoeg alle verontreinigende micro-organismen doelmatig moeten kunnen vernietigen, zonder dat de geïmmobiliseerde enzymen merkbaar nadelig worden beïnvloed. Bovendien moet in gevallen, waarin het produkt bedoeld is voor toepassing in de voedingsmiddelenindustrie, het desinfectiemiddel dikwijls voldoen aan overheidsbepalingen.

Tot nu toe was geen werkelijk bevredigend desinfecteringsmiddel beschikbaar. Azijnzuur, dat gewoonlijk in de vorm van een verdunde waterige oplossing wordt toegepast, geeft slechts matige resultaten. Andere bekende desinfecteringsmiddelen, zoals halogeenderivaten, organische zuren, quaternaire ammoniumverbindingen,

biguanidinepolymeren en dergelijke, zijn meestal ongeschikt wegens gedeeltelijke of volledige desactivering van de enzymen.

Er bestaat derhalve een behoefte aan een commercieel uitvoerbare desinfecteringsprocedure voor geïmmobiliseerde enzymen, die
5 doelmatig is zonder dat de geïmmobiliseerde enzymen in betekenende mate nadelig worden beïnvloed.

Een doel van de uitvinding is derhalve het verschaffen van een werkwijze voor het desinfecteren van geïmmobiliseerde enzymen.

Een ander doel van de uitvinding is het verschaffen van een
10 werkwijze voor het desinfecteren van geïmmobiliseerde enzymen, waarmee nagenoeg alle verontreinigende micro-organismen doelmatig worden vernietigd, zonder dat de geïmmobiliseerde enzymen in betekende mate nadelig worden beïnvloed.

Volgens de uitvinding worden de geïmmobiliseerde enzymen in
15 aanraking gebracht met een verdunde waterige oplossing van ten minste één gesubstitueerd diethyleentriamine in een concentratie en gedurende een tijd, die voldoende zijn om nagenoeg alle verontreinigende micro-organismen te doden, zonder dat de geïmmobiliseerde enzymen in betekende mate nadelig worden beïnvloed, welk diethyleentriamine voldoet aan de op het formuleblad afgebeelde formule,
20 waarin R_1 , R_2 , R_3 , R_4 en R_5 eenwaardige groepen zijn, (1) onafhankelijk gekozen uit waterstof en octyl, met dien verstande, dat ten minste twee van de groepen R_1 , R_2 , R_3 , R_4 en R_5 octyl voorstellen en (2) waarin R_1 en R_4 waterstof voorstellen en R_2 , R_3 en R_5 onafhankelijk worden gekozen uit waterstof, benzyl en lauryl, met dien
25 verstande, dat van de groepen R_2 , R_3 en R_5 geen twee gelijk kunnen zijn.

Zoals bekend wordt lactose voor ten minste ongeveer 80 % gehydrolyseerd tot glucose en galactose, indien een lactose bevatten-
30 de waterige oplossing door een kolom wordt gevoerd, die geïmmobiliseerd lactase bevat, gewoonlijk bij een temperatuur beneden ongeveer 60°C. Het effluent kan gedeeltelijk worden geconcentreerd tot een stroop, die geschikt is als zoetmiddel in verschillende voedingsmiddelen.

De bij een dergelijke werkwijze gebruikte lactase wordt geproduceerd door een variëteit van micro-organismen, zoals schimmels, bacteriën en gisten. Schimmellactases zijn wellicht het meest gebruikelijk, bij voorbeeld lactases geïsoleerd uit Aspergillus niger en Aspergillus oryzae. Technieken voor het isoleren van lactases uit micro-organismen zijn algemeen bekend.

Immobilisering van het enzyme wordt gemakkelijk tot stand gebracht volgens verschillende bekende methoden. Voor een recent overzicht van immobiliseringstechnieken kan worden verwezen naar I. Chibata, Editor, "Immobilized Enzymes", Halsted Press, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1978, blz. 1-73. Hoewel de voor de immobilisering toegepaste methode niet kritisch schijnt te zijn, is de werkwijze volgens de uitvinding bijzonder geschikt voor toepassing met enzymen, gebonden aan in water onoplosbare dragers.

Desgewenst kunnen dergelijke dragers poreus zijn, waardoor een grote enzymebelading per eenheid van dragermassa mogelijk is. In het algemeen worden enzymen aan in water oplosbare dragers gebonden door fysische adsorptie, ionische binding, covalente binding of enige combinatie daarvan.

De in water onoplosbare dragers kunnen in het algemeen organisch of anorganisch zijn. Voorbeelden van organische dragers zijn polyester, zoals poly(ethyleentereftalaat); polyamiden, zoals nylon 6 en nylon 6.6; polyacrylaten; polymethacrylaten; polyacrylamiden; poly(acrylzuur); poly(methacrylzuur); poly(galacturonzuur); poly(aspartinezuur); etheen-maleinezuuranhydride copolymeren; polyalkenen, zoals polyetheen, polypropeen, polybuteen en polybutadieen; polystyreen; poly(aminostyreen); poly(vinylchloride); poly(vinylalcohol); poly(vinylideenchloride); cellulose en derivaten daarvan; agarosegels; dextrangels en derivaten daarvan; polysacchariden; polypeptiden; collageen; en dergelijke.

De anorganische dragers kunnen worden geclassificeerd als kiezelhoudende dragers en niet-kiezelhoudende metaaloxiden. Voorbeelden van kiezelhoudende dragers zijn glas, silica, wollastoniet, bentoniet, cordieriet en dergelijke. Voorbeelden van niet-kiezelhoudende metaaloxiden zijn alumina, spinel, apatiet, nikkeloxyde,

titaanoxyde, zirkoonoxyde, en dergelijke.

In het algemeen kan de in water onoplosbare drager elke gewenste gedaante of vorm hebben. De drager kan korrelvormig zijn, variërend van een fijnverdeeld poeder tot een grof korrelvormig
5 materiaal, of kan een continu gevormd voorwerp zijn, zoals een vlak of gekromd vel of pellet, of een drie-dimensionaal voorwerp, zoals een rechthoekige of cilindrische buis of complex monoliet. In de praktijk zal de drager echter meestal korrelvormig zijn.

Voorbeelden van methoden voor het immobiliseren van enzymen
10 op anorganische dragers zijn te vinden in de Amerikaanse octrooi-schriften 3.519.538, 3.556.945, 3.666.627 en 3.802.997.

De volgens de uitvinding te gebruiken, gesubstitueerde diethyleentriaminen en werkwijzen ter bereiding daarvan zijn bekend uit de Franse octrooischriften 2.080.797 en 2.110.303 en het Duitse
15 octrooischrift 2.115.549. Deze verbindingen bezitten biocide eigenschappen. Bij voorkeur wordt het synergistische mengsel van dioctyldiethyleentriamine en trioctyldiethyleentriamine, beschreven in het genoemde Franse octrooischrift 2.110.303 en in de handel verkrijgbaar onder de naam "Tego Diocto BS", bij de werkwijze vol-
20 gens de uitvinding toegepast.

Dergelijke gesubstitueerde diethyleentriaminen worden gebruikt in verdunde waterige oplossingen, meestal met een concentratie van 0,1-0,5 gew.%, hoewel ook grotere of kleinere concentraties kunnen worden toegepast. In het algemeen kunnen de concentratie van het
25 gesubstitueerde diethyleentriamine, het totale volume van de waterige oplossing en de duur van de desinfecteringsbehandeling binnen ruime grenzen variëren, ten minste ten dele afhankelijk van het gebruikte gesubstitueerde diethyleentriamine, de mate van de microbiële verontreiniging, de aanwezige micro-organisme(n) en de hoe-
30 veelheid geïmmobiliseerd enzyme. De behandelingsomstandigheden of parameters kunnen echter gemakkelijk door een deskundige aan de hand van eenvoudige proeven worden bepaald. In de meeste gevallen is een behandeling gedurende 15-30 minuten met 5-10 liter van een 0,1 gew. %'s desinfecterende oplossing van bij voorbeeld Tego
35 Dioctyl BS per kg geïmmobiliseerd enzyme bevredigend gebleken.

In een uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt het geïmmobiliseerde enzyme eenvoudig in een bad van de desinfecterende oplossing geplaatst. Desgewenst kan het bad worden geschud, geroerd, omgepompt of op andere wijze in beroering worden gebracht.

5 In een andere uitvoeringsvorm wordt de desinfecterende oplossing door een kolom of reactor gecirculeerd, die het geïmmobiliseerde enzyme bevat. Bij voorkeur geschiedt de circulatie van de desinfecterende oplossing in de richting, tegengesteld aan de stroming van de toevoeroplossing door de kolom of reactor. Indien
10 het enzyme is geïmmobiliseerd op een korrelvormige drager en indien de kolom- of reactorconstructie zulks toelaat, is het wenselijk, dat de stroomsnelheid van de desinfecterende oplossing zodanig is, dat de geïmmobiliseerde enzymdeeltjes worden geïmmobiliseerd. De fluidisatie voorkomt kanaalvorming en verzekert een
15 volledig contact van het geïmmobiliseerde enzyme met desinfecterende oplossing.

Het verdient opmerking, dat elke desinfecterende oplossing enige malen kan worden gebruikt, teneinde de kosten van de desinfecterende behandeling te reduceren. Indien de desinfecterende
20 oplossing wordt gerecirculeerd, kunnen echter aanvullende behandelingen gewenst of nodig zijn, bij voorbeeld filtratie ter verwijdering van celresten of aanpassing van de pH.

In een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding kunnen de gesubstitueerde diethyleentriaminen worden opgenomen in de toevoer-
25 oplossing, die door het geïmmobiliseerde enzyme moeten worden behandeld. Op deze wijze kan microbiële verontreiniging van de geïmmobiliseerde enzyme tot een minimum worden beperkt of zelfs geheel worden voorkomen. Uiteraard kan een dergelijke preventieve behandeling op zichzelf worden toegepast of in combinatie met een
30 der beschreven desinfecteringsprocedures.

De uitvinding wordt aan de hand van de volgende voorbeelden nader toegelicht.

Voorbeeld I

Desinfectie van een reactor, geladen met geïmmobiliseerde lactase, afkomstig van A. niger, en gebruikt voor de hydrolyse van weipermeaat

- 5 Na grondig spoelen met water, teneinde organisch materiaal zoveel als mogelijk te verwijderen, werd een kolom, die geladen was met 45 kg geïmmobiliseerde, van A. niger afkomstige lactase, bereid door binding van het enzyme aan een korrelvormige silica-drager op de in het Amerikaanse octrooischrift 3.519.538 beschreven
10 wijze, gedurende ongeveer 20 min. behandeld door doorvoer door de kolom in omgekeerde stroomrichting van een waterige 0,1 gew. %'s oplossing van Tego Diocto BS in een hoeveelheid van 1000 liter per uur. Vervolgens werd de kolom met water gespoeld.

- Telling van het aantal micro-organismen in het waswater
15 vóór en na de desinfecteringsbehandeling gaf de in tabel A vermelde resultaten.

TABEL A

	Voor	Na	Behandelings- rendement (1)
20 Totaal micro-organismen	470.000	6.000	98,7 %
Gisten en schimmels	1.550	65	95,8 %

$$(1) \frac{\text{voor} - \text{na}}{\text{voor}} \times 100$$

Deze resultaten tonen duidelijk de germicide werking van het gebruikte desinfecteringsmiddel.

25 Voorbeelden II-IIIVergelijkende proeven

- Er werden twee proeven uitgevoerd onder industriële omstandigheden, tijdens het bedrijf van de reactor of kolom van voorbeeld I met het geïmmobiliseerde enzyme. De toevoeroplossing bestond uit
30 weipermeaat met een pH van 3,5, waarbij de daarin aanwezige lactose werd gehydrolyseerd tot glucose en galactose. De kolom- of reactor-temperatuur werd op 38°C gehouden. Tijdens de proeven werd de verontreiniging van het effluent en de activiteit van de geïmmobiliseerde lactase dagelijks gemeten.

In de eerste proef, voorbeeld II, werd de reactor op de in voorbeeld I beschreven wijze gedesinfecteerd met Tego Diocto BS. Vervolgens werd de reactor dagelijks gedurende 30 minuten behandeld met 500 liter van een 0,1 gew. %'s waterige oplossing van azijn-
 5 zuur, die in een hoeveelheid van 1000 liter per uur door de reactor werd gevoerd.

In de tweede proef, voorbeeld III, die na de eerste proef werd uitgevoerd, werd de reactor opnieuw op de in voorbeeld I beschreven wijze gedesinfecteerd met Tego Diocto BS. Vervolgens werd de
 10 reactor dagelijks behandeld met Tego Diocto BS onder dezelfde omstandigheden als de eerste desinfectie, behalve dat tevoren niet werd gespoeld.

De verontreiniging van het effluent, weergegeven als het aantal micro-organismen per cm^3 , is vermeld in tabel B, en de activiteit
 15 van de geïmmobiliseerde lactase, uitgedrukt als Internationale Eenheden per g geïmmobiliseerd enzyme, is vermeld in tabel C.

<u>TABEL B</u>		
<u>Dag</u>	<u>Totaal micro-organismen/cm³</u>	<u>Gisten/cm³</u>
<u>Voorbeeld II</u>		
20 1	Eerste desinfectie van de reactor	
2	180.000	150.000
3	980.000	780.000
4	1.200.000	800.000
5	1.390.000 (1)	940.000
25	<u>Voorbeeld III</u>	
6	Tweede desinfectie van de reactor	
7	510	200
8	1.500	800
9	3.300	1.100
30 10	5.800	1.100
11 en volgende	Voortzetting van de behandeling (2)	

- (1) Proef gestaakt wegens overmatige verontreiniging
 (2) Verdere behandeling bevestigde de vermindering van de veront-
 35 reiniging als gevolg van de werkwijze volgens de uitvinding

TABEL C

<u>Dag</u>	<u>Activiteit, I.E./g</u>	<u>Gemiddelde activiteit, I.E./g</u>
<u>Voorbeeld II</u>		
	1 Eerste desinfectie van de reactor	
5	2 159	
	3 184	
	4 165	
	5 168	169
<u>Voorbeeld III</u>		
10	6 Tweede desinfectie van de reactor	
	7 161 (1)	
	8 189	
	9 176	
	10 188	
15	11 204	
	12 198	186

(1) De activiteit was afwijkend door stromingsproblemen

De voorbeelden II en III tonen duidelijk, dat door de werkwijze volgens de uitvinding de microbiële verontreiniging veel doelmatiger (met een factor van ten minste 10^3) wordt bestreden dan door toepassing van azijnzuur. Tevens is de werkwijze volgens de uitvinding veel minder schadelijk voor het geïmmobiliseerde enzyme. Tego Diocto BS heeft in concentraties van 0,1-0,5 gew. % geen invloed op de enzymatische activiteit van oplosbaar lactase, afkomstig van A. niger, d.w.z. op het niet geïmmobiliseerde enzyme.

De voorbeelden II en III tonen derhalve duidelijk, dat de werkwijze volgens de uitvinding een uitstekende desinfecteringsbehandeling voor reactors met geïmmobiliseerd enzyme is.

Voorbeeld IV

30 Onderzoek van het effect van de werkwijze volgens de uitvinding op geïmmobiliseerd, van A. oryzae afkomstig lactase, gebruikt voor de hydrolyse van lactose

A. Variatie van de enzymatische activiteit met de tijd

De variatie van de enzymatische activiteit van geïmmobiliseerd, van A. oryzae afkomstig lactase werd onder laboratoriumomstandighe-

den bepaald voor elk van drie verschillende gevallen: (1) gebruik van het geïmmobiliseerde lactase voor de hydrolyse van een lactose-oplossing met een pH van 4,2 en een temperatuur van 35°C (referentieproef); (2) gebruik van het geïmmobiliseerde lactase na desinfectie in de geïmfluidiseerde toestand gedurende 30 min. met een 0,1 gew.-%'s oplossing van Tego Diocto BS, voor de hydrolyse van de zelfde lactoseoplossing als in de referentieproef werd gebruikt; en (3) gebruik van het geïmmobiliseerde lactase van de referentieproef voor de hydrolyse van een lactoseoplossing met een pH van 4,5 en een temperatuur van 35°C, welke oplossing tevens 0,1 gew.-% Tego Diocto BS bevat. De resultaten zijn samengevat in tabel D.

TABEL D

Tijd, uren	Enzymatische activiteit, I.E./g.		
	Geval 1	Geval 2	Geval 3
15 2	114	114	125
3	120	114	125
4	129	119	134
5	124	117	132
Gemiddeld	121	116	129

20 Deze resultaten tonen, dat de enzymatische activiteit van het geïmmobiliseerde lactase nagenoeg niet wordt beïnvloed door contact met de desinfecterende oplossing en dat de hydrolyse van lactose zelfs in tegenwoordigheid van het desinfecteringsmiddel normaal verloopt.

25 B. Vergelijking van de effecten van herhaalde behandelingen

De proeven werden in de loop van vijf dagen uitgevoerd. Elke dag werd de lading geïmmobiliseerd, van A. oryzae afkomstige lactase gedurende 16 uren gebruikt voor de hydrolyse van een lactose-oplossing bij een pH van 4 en een temperatuur van 35°C. Vervolgens werd de lading gedurende 30 min. in geïmfluidiseerde toestand behandeld met hetzij een 1 gew.-%'s azijnzuuroplossing (referentieproef), hetzij een 0,1 gew.-%'s oplossing van Tego Diocto BS (proef volgens de uitvinding). De resultaten zijn vermeld in tabel E.

TABEL E

Tijd, dagen	Enzymatische activiteit, I.E./g	
	<u>Referentieproef</u>	<u>Proef volgens de uitvinding</u>
1	143	135
5 2	144	151
3	139	127
4	155	144
5	126	124

De resultaten tonen, dat de twee behandelingen geen signifi-
10 cante verschillen in enzymatische activiteit opleveren.

De toepassing van de werkwijze volgens de uitvinding als een
routinebehandeling voor geïmmobiliseerd, van A. oryzae afkomstige
lactase kan echter worden aanbevolen. Zoals eerder aangetoond, zijn
de desinfecteringsmiddelen, die bij de werkwijze volgens de uitvin-
15 ding worden toegepast, veel doelmatigere germiciden dan azijnzuur.
Bovendien heeft de werkwijze volgens de uitvinding duidelijk geen
nadelige effecten op geïmmobiliseerde, van A. oryzae afkomstige
lactase.

Hoewel de uitvinding primair is beschreven met betrekking tot
20 de desinfectie van geïmmobiliseerde lactase, zal duidelijk zijn,
dat zij ook kan worden toegepast voor andere geïmmobiliseerde enzy-
men. Zo worden bij voorbeeld bepaalde geïmmobiliseerde enzymsyste-
men gebruikt in de voedingsmiddelenindustrie en in de farmaceuti-
sche industrie, zoals geïmmobiliseerde glucoamylase, glucose isome-
25 rase en penicilline acylase.

Het volgende voorbeeld toont de toepassing van de werkwijze
volgens de uitvinding voor het desinfecteren van een geïmmobiliseer-
de glucose isomerase, die gebruikt wordt voor omzetting van glucose
in fructose.

30 Voorbeeld V

Glucose isomerase werd op de in het Amerikaanse octrooi-
schrift 3.868.304 beschreven wijze geïmmobiliseerd op een alumina-
drager. Dit systeem is gevoelig voor variaties in de osmotische druk
van het waterige medium, waarin het aanwezig is. Het systeem wordt

industrieel toegepast ter verkrijging van fructose uit glucose-oplossingen, die in totaal 45-50 % vaste stof bevatten en een pH van ongeveer 8,4 en een temperatuur van ongeveer 60°C hebben.

Door laboratoriumproeven, waarbij industriële omstandigheden werden nagebootst, werden de volgende parameters bestudeerd:

A. Het verlies van enzymatische activiteit bij spoelen met water bij een pH van 8,4 en een temperatuur van 60°C;

B. het verlies van enzymatische activiteit bij de behandeling bij dezelfde pH en temperatuur met een 0,1 gew.-%'s waterige oplossing van Tego Diocto BS.

De enzymatische activiteit werd dagelijks bepaald op basis van 16 uren continue fructoseproductie. De verkregen gegevens zijn samengevat in tabel F.

TABEL F

Parameter	Dag	Reactor-output, cm ³ /uur	% Omzetting (1)	Activiteit, I.E./g
A	1	73	39	169
		Spoelen met water gedurende 90 minuten		
	2	72,6	32	116
B	1	77	40	189
		Behandeling met desinfectans gedurende 90 minuten		
	2	77	33	128
(1) Percentage glucose in de toevoeroplossing, omgezet in fructose				

In beide gevallen werd een verlies van enzymatische activiteit van ongeveer 30 % waargenomen. Dit verlies werd veroorzaakt door de desorptie en elutie van het enzyme uit de alumina drager, wanneer het geïmmobiliseerde enzyme werd blootgesteld aan een meer verdunde oplossing met een aanmerkelijk grotere osmotische druk. Er kan derhalve geen waarneembare daling van de enzymatische activiteit worden toegeschreven aan de behandeling van het geïmmobiliseerde enzyme met desinfectants.

Uiteraard dient de voorgaande gedetailleerde beschrijving

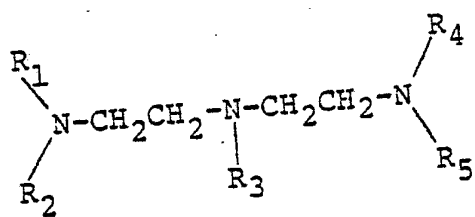
slechts als voorbeeld. Vele variaties zijn mogelijk, zonder dat buiten het kader van de geest en de omvang van de uitvinding wordt getreden. Zo wordt onder "geïmmobiliseerde enzymen" een enkel op een geschikte drager geïmmobiliseerd enzyme verstaan, alsook een
5 enkel enzymtype, geïsoleerd uit twee of meer bronnen, of twee of meer enzymtypen, op analoge wijze geïmmobiliseerd. In het laatstbedoelde geval kunnen de verschillende enzymen op dezelfde drager geïmmobiliseerd zijn, maar ook op verschillende dragers, die vervolgens voor het gebruik zijn gemengd.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het desinfecteren van geïmmobiliseerde enzymen, met het kenmerk, dat de geïmmobiliseerde enzymen in aanraking worden gebracht met een verdunde waterige oplossing van ten minste één gesubstitueerd diethyleentriamine in een concentratie en gedurende een tijd, die voldoende zijn om nagenoeg alle verontreinigende microorganismen te doden zonder aanmerkelijk nadelig effect op de geïmmobiliseerde enzymen.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het diethyleentriamine voldoet aan de op het formuleblad afgebeelde formule, waarin R_1 , R_2 , R_3 , R_4 en R_5 eenwaardige groepen voorstellen, (1) onafhankelijk gekozen uit waterstof en octyl, met dien verstande, dat ten minste twee van de groepen R_1 , R_2 , R_3 , R_4 en R_5 octyl moeten zijn, en (2) waarin R_1 en R_4 waterstof voorstellen en R_2 , R_3 en R_5 onafhankelijk worden gekozen uit waterstof, benzyl en lauryl, met dien verstande, dat van de groepen R_2 , R_3 en R_5 geen twee gelijk zijn.
3. Werkwijze volgens conclusies 1-2, met het kenmerk, dat als gesubstitueerd diethyleentriamine dioctylethyleentriamine en/of triocetyl-diethyleentriamine wordt gebruikt.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat de verdunde waterige oplossing zowel dioctyl-diethyleentriamine als triocetyl-diethyleentriamine bevat.
5. Werkwijze volgens conclusies 1-4, met het kenmerk, dat de enzymen zijn geïmmobiliseerd op een korrelvormige drager.
6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat de geïmmobiliseerde enzymen zich bevinden in een reactor met een kolomvormige configuratie en de verdunde waterige oplossing door de kolom wordt gevoerd in een richting, tegengesteld aan die van de toevoeroplossing, onder zodanige omstandigheden dat het korrelvormige geïmmobiliseerde enzyme wordt geïmmobiliseerd.
7. Werkwijze volgens conclusies 1-6, met het kenmerk, dat een of meer van de gesubstitueerde diethyleentriaminen in de toevoeroplos-

sing wordt opgenomen.

8. Werkwijze volgens conclusies 1-7, met het kenmerk, dat de enzymen zijn geïmmobiliseerd op een korrelvormige anorganische drager en gekozen worden uit lactase en glucose isomerase.



8006772