

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 151636 B



(21) Patentansøgning nr.: 5406/81

(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 11/08

(22) Indleveringsdag: 07 dec 1981

(41) Alm. tilgængelig: 09 jun 1982

(44) Fremlagt: 21 dec 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 08 dec 1980 US 214218

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

(72) Opfinder: Donald Frederick *Hershberger; US, Moshe M. *Sternberg; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) **Fremgangsmåde til immobilisering af en enzymproducerende mikroorganisme eller det af denne producerede enzym**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

SAMMENDRAG.

5406-81

En enzymproducerende mikroorganisme eller det af denne producerede enzym immobiliseres ved, at man fremstiller et reaktionsprodukt på den måde, at man bringer et vandigt medium indeholdende enzymet eller en masse af bakterieceller med biokatalytisk aktivitet i kontakt med tannin, et kationisk flokkuleringsmiddel i form af en langkædet polyamin og et tværbindingsmiddel, og at man skiller reaktionsproduktet fra det vandige medium.

Reaktionsproduktet er meget hårdere end de ved de kendte metoder fremstillede produkter, og den biokatalytiske aktivitet af det immobiliserede materiale påvirkes ikke.

DK 151636 B

0

Anvendelsen af enzymer hidrørende fra mikrobielle celler til gennemførelse af specifikke kemiske omdannelser er velkendt. Ved gennemførelsen af sådanne omdannelser kan der som kilden til biokatalysator anvendes det cellefri en-
5 zympræparat, sprængte celler eller hele celler. Det fri en-
zym eller cellerne kan anvendes effektivt ved processer af batch-typen, men er ikke anvendelige til kontinuerlige pro-
cesser i industriel målestok. Denne vanskelighed har ført til en forøget interesse for fremstillingen af forskelli-
10 ge former for immobiliserede enzymer.

I USA-patentskrift nr. 3.779.869 (patent udstedt d. 18. december 1973) beskrives stabiliseringen af glucose-isomeraseaktivitet ved behandling af hele bakterieceller med glutaraldehyd. Anvendelsen af glutaraldehyd til immo-
15 bilisering af sprængte celler til tilvejebringelse af et ko-
hærent, fast produkt med glucoseisomeraseaktivitet er be-
skrevet i USA-patentskrift nr. 3.980.521 (patent udstedt d. 14. september 1976).

USA-patentskrift nr. 4.060.456 (patent udstedt d. 29. november 1977) omhandler stabiliseringen af mikrobi-
20 elt cellemateriale med glucoseisomeraseaktivitet ved be-
handling heraf med et kationisk, polyelektrolyt-flokku-
leringsmiddel, f.eks. en polyethylenimin eller polyvinyl-
pyrrolidon. Anvendelsen af polyelektrolyter såsom polyami-
25 ner og kationiske polyacrylamider ved stabiliseringen af
mikrobielle celler med aktive enzymer associeret dermed er
beskrevet i USA-patentskrift nr. 3.989.596 (patent udstedt d. 2. november 1976).

Ono et al. beskriver i Agric. Biol. Chem., 42 (10),
30 1847-1853 (1978) immobiliseringen af naringinase fra As-
pergillus niger ved adsorption af enzymet til tannin-amino-
hexylcellulose fremstillet ved omsætning af aminoethylcel-
lulose med cyanogenbromid-aktiveret kinesisk gallustan-
nin.

35 Ohba et al. beskriver i Biotechnology and Bioengi-
neering, Vol. XX, pp. 665-676 (1978), at pullulanase med

0

held kan immobiliseres ved tilsætning af garvesyre til kurturfiltratet af termofil *Streptomyces flavochromogenes* til dannelse af et tannin-pullulanase-addukt, som derefter kan bindes til TEAE-cellulose.

5

I USA-patentskrift nr. 4.212.943 (patent udstedt d. 15. juli 1980) er der beskrevet et bakteriecelleaggregat med forøget partikelhårdhed, som fremstilles ved at bringe en bakteriecellemasse i kontakt med et tværbundet reaktionsprodukt af glutaraldehyd eller cyanursyrehalogenid og en kationisk polymer fremstillet ved polymerisation af en epihalohydrin og en alkylenpolyamin.

10

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til immobilisering af en enzymproducerende mikroorganisme eller det af denne producerede enzym, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man fremstiller et reaktionsprodukt på den måde, at man (a) bringer et vandigt medium indeholdende enzymet eller en masse af bakterieceller med biokatalytisk aktivitet i kontakt med tannin, et kationisk flokkuleringsmiddel i form af en langkædet polyamin og et tværbindingsmiddel, og at man (b) skiller reaktionsproduktet fra det vandige medium og, om ønsket, efterbehandler dette.

15

20

Den her omhandlede immobiliseringsteknik har vist sig at tilvejebringe et meget hårdere reaktionsprodukt end de relevante, kendte metoder, idet den biokatalytiske aktivitet af det immobiliserede materiale ikke påvirkes. Den uventede forbedring af fysisk styrke, som tilvejebringes med den foreliggende opfindelse, afbøder problemer, der opstår med svagere systemer, når disse anvendes i udstrakte tidsrum i en kolonnelagsreaktor, eftersom materialer med mindre styrke har tendens til blødgøring eller opsvulmning, hvilket kan resultere i strømningsbegrænsning eller tilstopning og/eller kanaldannelse.

25

30

Det biokatalytiske materiale, der skal immobiliseres ved den her omhandlede fremgangsmåde, kan være et helt fermenteringsudbytte eller et filtrat derfra eller et partielt rensed materiale afledt deraf. Hele eller spræng-

35

0

te celler samt fri enzymer kan immobiliseres under anvendelse af det her omhandlede system.

5

Det kationiske flokkuleringsmiddel i form af en langkædet polyamin kan hensigtsmæssigt omsættes med et overskud af tværbindingsmiddel til dannelse af et tværbindingsmiddel-flokkuleringsmiddel-addukt inden deres kontakt med biokatalysatoren.

10

Egnede kationiske polyamin-materialer er polyacrylamid, polyethylenimin, poly-(2-hydroxypropyl-1-N-methylammoniumchlorid), poly-(2-hydroxypropyl-1,1-N-dimethylammoniumchlorid), poly-(N-(dimethylaminomethyl)-acrylamid), poly-(diallyldimethylammoniumchlorid), poly-(N,N-dimethylaminoethyl-methacrylat) eller poly-(N-dimethylaminopropyl)-methacrylamid.

15

20

Et på grund af dets godtgjorte kompatibilitet med næringsmiddelbehandling foretrukket flokkuleringsmiddel er en epihalohydrin-polyamin-copolymer, der er kommercielt tilgængelig under varemærket BETZ 1180 fra Betz Laboratories, Inc., Trevose, Pennsylvania. BETZ 1180 har en molekylvægt på under 1 million, indeholder ca. 0,288 millimol aminogrupeer pr. gram opløsning (baseret på en ninhydrinbestemmelse) og markedsføres som en opløsning indeholdende 30 vægtprocent faste stoffer, beregnet på totalvægten af opløsningen. Denne forbindelse er beskrevet i USA-patentskrifterne nr. 3.915.904 og nr. 953.330. Forbindelsen beskrives dér som en vandopløselig, kationisk polymer fremstillet ved polymerisation af en epihalohydrin med en alkylpolyamin med formlen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en lavere alkylengruppe med fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver for sig betyder en lavere alkylgruppe med fra ca. 1 til ca. 6 carbonatomer, idet molforholdet mellem epihalohydrin og polyamin ligger fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvorhos polymerisationen omfatter omsætning af alkylpolyaminen med fra ca. 50 til ca. 90 procent af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, hvorpå reaktionen får lov at fortsætte, indtil reaktionsmediet når en praktisk taget ensartet viskositet, og

35

0

den resterende del af epihalohydrinen omsættes portionsvis til dannelse af den kationiske polymer, idet polymerisationstemperaturen ligger fra ca. 60 til ca. 120°C.

Egnede tværbindingsmidler omfatter multifunktionelle aldehyder såsom glutaraldehyd eller dialdehydstivelse, multifunktionelle organiske halogenider såsom cyanursyrechlorid eller 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen, multifunktionelle anhydrider såsom pyromellitsyreanhydrid eller en ethylen-maleinsyreanhydrid-copolymer, multifunktionelle azo-
forbindelser såsom diazobenzidin, multifunktionelle isocyanater såsom hexamethylendiisocyanat, multifunktionelle isothiocyana-
ter såsom 4,4'-β-diisothiocyantobiphenyl-2,2'-disulfonsyre og dehydrative kondensationsreaktionsmidler såsom ethylchlorformiat, Woodward's reagent K, N,N'-dicyclohexylcarbodiimid eller N-hydroxysuccinimid. Tværbinding
kan gennemføres ved særskilt tilførsel af flokkuleringsmidlet og tværbindingsmidlet til det biokatalysatorholdige medium, eller, som nævnt ovenfor, fortrinsvis ved en forreaktion, ved hvilken der tilvejebringes et addukt til til-
sætning til mediet. Reaktionspotential for det materiale, der skal immobiliseres, versus tværbindingsmidlet bør bestemmes, fordi overskud af tværbindingsmiddel kan resultere i tab af biokatalytisk aktivitet eller unødvendige omkostninger. Når der anvendes et multifunktionelt aldehyd som tværbindingsmiddel, anvendes der en procedure betegnet formol-titrering til bestemmelse af reaktiviteten med aldehyd. Denne procedure, der indikerer mængden af let reagerbart aminindhold i det materiale, der skal immobiliseres med aldehyd, udføres som følger:

30

En portion på 1 dl af materialet anbringes i et 250 ml bægerglas. Der tilsættes fra 50 til 75 ml vand til fortynding af materialet med henblik på let omrøring. Der anvendes en magnetomrører, og materialet indstilles på en pH-værdi på 8,5 under anvendelse af et pH-meter og natriumhydroxidopløsning. Når pH-værdien er stabil ved 8,5 (idet der gives nogle minutter til intracellulær udveks-

35

0

ling), tilsættes der 3,0 ml 37%'s (vægt/vægt) formaldehyd af reagenskvalitet, stabiliseret med 10-15% (vægt/vægt) methanol. pH-værdien falder derpå på grund af omsætning mellem de frie aminergrupper med aldehydet.

5

Ved anvendelse af en standardopløsning af natriumhydroxid, f.eks. en 1,0 N opløsning, bringes pH-værdien tilbage til 8,5 og opretholdes, indtil den er stabil i 5 minutter (der kræves en samlet tid på ca. 20 til ca. 25 minutter). Den mængde alkali, der kræves, er formol-

10

-titreringsværdien udtrykt som meq/dl.

15

Mængden af ønsket flokkuleringsmiddel til den maksimale aggregering af materialet bestemmes ved en foretrukken fremgangsmåde. Der anvendes en trinvis tilsætningsteknik, og den maksimale flokkulering verificeres ved yderligere tilsætninger til supernatanter opnået ved centrifugering af det flokkulerede materiale. En pH-værdi nær neutralpunktet er sædvanligvis bedst til denne bestemmelse, skønt nogen variation kan tillades, såfremt der er begrænsninger på grund af biokatalysatorens stabilitet.

20

Det materiale, der skal flokkuleres, kan være materialet som sådant eller efter tannin-tilsætning og/eller tilsætning af tværbindingsmiddel. Flokkuleringsmidlet kan være en polyamin eller reaktionsproduktet af polyaminen med tværbindingsmiddel. Den optimale fremgangsmåde bør være baseret på resultaterne af den følgende procedure til bestemmelse af flokkuleringsmiddel-krav til opnåelse af maksimal flokkulering og adskillelighed af den ønskede biokatalysator fra den uvedkommende væske.

25

30

Der udtages en portion på 500 ml af det materiale, der skal flokkuleres, og dets pH-værdi indstilles på 7,0 med 2 N natriumhydroxidopløsning eller med 2 N saltsyreopløsning. Flokkuleringsmidlet tilsættes dernæst gradvis i en kendt mængde, idet pH-værdien holdes på 7. Der fortsættes med tilsætningen, indtil flokkulering opnås, og blandingen får lov at blive omrørt i ca. 10 minutter. Der udtages små prøver (to prøver på hver 1,7 ml), som centri-

35

0

fugeres ved 10.000 G i 5 minutter. Supernatanterne hældes af i små reagensglas.

Der foretages en yderligere lille tilsætning af flokkuleringsmiddel til én af supernatanterne, idet der
5 blandes og observeres omhyggeligt. Såfremt der iagttages yderligere flokkulering, sættes der mere flokkuleringsmiddel til hovedportionen under omrøring og opretholdelse af en pH-værdi på 7 (denne tilsætning bør være 10 eller 20% af den først tilsatte mængde). Efter 10 minutters blanding
10 gentages prøveudtagningen og centrifugeringen.

Denne proces gentages, indtil der ikke længere iagttages nogen yderligere flokkulering ved yderligere tilsætning af flokkuleringsmiddel til supernatanten. Når flokkuleringsmidlet er i overskud, kan den anden udtagede prøve af supernatanten kontrolleres ved tilsætning af en lille
15 mængde af de oprindelige materialer, der skulle flokkuleres, eller ved tilsætning af fortyndet tanninopløsning.

Ved denne procedure opnås der en god bedømmelse af den optimal mængde flokkuleringsmiddel, der skal anvendes. Hvis biokatalysatoren er et opløseligt, extra-cellulært stof, kan proceduren varieres med hensyn til
20 pH-værdi og kontrol af supernatanterne for biokatalytisk aktivitet, eftersom maksimal udfældning af biokatalysatoren ikke behøver at falde sammen med maksimal aggregering af hovedparten af materialet.
25

Den her anvendte betegnelse "tannin" omfatter såvel den hydrolyserbare som den kondenserede type. Egnede tanninkilder er træet eller barken af kastanien og frø-
kappen af pekan samt mandelskaller. Quebracho er den foretrukne kilde til tannin, hvilket skyldes økonomiske grunde.
30 Udover quebracho-tannin er garvesyre (molvægt 3100-3400), gambir-tannin (molvægt ca. 520) og myrobalan-tanniner (molvægt 1900) egnede.

Ved udvælgelse af den bestemte tannin, der skal anvendes,
35 er det ønskeligt at bestemme de relative støkiometriske forhold for det polykationiske flokkuleringsmid-

0

del og tannin med hensyn til deres co-flokkulering og reaktivitet med tværbindingsmidlet.

Polyamin-flokkuleringsmidlets aktivitet med aldehyd kan bestemmes ved en lille modifikation af den for-
an beskrevne formol-titreringsmetode. I stedet for en
5 prøve på 1 dl af flokkuleringsmiddel skal der anvendes en portion på 3 ml (eller gram), og denne fortyndes med vand til 150-175 ml. Resten af proceduren er den samme, idet den endelige titer udtrykkes som meq/ml eller gram
10 flokkuleringsmiddel.

Co-flokkuleringsækvivalentet af tannin for flokkuleringsmidlet bestemmes ved en modifikation af den ovenfor beskrevne procedure til bestemmelse af den optimale mængde flokkuleringsmiddel. 1 ml (eller gram) flokkuleringsmiddel fortyndes til 500 ml med vand, og pH-værdien indstilles på 7 med 2 N natriumhydroxidopløsning eller med 2 N saltsyreopløsning. Under opretholdelse af en pH-værdi på 7 under omrøring foretages tilsætningen af en 4 g/dl-opløsning af tannin ud fra en kendt mængde, indtil
15 udfældning sker. Efter 10 minutter udtages der to prøver på hver 1,7 ml, og de centrifugeres ved 10.000 G i 5 minutter. Supernatanterne udhældes i små reagensglas, og der foretages yderligere små tilsætninger af fortyndet flokkuleringsmiddel eller af tanninopløsningen, idet
25 der observeres for udfældning til bestemmelse af det materiale, der er i overskud i opløsningen, tannin eller flokkuleringsmiddel. Tilsætningerne fortsættes, indtil den yderligere tilsætning af tanninopløsning ikke giver nogen yderligere fældning. Den tilsatte mængde tannin kan
30 derpå udtrykkes som ækvivalent til co-flokkulering af 1 ml (eller gram) flokkuleringsmiddel.

Når flokkuleringsmidlet anvendes som dets reaktionsprodukt med tværbindingsmidlet, vil flokkuleringsstyrken være noget reduceret i forhold til det uomsatte materiale. Tanninækvivalentet kan bestemmes direkte ved
35 anvendelse af reaktionsproduktet ved den ovenfor omtalte procedure.

0

Anvendelsen af de ovenfor omtalte titreringsmetoder til bestemmelse af mængderne af reagens ville være ønskelige forud for immobiliseringen af kommercielt passende mængder af biokatalysatoren. Når deres anvendelse ikke er praktikabel, kan der imidlertid opnås en tæt tilnærmelse til de optimale mængder ved anvendelse af 0,5-1,0 g tannin pr. liter, 1,0-1,5 g flokkuleringsmiddel pr. liter og 0,7-2,5 g tværbindingsmiddel pr. liter for hver 10 gram pr. liter af materiale, der kan udvindes fra det vandige medium ved flokkulering.

10

Den her omhandlede fremgangsmåde til biokatalysator-immobilisering har vist sig at være effektiv, uafhængigt af, om biokatalysatoren er i form af hele celler, sprængte celler eller frit enzym. Enzymproducerende mikroorganismer (og af disse producerede enzymer), der kan immobiliseres ved fremgangsmåden, omfatter *Streptomyces olivaceus*, *S. griseus*, *S. olivochromogenes*, *S. phaeochromogenes*, *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. awamori*, *B. subtilis*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae* og *Protaminobacter rubrum*.

20

Den praktiske udførelse af den her omhandlede fremgangsmåde belyses nærmere i de følgende eksempler.

Eksempel 1

25

Biokatalysatorpartikler fra fermentationsfiltrat (opløseligt enzym)

30

Et rekonstitueret glucoamylase-filtrat fremstilles ved opløsning af 30 g pulverformigt glucoamylasepræparat i 2000 ml vand. En portion på 1900 ml af den resulterende opløsning flokkuleres med 11 ml af en 5 g/dl-opløsning af polyethylenimin i vand ved en pH-værdi indstillet på 7 ved anvendelse af eddikesyre. Denne mængde polyethylenimin (PEI) er i 20%'s overskud i forhold til den mængde, der er bestemt som værende nødvendig til flokkulering.

35

0 Til den flokkulerede opslæmning sættes der 9,6 ml af en 4 g/dl-opløsning af garvesyre (NR-kvalitet) i vand. Dette er den mængde garvesyre, der findes at være ækvivalent til flokkulering af det anvendte overskud af PEI.

5 Glutaraldehyd (3 meq) tilsættes som en fortynding af 0,6 ml 25%'s (w/w) glutaraldehydopløsning i ca. 100 ml vand. Denne mængde er baseret på det støkiometriske krav som bestemt ved formol-titrering.

10 Den endelige pH-værdi indstilles på fra 6,5 til 7,5 under anvendelse af en 1 N natriumhydroxidopløsning, og efter 1 times henstand ved stuetemperatur udvindes de aggregerede faste stoffer ved centrifugering ved ca. 10.000 x G i 15 minutter. De fugtige faste stoffer ekstruderes derpå, og de spaghettiformede partikler tørres i en vakuumovn med en svag indtagning af luft ved 50°C
15 i 16 timer. Det fremkomne, tørrede ekstrudat opbrydes i partikler. Partiklerne viser sig at indeholde den ønskede biokatalytiske aktivitet (glucoamylase), når de anbringes i en opløsning af 1 g/dl af maltose i 0,1 M natriumacetatpuffer ved en pH-værdi på 4,2 ved 50°C. Den biokatalytiske aktivitet bestemmes ved en forøgelse i koncentrationen af glucose i substratet som bestemt ved kontrol med DEXTROSTIX[®] - reagensstrimler. Glucosekoncentrationen stiger fra ca. 0 mg/dl til 20 mg/dl i løbet af 2 minutter ved stuetemperatur i en blanding af 50 ml substrat
20 med 200 mg af biokatalysatoren. Blandingen inkuberes derpå under omrøring ved 50°C. Efter 40 minutter er glucosekoncentrationen større end 250 mg/dl.

25 Partiklerne filtreres, vaskes og overføres til en frisk portion af det ovenfor beskrevne substrat, hvor de igen udviser den ønskede biokatalytiske aktivitet, ved hvilken glucosekoncentrationen forøges til mere end 250 mg/dl i løbet af 40 minutter. Et inkuberet kontrolsubstrat viser en værdi på ca. 0 mg/dl i løbet af 40 minutter.
30 Ved fortsat ophold i substratet bibeholder partiklerne deres fysiske integritet uden signifikant blødgøring.

0

Eksempel 2Biokatalysator-partikler fra hel fermentations-
indhøstning

5 I dette eksempel anvendes der portioner af en fermentering med en mutantstamme af *Streptomyces olivaceus* indeholdende intracellulær glucoseisomerase. Den tørre vægt af celleindhold er 7,5 g/liter. En formol-titer for reaktionen med formaldehyd ved en pH-værdi på 8,5 bestemmes
10 til at være 7,4 meq/liter.

Der foretages følgende tilsætninger til en portion på 1 liter af fermenteringen: ialt 1,0 g quebracho-ekstrakt-tannin tilsættes efter forudgående opløsning i vand i en koncentration på 4 g/dl. Dette gøres ved den
15 oprindelige pH-værdi på 5,15 for indhøstningen. pH-værdien instilles derpå på 9,0 med 2 N natriumhydroxidopløsning.

Et præparat af en epihalohydrin-polyamin-copolymer (BETZ 1180 fra Betz-Laboratories, Inc.), i det følgende betegnet som polyamin-flokkuleringsmiddel, blandes
20 med glutaraldehyd ved tilsætning af polyaminen til en vandig opløsning af glutaraldehyd med en koncentration på ca. 3,5% (w/w). Polyaminen er i forvejen fortyndet i vand til et indhold på ca. 2% faste stoffer, og pH-værdien er indstillet på 9,0, som opretholdes under tilsætningen af
25 aminen. Den endelige blanding er sammensat af 1,77 g/dl glutaraldehyd og 1,3 g/dl polyamin, der giver et overskud af aldehyd på 0,34 meq. Blandingen af glutaraldehyd og polyamin sættes til den til en pH-værdi på 9 indstillede fermenteringsindhøstning indeholdende tannin på
30 et niveau på 112,5 ml pr. liter oprindeligt indhøstet rumfang. Dette findes at være det sædvanlige krav til flokkulering af sådanne fermenteringer. Den endelige glutaraldehydkoncentration er i overskud i forhold til det støkiometriske krav med 30 meq/liter.
35

0

Efter tilsætning af polyamin-glutaraldehyd-adduktet indstilles pH-værdien igen på 9. Blandingen henstilles i ca. 3 timer, og de aggregerede faste stoffer skilles fra ved filtrering under anvendelse af vakuum og opsamles på papirskiver. Den fremkomne filterkage fjernes fra papiret og ekstruderes manuelt under anvendelse af en 10 cm³ plastsprøjte med en åbning med diameter på 1,5 mm. Ekstrudatet tørres i nogle få timer under et aftræk med moderat luftstrømning og derefter i en ovn med forceret luftgennemstrømning ved 60°C i 8 timer.

Til sammenligning fremstilles der andre præparater, hvor ét af reagenserne er udeladt, eller hvor kun tanninet eller glutaraldehydet anvendes til udvinding af aggregatet. I disse tilfælde er de dannede aggregater ofte ikke let udvindelige ved filtrering og centrifugeres og dehydratiseres derfor til sammenlignelige fugtige filterkager ved presning mellem lag af papir. De øvrige betingelser for udvindingen forbliver de samme. Når enten polyaminen eller glutaraldehydet udelades, fremstilles adduktet ikke, men reagenserne anvendes i de samme fortyndinger som addukt-præparatet. Tannin selv evalueres også ved en pH-værdi på 7, hvilket giver bedre flokkulering end ved en pH-værdi på 9.

De som ovenfor fremstillede tørrede materialer formales forsigtigt manuelt med morter og pistil, og det formalede materiale ledes gennem en nr. 24 mesh Tyler-sigte eller en dermed ækvivalent sigte og opsamles på en nr. 28 mesh Tyler-sigte eller en dermed ækvivalent sigte. Materialet bedømmes for styrke efter rehydratisering i en kompressionscelle, og den relative styrke bestemmes ud fra det arbejde, der er nødvendigt for at komprimere en prøve til en brøkdel af rumfanget af det oprindelige rehydratiserede rumfang.

Hårdheden udtrykkes i relation til modstandsdygtighed mod komprimering for bakteriecelleaggregatpartiklerne. Der anvendes en Instron Universal Tester Model

0

1102 på en måde svarende til den i USA-patentskrift nr. 3.935.069 beskrevne. Dette instrument kan fås fra Instron Corporation, Canton, Massachusetts.

5 Den belastnings- eller prøvecelle, der anvendes i den ovennævnte Instron Tester, består af en transparent acrylplastcylinder med en indre diameter på 4,37 cm, en ydre diameter på 6,54 cm og en højde på 21,8 cm. Bund-

10 delen har et trin med en tykkelse på 0,635 cm med en åbning på 3,81 cm til dannelse af en understøtning for et mikrofilter. Et bekvemt mikrofilter er en spindedyse, der anvendes ved tekstilspinding og har 14.500 åbninger med diameter ca. 0,2032 mm.

Et rustfrit stålstempel af type 304 med diameter 4,3 cm og længde 13,66 cm monteres således, at det kan

15 bevæge sig koaksialt i den nævnte cylinder. Passende tegn er anbragt langs belastningscellen til markering af en prøvedybde på 10,17 cm. Der forefindes også udstyr til påsætning af formindsket tryk eller vakuum ved bunden af belastningscellen og udstyr til opsamling af enhver væs-

20 ke, der passerer gennem mikrofilteret.

Hvis en prøve af bakteriecelleaggregat anbringes i den ovennævnte belastningscelle, og der påsættes tryk på prøven gennem stemplet, komprimeres prøven.

25 Det tryk, der kræves til en given komprimering af prøven, er et udtryk for prøvens hårdhed.

Resultaterne af dette forsøg fremgår af den følgende tabel I:

30

35

0

Tabel I

	<u>Prøve</u>	<u>Relativ styrke</u>
	Den beskrevne behandling	= 100
5	Tannin udeladt	68
	Glutaraldehyd udeladt	49
	Polyamin udeladt	ingen [*]
	Glutaraldehyd alene	ingen [*]
	Tannin alene (pH = 9)	ingen [*]
10	Tannin alene (pH = 7)	ingen [*]

^{*}disse prøver mister integritet i deres partikler ved rehydratisering og har utilstrækkelig styrke til egentlig afprøvning.

15 Alle de ovennævnte partikler udviser den ønskede biokatalytiske (glucoseisomerase)-aktivitet.

Eksempel 3Biokatalysator-partikler fra fermenterings-ind-høstning

I dette eksempel på udvindingen af en fermentations-indhøstning fra en mutantstamme af *Streptomyces olivaceus* formindskes glutaraldehyd-overskuddet fra 30 meq/liter til

25 4 meq/liter i den endelige blanding.

Den anvendte metode er tilsætning af kun en del af polyamin-glutaraldehyd-adduktet, efterfulgt af mere polyamin (med samme fortynding) til fremkaldelse af flokkulering.

30 Der foretages garvesyretilsætninger på 0,5 g og 1,0 g pr. liter oprindelig indhøstning under anvendelse af en vandig opløsning med 4 g/dl. Andre udvindingsbetingelser er som i det foregående eksempel. De resulterende styrker af de rehydratiserede partikler fremgår af tabel II.

35

0

Tabel II

	<u>Prøve</u>	<u>Relativ styrke</u>
	Garvesyre udeladt	= 100
5	1 g/liter garvesyrekoncentration	110
	0,5 g/liter garvesyrekoncentration	111
	Garvesyre udeladt, 30 meq/liter aldehydoverskud	94

10 1 g/liter-niveauet for garvesyre er ækvivalent med co-flokkulering af 27% af polyamin-glutaraldehyd-adduktet (13,5% for 0,5 g/liter-niveauet).

Alle partiklerne udviser den ønskede biokatalytiske (glucoseisomerase) aktivitet.

15

Eksempel 4Biokatalysator-partikler fra fermenterings-indhøstning

20 En fermenterings-indhøstning af en mutantstamme af *Streptomyces olivaceus* er udgangsmaterialet ved dette forsøg. Det har et tørcelleindhold på 7,35 g/liter, en pH-værdi på 7,3 og en aldehyd-reaktiv kapacitet på 44,7 meq/liter ved en pH-værdi på 8,5.

25 En portion på 227 liter af fermenterings-indhøstningen behandles med 2,5 N natriumhydroxidopløsning til opnåelse af en pH-værdi på 9,0. 25 liter af et polyamin-glutaraldehyd-addukt fremstillet som i eksempel 2 tilsettes derpå gradvist under sammenblanding. Den endelige pH-værdi er 8,8. Efter 1 times forsigtig omrøring udvin-

30 des de aggregerede faste stoffer ved filtrering. Den af faste stoffer bestående filterkage ekstruderes derefter, tørres i en forceret luftstrøm ved 60°C og formales til grove partikler.

35 På lignende måde sættes der til 257 liter af indhøstningen 257 g quebracho-tanninekstrakt i form af en 3,9 g/dl-opløsning i vand. 1 time efter indblandingen indstilles pH-værdien fra 7,2 til 9,0 med 2,5 N natrium-

0

hydroxidopløsning. Der tilsættes derpå 28,3 liter af polyamin-glutaraldehyd-adduktet gradvist og under sammenblanding.

5

Efter udvinding som ved den første portion uden tannin bedømmes partikler af tilsvarende størrelse med hensyn til mekanisk styrke efter rehydratisering. Prøven uden tannin tildeles en relativ styrke på 100, medens prøven med tannin findes at have en relativ styrke på 190.

10

Disse partikler udviser den ønskede biokatalytiske (glucoseisomerase) aktivitet.

Eksempel 5

Biokatalysator-partikler fra fermenterings-indhøstning.

15

Der anvendes en anden fermentering af den i eksempel 4 beskrevne type, hvor tørcelleindholdet er 6,26 g/liter, og pH-værdien er 5,3. Indholdet af aldehyd-reaktivt materiale ved en pH-værdi på 8,5 er 32,1 meq/liter. Under anvendelse af en lignende procedure som i det foregående eksempel findes det, at mængderne af reagenser er som følger:

25

Portion 1: 200 liter indhøstet materiale
18,8 liter polyamin-glutaraldehyd

Portion 2: 189 liter indhøstet materiale
189 g quebracho-tanninekstraktet
17,7 liter polyamin-glutaraldehyd

30

Portioner af hver batch med samme partikelstørrelse bedømmes for styrke efter rehydratisering.

35

<u>Prøve</u>	<u>Relativ styrke</u>
Uden tannin	= 100
<u>Med tannin-tilsætning</u>	<u>224</u>

Partiklerne udviser den ønskede biokatalytiske (glucoseisomerase) aktivitet.

0

Eksempel 6Biokatalysator-partikler fra fermenterings-indhøstning

5

En fermenterings-indhøstning af en mutantstamme af *Bacillus licheniformis* ATCC 31604 dekanteres til adskillelse deraf fra nogle ikke-cellulære, tætte faste stoffer. Det aldehyd-reaktive indhold, bestemt ved formol-titre-ring ved en pH-værdi på 8,5, er 91,3 meq/liter.

10

Der udtages en portion på 500 ml, og pH-værdien indstilles på 8. Dernæst tilsættes der 150 ml af et polyamin-epihalohydrin og glutaraldehyd addukt som fremstillet i eksempel 2. Denne mængde udgør i nogen grad et overskud i forhold til den mængde, der kræves til den bedste flokkulering. Der tilsættes derpå quebracho-tanninekstrakt i form af 10 ml af en 4 g/dl-opløsning. Efter henstand i 1 time isoleres de aggregerede faste stoffer ved centrifugering og ekstruderes derefter under anvendelse af en plastsprøjte, og der tørres ved 60°C i en ovn med forceret luftgennemgang.

15

Der fås partikler ved forsigtig formaling af det tørrede materiale. Når disse partikler rehydratiseres i en 40%'s (w/w) glucoseopløsning, bibeholder de deres fysiske integritet og biokatalytiske (glucoseisomerase) aktivitet efter fortsat nedsænkning ved 70°C i 24 timer.

20

Eksempel 7Immobilisering af biomasse indeholdende palatinose-dannende enzymaktivitet

30

Der udføres fermenteringsstudier i lille skala i to 14 liters Chemaptec LF-14 fermenteringsbeholdere (arbejdsrumfang 10 liter). Hver fermenteringsbeholder er udstyret med apparatur til måling af opløst oxygen og pH og kobles periodisk via rørforbindelser til en Perkin-Elmer MGA-1200 procesgasanalysator til måling af CO₂, argon, oxygen, nitrogen, H₂O og NH₃ i den ved fermenteringen udviklede gas. CO₂ er naturligvis af primær interesse.

35

0

Fermenteringsmediet består af roetyksaft i en koncentration på 5° Brix, suppleret med 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ og 2,0% majstøbevæske.

5 Fermenteringsbeholderen podes med 100 ml af et Prot-aminobacter rubrum-podemateriale opnået ved dyrkning af en forråds-kultur i det ovenfor beskrevne medium, som dernæst inkuberes ved 30°C under omrøring ved 290 o/min. i en roterende omrører i 24 timer inden podningen. Efter ca. 15 timer udvindes den biomasse, der er anvendt i det påfølgende stabiliseringsforsøg, fra fermenteringsbeholderen.

15 En immobiliseringsprocedure (metode 2), der falder inden for den foreliggende opfindelses rammer, og fire metoder, der falder uden for opfindelsens rammer, udføres med den ovenfor beskrevne fermenteringsvæske, hvis formol-titreringsværdi er 0,61 meq/liter.

Immobiliseringsmetoder

Metode 1

20 500 ml hel fermenteringsvæske indstilles på en pH-værdi på fra 6,5 til 4,95 med 1,0 N NaOH. Hertil sættes der 55 ml glutaraldehyd-polyamin-addukt, der er fremstillet som følger:

1. 11,67 g BETZ 1180 fortyndes til 100 ml i H_2O .
2. pH-værdien indstilles på 9,0.
- 25 3. 17,8 ml 25%'s glutaraldehyd fortyndes til 100 ml i H_2O .
4. BETZ 1180-opløsning sættes langsomt til glutaraldehyd.
5. pH-værdien genindstilles på 9,0.

30 Herefter får kombinationen lov at reagere ved 25°C i 1 time.

Metode 2

35 Til 500 ml hel fermenteringsvæske sættes der langsomt 12,5 ml af en 4,0 g/dl-opløsning af quebracho-tannin, indtil der sker flokkulering af cellerne. Opløsningen holdes ved 25°C i 30 minutter, hvorpå opløsningens pH-værdi

0

indstilles på 6,5 med 1,0 N NaOH, og 65 ml af glutaraldehyd-polyamin-opløsningen, fremstillet som under metode 1, tilsættes. Opløsningen holdes derpå ved 25°C i 1 time.

5

Metode 3

Til 500 ml hel fermenteringsvæske sættes der 12,5 ml 4,0%'s (w/v) quebracho-tannin. Efter indstilling af pH-værdien på 6,5 med 1,0 N NaOH tilsættes der 60 ml 1,67%'s glutaraldehyd, og opløsningen holdes ved 25°C.

10

Metode 4

Til 500 ml hel fermenteringsvæske sættes der 2,5 ml 10%'s polyethylenimin (PEI). Væsken holdes ved 25°C i 30 minutter. Opløsningens pH-værdi indstilles på 6,5 med 1,0 N NaOH, og der tilsættes 50 ml 1,67%'s (w/v) glutaraldehyd. Den fremkomne blanding holdes ved 25°C i 1 time.

15

Metode 5

500 ml hel fermenteringsvæske titreres til en pH-værdi på 5 med en opløsning af 10%'s PEI. Opløsningen holdes ved 25°C i 30 minutter, hvorpå der tilsættes 50 ml 1,67%'s (w/v) glutaraldehyd.

20

Ved alle de ovennævnte metoder får de flokkulerede celler lov at afsætte sig, og supernatanten dekanteres. Resten af opslæmningen centrifugeres ved 10.000 o/min. i 10 minutter ved 25°C i en Sorvall RC-2B-centrifuge under anvendelse af et centrifugehovede af typen GSA. Den fikserede, fældede biomasse ekstruderes derpå gennem en standard 100 ml-injektionssprøjte, idet man ved tryk med hånden presser pastaen gennem sprøjteåbningen (1,1-1,5 mm) uden nogen nål eller kanyler påsat derpå. Det spaghetti-lignende ekstrudat tørres ved 40°C i en tørreovn med forceret luftgennemgang og opbrydes i partikler af passende størrelse til yderligere afprøvning. Resultaterne af de udførte afprøvn-

35

ninger er samlet i tabel III.

Tabel III

Metode	Opnået tør vægt i gram	Instron- ¹ arbejdsvar- di i kg/in.	Ekstrudatets karakter	Bestemmelses- ² resultat i $\mu\text{mol/g}$	% ³ Aktivitet
1	3,09	0,20	Svagt	3.728	23,0
2	3,71	0,26	Stærkt (bedst)	3.456	25,6
3	2,07	--	Grødet-blødt	594	2,5
4	3,18	--	Svagt	1.054	6,7
5	3,78	--	Stærkt	1.122	8,5

¹Granulatets styrke bestemmes under anvendelse af en Instron Universal Tester. Ekstrudatet fra metode 5 viser sig at være forholdsvis stærkt, men testes ikke på grund af dets lave aktivitet.

²Bestemmelse af immobiliseret enzym. 5 mg af det immobiliserede enzym med partikelstørrelse $<80\mu$ 150 mesh suspenderes i 1 ml 0,01 M PO_4 -puffer ved pH 7,0 og holdes ved stuetemperatur i 60 min. Det hydratiserede enzym overføres derpå til 100 ml af en 10% sucroseopløsning i pufferen og inkuberes ved 30°C i 60 min. under omrystning. Reaktionen standses ved anbringelse af prøven i et kogende vandbad i 5 min., og man anvender DNS-reducerende sukker-bestemmelsesmetoden.

³Aktivitet i væsken er 100 $\mu\text{mol/ml}$.

0

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til immobilisering af en enzym-
producerende mikroorganisme eller det af denne produce-
5 rede enzym, k e n d e t e g n e t ved, at man fremstil-
ler et reaktionsprodukt på den måde, at man
(a) bringer et vandigt medium indeholdende enzymet eller
en masse af bakterieceller med biokatalytisk aktivitet i
kontakt med tannin, et kationisk flokkuleringsmiddel i form
10 af en langkædet polyamin og et tværbindingsmiddel, og at man
(b) skiller reaktionsproduktet fra det vandige medium og,
om ønsket, efterbehandler dette.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at det materiale, der immobiliseres, er et
15 frit enzym.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at det materiale, der immobiliseres, er i form
af hele eller sprængte mikroorganismeceller.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
20 n e t ved, at der som det kationiske flokkuleringsmiddel
anvendes polyacrylamid, polyethylenimin, poly-(2-hydroxy-
propyl-1-N-methylammoniumchlorid), poly-(2-hydroxypropyl-
-1,1-N-dimethylammoniumchlorid), poly-(N-(dimethylamino-
methyl)-acrylamid), poly-(diallyldimethylammoniumchlorid),
25 poly-(N,N-dimethylaminoethyl-methacrylat) eller poly-(N-
-dimethylaminopropyl)-methacrylamid.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at der som flokkuleringsmidlet anvendes en
vandopløselig, kationisk polymer fremstillet ved polymeri-
30 sation af en epihalohydrin med en alkylpolyamin med form-
len $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en lavere alkylengruppe med fra
2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver for sig er en
alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, idet molfor-
holdet mellem epihalohydrin og polyamin ligger fra ca.
35 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvorhos polymerisationen omfatter

0

omsætning med alkylpolyaminen af fra ca. 50 til ca. 90% af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reaktionen får lov at fortsætte, indtil reaktionsmediet når en praktisk taget ensartet viskositet, og den resterende portion af epihalohydrinen omsættes portionsvis til fremstilling af den kationiske polymer, hvorhos polymerisationstemperaturen ligger fra ca. 60 til ca. 120°C.

5

10

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt efter net ved, at der som tværbindingsmidlet anvendes et multifunktionelt aldehyd, et multifunktionelt halogenid, et multifunktionelt anhydrid, en multifunktionel azoforbindelse, et multifunktionelt isocyanat, et multifunktionelt isothiocyant eller et dehydrativt kondensationsreaktionsmiddel.

15

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt efter net ved, at der som tværbindingsmiddel anvendes glutaraldehyd.

20

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt efter net ved, at der anvendes quebracho-tannin.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt efter net ved, at der som tannin anvendes garvesyre.

25

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt efter net ved, at det kationiske flokkuleringsmiddel og tværbindingsmidlet for-reageres til dannelsen af et addukt inden deres kontakt med biokatalysatoren.

30

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt efter net ved, at den enzymproducerende mikroorganisme er *Streptomyces olivaceus*, *S. griseus*, *S. olivochromogenes*, *S. phaeochromogenes*, *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. awamori*, *B. subtilis*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae* eller *Protaminobacter rubrum*.

35

12. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til immobilisering af *Streptomyces olivaceus*, kendt efter net ved, at man i rækkefølge gennemfører følgende trin:

0

- (a) tilvejebringelse af et vandigt medium indeholdende hele celler af mikroorganismen,
- (b) tilsætning af quebracho-tannin til det vandige medium,
- (c) tilsætning af et addukt af glutaraldehyd og en epi-
- 5 halohydrin-polyamin-copolymer til det vandige medium til dannelse af et reaktionsprodukt,
- (d) fjernelse af reaktionsproduktet fra det vandige medium, og
- (e) tørring af reaktionsproduktet ved en forhøjet temperatur.

10

13. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til immobilisering af *Bacillus licheniformis*, kendet og tegnet ved, at man i rækkefølge gennemfører følgende trin:

15

- (a) tilvejebringelse af et vandigt medium indeholdende mikroorganismecellerne,
- (b) tilsætning af glutaraldehyd og en epihalohydrin-polyamin-copolymer til det vandige medium,
- (c) tilsætning af quebracho-tannin til det vandige medium til dannelse af et reaktionsprodukt,
- 20 (d) fjernelse af reaktionsproduktet fra det vandige medium, og
- (e) tørring af reaktionsproduktet ved en forhøjet temperatur.

25

14. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til immobilisering af *Protaminobacter rubrum*, kendet og tegnet ved, at den omfatter følgende trin:

30

- (a) tilvejebringelse af et vandigt medium indeholdende mikroorganismecellerne,
- (b) tilsætning af tannin til det vandige medium,
- (c) tilsætning af et addukt af glutaraldehyd og en epihalohydrin-polyamin-copolymer til det vandige medium til dannelse af et reaktionsprodukt,
- (d) fjernelse af reaktionsproduktet fra det vandige medium, og
- 35 (e) tørring af reaktionsproduktet.

0

15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, k e n d e -
t e g n e t ved, at der som tannin anvendes quebracho-
-tannin, og at dette sættes til det vandige medium inden
adduktet.

5

10

15

20

25

30

35