



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT

71576

C Patentti myönnetty
(45) Patent julkaistu 19 01 1987

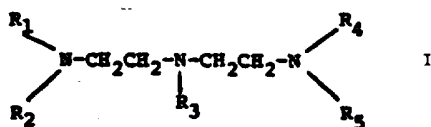
(51) Kv.Ik.⁴/Int.Cl.⁴ C 12 N 11/00

(21) Patenttihakemus — Patentansökning	803837
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	10.12.80
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	10.12.80
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	14.06.81
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	10.10.86
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	13.12.79
Ranska-Frankrike(FR) 7930598	
Toteennäytetty-Styrkt	

- (71) Corning Glass Works, Corning, New York, USA(US)
(72) Jean Luc Alain Guy Baret, Moret sur Loing, Ranska-Frankrike(FR)
(74) Berggren Oy Ab
(54) Menetelmä immobilisoitujen entsyymien desinfioimiseksi -
Förfarande för desinficering av immobiliserade enzymerna

(57) Tiivistelmä

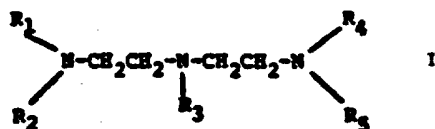
Menetelmä immobilisoitujen entsyymien, erityisesti laktaasin ja glukooosi-isomeraasin, desinfioimiseksi, jossa saatetaan immobilisoidut entsyymit kosketukseen vähintään yhden substituoidun dietyleenitriamiinin laimean vesiliuoksen kanssa, jolla dietyleenitriamiinilla on kaava I



jossa R_1 , R_2 , R_3 , R_4 ja R_5 ovat yksiarvoisia ryhmiä, jotka (1) toisistaan riippumatta ovat vetyatomi tai oktyyliryhmä edellyttäen, että ainakin kahden ryhmistä R_1 , R_2 , R_3 , R_4 ja R_5 on oltava oktyyliryhmä, ja (2) jossa R_1 ja R_4 ovat vetyatomeja ja R_2 , R_3 ja R_5 on toisistaan riippumatta vetyatomi, bentsyyli- tai lauryyli-ryhmä edellyttäen, että mitkään ryhmistä R_2 , R_3 ja R_5 eivät ole samoja, käyttämällä sellaista väkevyyttä ja käsittelyaikaa, että oleellinen osa kontaminoivista mikro-organismeista kuolee ilman merkittäviä haitallisia vaikutuksia immobilisoituihin entsyymeihin.

(57) Sammandrag

Förfarande för desinficering av immobiliserade enzymer, speciellt laktas och glukosisomeras, vari de immobiliserade enzymerna bringas i kontakt med en utspädd lösning av minst en substituerad dietylenträmin, vilken dietylenträmin har formeln I



där R_1 , R_2 , R_3 , R_4 och R_5 betecknar envärda grupper, vilka (1) oberoende av varandra är en väteatom eller en oktylgrupp förutsatt att åtminstone två av grupperna R_1 , R_2 , R_3 , R_4 och R_5 bör vara oktylgrupper, och (2) där R_1 och R_4 är väteatomer och R_2 , R_3 och R_5 är oberoende av varandra en väteatom, en benzyl- eller en laurylgrupp förutsatt att ingen av grupperna R_2 , R_3 och R_5 är lika, genom användning av en sådan koncentration och behandlingstid, att en väsentlig del av de kontaminerande mikroorganismerna dör utan betydande skadliga verkningar på de immobiliserade enzymerna.

Menetelmä immobilisoitujen entsyymien desinfioimiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää hiukkasmaiselle kantoaineelle immobilisoitujen entsyymien laktaasin ja glukoosi-isomeraasin desinfioimiseksi, joita entsyymejä käytetään laktoosin hydrolysoimiseen glukoosiksi ja galaktoosiksi.

Yleisesti tätä keksintöä voidaan käyttää minkä tahansa immobilisoidun entsyymin kanssa sikäli kuin desinfiointiaine ei vaikuta haitallisesti immobilisoituun entsyymiin.

Vuonna 1976 Ranskan juustotuotanto saavutti suunnilleen miljoonan tonnin määrän, mikä johti yli kuuden miljoonan heratonnin tuotantoon sivutuotteena. Tällainen hera sisältää litraa kohti noin 6-9 g proteiinia, 45-50 g laktoosia, 6-8 g mineraalisuoloja ja 1-2 g rasvaa. Maailmanlaajuisesti pelkästään herasta saatavan laktoosin määrä kohosi v. 1977 lähes 3,5 miljoonaan tonniin.

Aikaisemmin heraa pidettiin jätetuotteena ja se laskettiin viemäreihin tai virtoihin ja jokiin. Johtuen kasvavasta huolesta ympäristön saastumisen suhteen suuri määrä heraa prosessoidaan erilaisiksi eläin- ja ihmisravintotuotteiksi. Esimerkiksi erittäin suorituskykyisten ultrasuodattimien kehitys tekee nykyään mahdolliseksi heraproteiinin erottamisen herasta. Tällainen proteiini on poikkeuksellisen arvokasta. Esimerkiksi heraproteiinin 35-prosenttisella konsentraatilla voidaan korvata rasvaton kuivamaito monissa elintarviketuotteissa, kuten leipomotuotteissa, virvoitusjuomissa ja pakastejälkiruoissa. Valitettavasti proteiinin erottuminen herasta johtaa nestejakeeseen, jota kutsutaan permeaatiksi, jolla on viime aikoihin asti ollut vain vähän tai ei lainkaan arvoa.

Immobilisoitujen entsyymien tulon myötä permeaatissa olevan laktoosin hydrolyysi on kuitenkin joko mineraalien

poiston kanssa tai ilman sitä tullut kaupallisesti mahdolliseksi. Glukoosin ja galaktoosin läsnäolosta johtuen hydrolysoitu laktoosi on paljon makeampaa ja liukenevampaa kuin pelkkä laktoosi. Niinpä hydrolysoitu tuote on funktionaalinen makeutin, jota voidaan käyttää sokerileivosten, maitopohjaisten jälkiruokien ja pakastejälkiruokatuotteiden, kuten jäätelön valmistuksessa. Sitäpaitsi hydrolysoitu tuote on tehokkaasti fermentoituva seos, joka sopii käytettäväksi käymisalusena esimerkiksi panimo- ja farmaseutteisessa teollisuudessa.

On myös mahdollista suorittaa herassa olevan laktoosin hydrolyysi ilman edeltävää ultrasuodatusvaihetta ja joko mineraalinpoiston kanssa tai ilman sitä. Tuote joka yhä sisältää proteiineja, muistuttaa hydrolysoitua permeaattia ja tämän vuoksi sitä voidaan käyttää myös elintarviketeollisuudessa, kuten jo esitettiin.

Erilaiset menetelmät laktoosin hydrolysoimiseksi ovat luonnollisesti hyvin tunnettuja alaan normaalisti perehtyneille. Entsymaattinen hydrolyysi on erityisen hyödyllinen elintarvikkeisiin liittyvien tuotteiden valmistukseen ja kuten jo mainittiin immobilisoitujen entsyymien käyttö on erityisen houkuttelevaa.

Yksinomaan kuvaamismielessä H.H. Weetall et. al., *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 295 (1974) selostavat immobilisoidun laktaasin valmistusta ja sen käyttöä happaman heran entsyymaattisessa hydrolyysissä. Entsyymi, jota eristettiin sekä sienistä että hiivasta, immobilisoitiin zirkoniumoksidipäällysteisille huokoisille lasihiukkasille. Substraatti koostui joko laktoosin vesiliuoksesta tai happamasta herapermeaatista.

Lisäksi L.E. Wierzbicki et al., *Biotechnol. Bioeng.* 16, 397 (1974) selostivat happamassa herassa olevan laktoosin hydrolyysiä käyttäen laktaasia (β -galaktosidaasi), joka

oli immobilisoitu huokoisille lasihiukkasille painottaen uudelleen käytettävän katalyytin valmistusta ja karakterisointia pienen laktoosipitoisuuden meijerituotteiden valmistukseen. Osittain puhdistetut laktaasit lajeista *Aspergillus niger*, *Lactobacillus helveticus* ja *Saccharomyces lactis* immobilisoitiin huokoisille lasihiukkasille. Substraatti koostui happamasta herajauheesta, joka oli muodostettu uudelleen vedessä sopivaan kuiva-ainepitoisuuteen. Joissakin tapauksissa uudelleenmuodostetusta happamasta herasta poistettiin proteiini kuumentamalla kiehuvaassa vesihauteessa viisi minuuttia.

Lopuksi H.H. Weetall et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 689 (1974) kuvaavat immobilisoidun laktaasin valmistusta osana laktoosin entsyymaattisen hydrolyysin jatkotutkimuksista. Käytettiin sienilaktaasia immobilisoituna zirkoniumoksidipäälysteisille, huokoskooltaan säädetyn lasin ja huokoisen titaanidioksidin hiukkasille. Saatuja immobilisoituja entsyymivalmisteita käytettiin kokonaan makeassa herassa, kokonaan happamassa herassa happamassa heraultrasuodoksessa olevan laktoosin ja puhtaan laktoosin hydrolyysiin.

Kuten H.H. Weetall et. al., *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 295 (1974) mainitsivat, hera-alusta-aineen bakteeriepäpuhtaus oli pääongelma. Mikro-organismien jatkuva kasvu tukki kolonnit. Kaksiprosenttisen glutaraldehydin käytön pH-arvolla 4,0 havaittiin tappavan bakteerit tuhoamatta immobilisoidun entsyymin aktiivisuutta. Nämä tutkijat väittävät, että sanitointimenettely olisi ehdottoman välttämätön missä tahansa laitostilanteessa.

On kuitenkin ilmeistä, että jokaisen kaupallisesti elinvoimaisen sanitointi- tai desinfiointimenettelyn on tehokkaasti tuhottava oleellisesti kaikki saastuttavat mikroorganismit ilman huomattavaa haitallista vaikutusta immobilisoituihin entsyymeihin. Sitäpaitsi tapauksissa, joissa tuote on tarkoitettu käytettäväksi elintarviketeollisuu-

nessa, desinfiointiaineen on usein täytettävä viranomais-
ten säätämät vaatimukset.

Tähän saakka ei todella tyydyttävää desinfiointiainetta ole
ollut saatavissa. Etikkahappo, jota on yleisesti käytetty
laimeana vesiliuoksena, antaa vain kohtalaiset tulokset.
Sitäpaitsi muut tunnetut desinfiointiaineet, kuten halo-
geenijohdannaiset, orgaaniset hapot, kvaternääriset ammo-
niumyhdisteet, biguanidiinipolymeerit yms. pyrkivät olemaan
käyttöön soveltumattomia johtuen entsyymien osittaisesta
tai täydellisestä inaktivoinnista.

Näin ollen on edelleen olemassa tarvetta kaupallisesti
elinvoimaisesta sanitointi- tai desinfiointimenettelystä
immobilisoiduille entsyymeille, joka menettely on tehokas
ilman merkittäviä haitallisia vaikutuksia immobilisoituihin
entsyymeihin.

Tämän keksinnön tarkoituksena on tämän vuoksi saada aikaan
menetelmä immobilisoitujen entsyymien desinfioimiseksi,
joka menetelmä tehokkaasti tuhoaa oleellisesti kaikki saas-
tuttavat mikro-organismit ilman merkittäviä haitallisia
vaikutuksia immobilisoituihin entsyymeihin.

Nämä ja muut tarkoitukset käyvät alaan perehtyneille ilmi
seuraavasta selityksestä ja patenttivaatimuksista.

Näin ollen tämä keksintö tarjoaa käytettäväksi menetelmän
hiukkasmaiselle kantoaineelle immobilisoitujen entsyymien
laktaasin ja glukoosi-isomeraasin desinfioimiseksi, jossa
menetelmässä saatetaan immobilisoidut entsyymit kosketuk-
seen dioktyylidietyleenitriamiinin tai trioktyylidiety-
leenitriamiinin laimean vesiliuoksen kanssa väkevyydessä
ja ajanjakso, jotka riittävät oleellisesti tappamaan
saastuttavat mikro-organismit ilman merkittäviä haitalli-
sia vaikutuksia immobilisoituihin entsyymeihin.

Kuten alalla hyvin tiedetään laktoosi saadaan ainakin 80-prosenttisesti hydrolysoitua glukoosiksi ja galaktoosiksi johtamalla laktoosia sisältävä vesiliuos kolonnin läpi, joka sisältää immobilisoitua laktaasia, tyypillisesti alle n. 60°C:n lämpötilassa. Poistovirta voidaan osittain väkevöidä siirapin saamiseksi käytettäväksi makeuttimena erilaisissa elintarvikkeissa.

Tällaisessa prosessissa käytettyä laktaasia valmistetaan useiden eri mikro-organismien, kuten sienien, bakteerien ja hiivojen avulla. Sienilaktaasit ovat ehkä yleisimpiä, ts. laktaasit, jotka on eristetty lajeista *Aspergillus niger* ja *Aspergillus oryzae*. Tekniikka laktaasien eristämiseksi mikro-organismeista on luonnollisesti alalla hyvin tunnettu.

Entsyymien immobilisointi on helppo toteuttaa eri menetelmillä, jotka myös tunnetaan. Immobilisointitekniikan tuoreen katsauksen suhteen, ks. I. Chibata, toimittaja, "Immobilized Enzymes", Halsted Press, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1978, sivut 1-73. Vaikka immobilisointimenetelmän ei tiedetä olevan kriittinen, tämän keksinnön menetelmä soveltuu hyvin käytettäväksi entsyymien kanssa, jotka on sidottu veteen liukenemattomiin tuki- tai kantoaineisiin. Haluttaessa tällaiset kantoaineet voivat olla huokoisia, mikä tekee mahdolliseksi kasvaneen entsyymiannoksen tukiaineen massayksikköä kohti. Yleensä entsyymit sidotaan veteen liukenemattomiin kantoaineisiin fysikaalisella adsorptiolla, ionisidonnalla, kovalenttisisidonnalla tai jollakin näiden yhdistelmällä.

Veteen liukenemattomat kantoaineet voivat yleensä olla orgaanisia tai epäorgaanisia. Esimerkkejä orgaanisista tukiaineista ovat muiden muassa polyesterit, kuten poly(etyleenitereftalaatti); polyamidit, kuten nylon-6- ja nylon-6,6: polyakrylaatit; polymetakrylaatit; polyakryyli-

amidit; poly(akryylihapo); poly(metakryylihapo); poly(galakturonihapto); poly(asparagiinihapto); etyleeni-maleiinihaptoanhydridikopolymeerit; polyolefiinit, kuten polyeteeni, polypropeeni, polybuteeni ja polybutadieeni; polystyreeni; poly(aminostyreeni); poly(vinylikloridi); poly(vinyylialkoholi); poly(vinylideenikloridi); selluloosa ja sen johdannaiset; agaroosigeelit; dekstraanigeelit ja niiden johdannaiset; polysakkaridit; polypeptidit; kollageeni; yms.

Epäorgaaniset kantoaineet voidaan luokitella kvartsipitoisiksi ja ei-kvartsipitoisiksi metallioksideiksi. Esimerkkejä kvartsipitoisista kantoaineista ovat mm. lasi, piidioksidi, wollastoniitti, bentoniitti, kordieriitti yms. Esimerkkejä ei-kvartsipitoisista metallioksideista ovat mm. alumiinioksidi, spinelli, apatiitti, nikkelioksidi, titaanidioksidi, zirkoniumoksidi yms.

Yleensä veteen liukenematon kantoaine voi olla missä tahansa halutussa muodossa. Kantoaine voi olla luonteeltaan hiukkasmainen vaihdellen hienojakoisesta pulverista karkeaan raemaiseen materiaaliin tai kantoaine voi olla jatkuva, muotoiltu kappale, kuten tasomainen tai käyrä levy tai pallo tai kolmiulotteinen kappale, kuten suorakulmainen tai sylinterimäinen putki tai monimutkainen pilari. Käytännössä kuitenkin kantoaine useimmiten on hiukkasmainen.

Mitä tulee esimerkkeihin menettelyistä entsyymien immobilisoinniseksi epäorgaanisille kantoaineille, vain kuvausmielessä katso US-patentti n:o 3 519 538 (joka vastaa ranskalaista patenttia n:o 2 020 527), US-patentti n:o 3 556 945 (joka vastaa ranskalaista patenttia n:o 2 001 336) ja US-patentit n:ot 3 666 627 ja 3 802 997 (jotka vastaavat ranskalaista patenttia n:o 2 020 661).

Substituoituja dietyleenitriamiineja ja menetelmiä niiden valmistamiseksi kuvataan ranskalaisissa patenteissa n:ot

2 080 797 ja 2 110 303 ja saksalaisessa patentissa n:o 2 115 549. Näillä yhdisteillä on biomyrkkyminaisuuksia. Mieluummin dioktyylidietyleenitriamiinin ja trioktyylidietyleenitriamiinin synergististä seosta, jota on kuvattu ranskalaisessa patentissa n:o 2 110 303, yllä ja jota on kaupallisesti saatavissa Th. Goldschmidt AG-yhtiöltä Saksan liittotasavallasta kauppanimellä "Tego-Diocto BS", käytetään tämän keksinnön menetelmässä.

Tällaisia substituoituja dietyleenitriamiineja käytetään laimeina vesiliuoksina, tyypillisesti n. 0,1-0,5 paino-%:n väkevyytenä, vaikka pienempiä ja suurempia väkevyyksiä voidaan käyttää. Yleensä dioktyyli- ja trioktyylidietyleenitriamiinin väkevyys, vesiliuoksen kokonaistilavuus ja desinfiointikäsittelyn kesto aika voivat vaihdella laajasti riippuen ainakin osittain mikrobisaastumisen ankaruudesta, läsnä olevien mikro-organismien tyypeistä ja immobilisoidun entsyymin määrästä. Joka tapauksessa tällaiset käsittelyolosuhteet tai -parametrit on alaan normaalisti perehtyneen helppo määrittää. Useimmiten kuitenkin n. 15-30 minuutin käsittely 5-10 litralla esimerkiksi Tego Dioctyl BS-valmisteen 0,1 paino-%:sta desinfiointiliuosta kilogrammaa kohti immobilisoitua entsyymiä on osoittautunut tyydyttäväksi.

Tämän keksinnön eräässä toteutusmuodossa immobilisoitu entsyymi asetetaan yksinkertaisesti desinfioivan liuoksen kylpyyn. Valinnaisesti kylpyä voidaan ravistella, hämmennetään, kierrätää pumppulaitteella tai muulla tavoin sekoittaa.

Toisessa toteutusmuodossa desinfiointiliuosta kierrätetään kolonnin tai reaktorin läpi, joka sisältää immobilisoitua entsyymiä. Mieluummin tällainen desinfiointiliuoksen kierätys suoritetaan vastavirtaperiaatteella, ts. vastakkaiseen suuntaan verrattuna syöttöliuoksen virtaukseen kolonnin tai reaktorin läpi. Kun entsyymi on immobilisoitu hiuk-

kasmaiselle kantoaineelle ja kun kolonnin tai reaktorin rakenne sallii, desinfiointiliuoksen vastavirtausnopeus on mieluummin sellainen, että immobilisoidut entsyymihiukaset fluidisoituvat. Tämä fluidisointi estää kanavoitumisen ja takaa immobilisoidun entsyymin täydellisen kosketuksen desinfiointiliuoksen kanssa.

On huomattava, että mitä tahansa desinfiointiliuosta voidaan käyttää useita kertoja desinfiointitoimenpiteen kustannusten pienentämiseksi. Kuitenkin kun desinfiointiliuosta kierrätetään, jotkut lisäkäsittelyt saattavat olla toivottavia tai tarpeellisia, kuten esimerkiksi suodatus solujätteiden poistamiseksi ja pH-arvon säädöt.

Vielä muussa tämän keksinnön toteutusmuodossa dioktyyli- tai trioktyylidietyleenitriamiini voidaan sisällyttää syöttöliuokseen, jota prosessoidaan immobilisoidun entsyymin avulla. Tällä tavoin immobilisoidun entsyymin mikrobisaastuminen voidaan minimoida tai jopa estää. Luonnollisesti tällaista estokäsittelyä voidaan käyttää yksin tai yhdessä jo esitetyn desinfiointimenettelyn kanssa.

Tätä keksintöä kuvataan tarkemmin, mutta ei rajoiteta seuraavilla esimerkeillä, jotka kuvaavat vertailukokeita ja tiettyjä suositeltavia toteutusmuotoja.

Esimerkki 1

Reaktorin desinfiointi, johon on panostettu lajista *A. Niger* saatua immobilisoitua laktaasia, jota käytetään herapermeaatin hydrolysointiin

Perusteellisen vesihuuhtelun jälkeen orgaanisen aineen mahdollisimman suuren määrän poistamiseksi kolonnin, johon oli panostettu 45 kg immobilisoitua *A. niger*-peräistä laktaasia, joka oli valmistettu sitomalla entsyymi hiukkasmaiseen pii-dioksidikanto-aineeseen US-patentissa n:o 3 519 538 kuvatulla menettelyllä, käsiteltiin n. 20 minuuttia johtamalla kolonnin läpi vastavirtaperiaatteella Tego Diocto BS-

valmisteen 0,1 %:sta vesiliuosta nopeudella 1000 l/h. Kolonni huuhdeltiin sitten vedellä.

Mikro-organismien lukumäärät pesuvedessä ennen ja jälkeen desinfiointikäsitteilyä olivat seuraavat (taulukko I).

TAULUKKO I
Pesuveden mikro-organismilukumäärät

	<u>Ennen</u>	<u>Jälkeen</u>	<u>Käsittelyn hyötysuhde^a</u>
Mikro-organis- meja yhteensä	470 000	6 000	98,7 %
Hiivoja ja homeita	1 550	65	95,8 %

$$^a \frac{(\text{Ennen} - \text{jälkeen})}{\text{ennen}} \times 100$$

Yllä olevat luvut osoittavat selvästi käytetyn desinfiointiaineen mikro-organismeja tappavan toiminnan.

Esimerkit 2 ja 3

Vertailukokeet

Reaktorin desinfiointi, johon on panostettu A. niger-lajista saatua, immobilisoitua laktaasia, jota käytetään herasaostuman hydrolyysiin epäpuhtauksien rutii-
nikäsittelyssä

Suoritettiin kaksi koetta, joihin liittyi esimerkin 1 immobilisoidun entsyymin reaktorin tai kolonnin käyttö teollisissa olosuhteissa. Syöttöliuos koostui herapermeaatista pH-arvolla 3,5, jonka sisältämä laktoosi hydrolysoitiin glukoosiksi ja galaktoosiksi. Kolonnin tai reaktorin lämpötila pidettiin 38°C:ssa. Kokeiden aikana poistovirran epäpuhtaus ja immobilisoidun laktaasin aktiivisuus mitattiin päivittäin.

Ensimmäisessä kokeessa esimerkissä 2 reaktori puhdistettiin mikro-organismeista Tego Diocto BS-valmisteella esi-

merkissä 1 kuvatulla tavalla. Reaktoria käsiteltiin sitten päivittäin 30 minuuttia 500 litralla etikkahapon 0,1 paino-%:sta vesiliuosta, joka johdettiin reaktorin läpi 1000 l/h:n nopeudella.

Toisessa kokeessa esimerkissä 3, joka suoritettiin ensimmäisen kokeen jälkeen, reaktori puhdistettiin jälleen epäpuhtauksista Tego Diocto BS-valmisteella esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Reaktori käsiteltiin sitten päivittäin Tego Diocto BS-valmisteella samoissa olosuhteissa kuin ensimmäisen epäpuhtauksien poisto paitsi, että mitään alustavaa huuhtelua ei suoritettu.

Poistovirran epäpuhtaus ilmaistuna mikro-organismien lukumääränä/ml, on koottu taulukkoon II ja immobilisoidun laktaasin aktiivisuus ilmoitettuna kansainvälisinä yksikköinä grammaa kohti immobilisoitua entsyymiä, on koottu taulukkoon III.

TAULUKKO II

Poistovirran epäpuhtauksien yhteenveto

<u>Päivä</u>	<u>Mikro-organismeja yhteensä/ml</u>	<u>Hiivoja/ml</u>
<u>Esimerkki 2</u>		
1	Reaktorin ensimmäinen desinfiointi	
2	180 000	150 000
3	980 000	780 000
4	1 200 000	800 000
5	1 390 000 ^a	940 000
<u>Esimerkki 3</u>		
6	Reaktorin toinen desinfiointi	
7	510	200
8	1 500	800
9	3 300	1 100
10	5 800	1 100
11 ja eteenpäin	Toimenpiteiden jatkaminen ^b	

^aKoe lopetettiin liiallisen saastumisen vuoksi

^bSeuraavat toimenpiteet varmistivat mikrobiepäpuhtauksien pienenemisen tämän keksinnön menetelmän seurauksena.

TAULUKKO III

Yhteenvedo immobilisoidun laktaasin aktiivisuudesta

<u>Päivä</u>	<u>Aktiivisuus, I.U./g</u>	<u>Keskimääräinen aktiivisuus, I.U./g</u>
<u>Esimerkki 2</u>		
1	Reaktorin ensimmäinen desinfiointi	
2	159	
3	184	
4	165	
5	168	169
<u>Esimerkki 3</u>		
6	Reaktorin toinen desinfiointi	
7	161 ^a	
8	189	
9	176	
10	188	
11	204	
12	198	186

^aAktiivisuus vääristyi virtausnopeusongelmien vuoksi.

Esimerkit 2 ja 3 osoittavat selvästi, että tämän keksinnön menetelmä takaa mikrobisaastumisen paljon tehokkaamman torjunnan (vähintään 10^3 -kertaisen) kuin etikkahapon käyttö. Samanaikaisesti tämän keksinnön menetelmä on paljon vaarattomampi immobilisoidulle entsyymille. Itse asiassa Tego Diocto BS n. 0,1-0,5 paino-%:n väkevyyksinä ei vaikuta liukoisen *A. niger*-peräisen laktaasin entsyymaattiseen aktiivisuuteen, ts. entsyymin, jota ei ole immobilisoitu.

Näin ollen esimerkit 2 ja 3 osoittavat selvästi, että tämän keksinnön menetelmä muodostaa valinnaisen desinfiointikäsitteilyn immobilisoidun entsyymin reaktoreille.

Esimerkki 4

Tutkimus koskien tämän keksinnön menetelmän vaikutusta immobilisoituun *A. oryzae*-peräiseen laktaasiin, jota käytetään laktoosin hydrolysointiin

A. Entsymaattisen aktiivisuuden vaihtelu ajan mukana

Immobilisoidun *A. oryzae*-peräisen laktaasin entsymaattisen aktiivisuuden vaihtelut määritettiin laboratorio-olosuhteissa jokaisessa kolmessa eri tapauksessa: (1) immobilisoidun laktaasin käyttö laktaasiliuoksen hydrolysointiin pH-arvolla 4,2 ja 35°C:n lämpötilassa (vertailukoe); (2) immobilisoidun laktaasin käyttö sen jälkeen kun sitä on desinfioitu 30 minuuttia Tego Diocto BS-valmisteen 0,1 paino-%:sella liuoksella, vertailukokeessa käytetyn laktoosiliuoksen hydrolysointiin; ja (3) vertailukokeen immobilisoidun laktaasin käyttö laktoosiliuoksen hydrolysointiin pH-arvolla 4,5 ja 35°C:n lämpötilassa, joka liuos sisältää myös 0,1 paino-% Tego Diocto BS-valmistetta. Saadut tulokset on koottu taulukkoon IV.

TAULUKKO IV

Yhteenvedo entsymaattisen aktiivisuuden vaihteluista ajan mukana

<u>Aika, tuntia</u>	<u>Entsymaattinen aktiivisuus, I.U./g</u>		
	<u>Tapaus 1</u>	<u>Tapaus 2</u>	<u>Tapaus 3</u>
2	114	114	125
3	120	114	125
4	129	119	134
5	124	117	132
keskimäärin	121	116	129

Yllä olevat tulokset osoittavat, että immobilisoidun laktaasin entsyymaattiseen aktiivisuuteen vaikuttaa oleellisesti kosketus desinfioivan liuoksen kanssa ja että laktoosin hydrolyysi sujuu normaalisti jopa desinfiointiaineen läsnäollessa.

B. Toistettujen käsittelyjen vaikutusten vertailu

Kokeet suoritettiin viiden päivän aikana. Joka päivä immobilisoidun *A. oryzae*-peräisen laktaasin panosta käytettiin 16 tuntia laktoosiliuoksen hydrolysointiin pH-arvolla 4 ja 35°C:n lämpötilassa. Immobilisoitua entsyymipanosta käsiteltiin sitten 30 minuuttia fluidisoivissa olosuhteissa joko 1 paino-%:sella etikkahappoliuoksella (vertailukoe) tai 0,1 paino-%:sella Tego Diocto BS-liuoksella (tämän keksinnön mukainen koe). Tulokset esitetään taulukossa V.

TAULUKKO V

Yhteenvedo toistettujen käsittelyjen vaikutuksista entsyymaattiseen aktiivisuuteen

<u>Aika, päiviä</u>	<u>Entsyymaattinen aktiivisuus, I.U./g</u>	
	<u>Vertailukoe</u>	<u>Keksinnön mukainen koe</u>
1	143	135
2	144	151
3	139	127
4	155	144
5	126	124

Yllä olevat tulokset osoittavat, ettei näillä kahdella käsittelyllä saaduilla entsyymaattisilla aktiivisuuksilla ole merkittäviä eroja.

Tämän keksinnön menetelmän käyttöä rutiinikäsittelynä immobilisoidulle *A. oryzae*-peräiselle laktoosille voidaan kuitenkin suositella. Kuten aikaisemmin esitettiin tämän keksinnön menetelmässä käytetyt

desinfiointiaineet ovat paljon tehokkaampia mikrobeja tappavia aineita kuin etikkahappo. Sitäpaitsi tämän keksinnön menetelmällä ei selvästi ole haitallisia vaikutuksia immobilisoituun *A. oryzae*-peräiseen laktaasiin.

Vaikka tätä keksintöä on ensisijaisesti kuvattu immobilisoidun laktaasin desinfioinnin suhteen, on ymmärrettävää, että tämän keksinnön menetelmää voidaan soveltaa muihin immobilisoituihin entsyymeihin. Kuvaamistarkoituksessa vain mainittakoon, että tiettyjä immobilisoituja entsyymisysteemejä käytetään elintarvike- ja farmaseuttisessa teollisuudessa ja niitä ovat mm. immobilisoitu glukoamylaasi, glukoosi-isomeraasi ja penisilliiniasylaasi.

Esimerkki 5 alla kuvaa tämän keksinnön menetelmän soveltamista immobilisoidun glukoosi-isomeraasin desinfiointiin, jota käytetään glukoosin konvertoimiseen fruktoosiksi.

Esimerkki 5

Tämän keksinnön menetelmän vaikutus immobilisoituun glukoosi-isomeraasiin

Glukoosi-isomeraasi immobilisoitiin alumiinioksidikantaineelle menettelyllä, joka on kuvattu US-patentissa n:o 3 868 304 (joka vastaa ranskalaista patenttia n:o 2 218 385). Tämä entsyymi on herkkä sen vesipitoisen väliaineen osmoottisen paineen vaihteluille, joissa se on läsnä. Entsyymiä käytetään teollisesti fruktoosin saamiseen glukoosiliuoksista, jotka sisältävät yhteensä n. 45-50 % kiintoaineita ja joiden pH on n. 8,4 ja lämpötila n. 60°C.

Laboratoriokokeissa, joissa simuloitiin teollisuus-

olosuhteita, tutkittiin seuraavia parametreja:

- A. Entsymaattisen aktiivisuuden häviäminen liittyen vesihuuhteluun pH-arvolla 8,4 ja 60°C:n lämpötilassa.
- B. Entsymaattisen aktiivisuuden häviäminen liittyen samalla pH-arvolla ja samassa lämpötilassa käsittelyyn 0,1 paino-%:sella Tego Diocto BS:n vesiliuoksella.

Entsymaattinen aktiivisuus määriteltiin joka päivä perustuen 16 tunnin jatkuvaan fruktoosituotantoon. Saadut tulokset on koottu taulukkoon VI.

TAULUKKO VI

Veden ja desinfiointiliuoksen vaikutus immobilisoidun glukoosi-isomeraasin entsymaattiseen aktiivisuuteen

<u>Para-</u> <u>metri</u>	<u>Päivä</u>	<u>Reaktorin</u> <u>tuotanto, cm³/h</u>	<u>Konver-</u> <u>sio^a, %</u>	<u>Aktiivisuus</u> <u>I.U./g</u>
A	1	73	39	169
	Vesihuuhtelu 90 minuutin ajan			
	2	72,6	32	116
B	1	77	40	189
	Desinfiointiainekäsittely 90 min. ajan			
	2	77	33	128

^aSyöttöliuoksessa olevan glukoosin fruktoosiksi kon-
vertoitunut prosenttiosuus.

Molemmissa tapauksissa saatiin n. 30 prosenttinen entsymaattisen aktiivisuuden menetys. Tämä menetys aiheutui entsyymin desorptoitumisesta ja eluoitumisesta alumiinioksiditukiaineesta, kun immobili-soitu entsyymi saatettiin alttiiksi laimeammalle liuok-selle, jolla on merkittävästi suurempi osmoottinen paine. Näin ollen mitään havaittavaa entsymaattisen aktiiv-

visuuden laskua ei voida osoittaa johtuvaksi immobilisoidun entsyymin käsittelystä desinfiointiaineella.

On ymmärrettävä, että edellä oleva yksityiskohtainen kuvaus on annettu yksinomaan kuvaamistarkoituksessa ja että siihen voidaan tehdä monia muutoksia poikkeamatta keksinnön henges-
tä ja suojapiiristä. Esimerkiksi sanonnan "immobilisoidut entsyymit" tarkoitetaan tässä käytettynä sisältävän yksit-
täisen entsyymin, joka on immobilisoitu sopivalle kanto-
aineelle ja yksittäisen entsyymityypin, joka on eristetty
kahdesta tai useammasta lähteestä, tai kaksi tai useampaa
entsyymityyppiä, jotka on samalla tavoin immobilisoitu.
Jälkimmäisessä tapauksessa nämä useat entsyymit on voitu
immobilisoida samalle kantoaineelle tai eri kantoaineille,
jotka sitten on sekoitettu yhteen käyttöä varten. Muut
muutokset ovat ilmeisiä alaan normaalisti perehtyneille.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä hiukkasmaiselle kantoaineelle immobilisoidujen entsyymien laktaasin ja glukoosi-isomeraasin desinfioimiseksi, t u n n e t t u siitä, että saatetaan immobilisoidut entsyymit kosketukseen dioktyylidietyleenitriamiinin ja/ tai trioktyylidietyleenitriamiinin laimean vesiliuoksen kanssa, jonka väkevyys ja vaikutusaika riittävät oleellisesti tappamaan saastuttavat mikro-organismit ilman merkittäviä haitallisia vaikutuksia immobilisoituihin entsyymeihin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että laimea vesiliuos sisältää sekä dioktyylidietyleenitriamiinia että trioktyylidietyleenitriamiinia.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoidut entsyymit on sijoitettu reaktoriin, jolla on kolonnimainen rakenne ja laimeaa vesiliuosta johdetaan kolonnin läpi vastavirtaperiaatteella olosuhteissa, jotka riittävät leijuttamaan hiukkasmaisen, immobilisoidun entsyymin.

Patentkrav

Förfarande för desinficering av de på en partikelformig bärarsubstans immobiliserade enzymerna laktas och glukosisomer, k ä n n e t e c k n a t av att de immobiliserade enzymerna bringas i kontakt med en utspädd vattenlösning av dioktyldietylentriamin och/eller trioktyldietylentriamin, vars koncentration och inverkningsperiod är tillräckliga för att väsentligen döda förorenande mikroorganismer utan märkbar skadlig inverkan på de immobiliserade enzymerna.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att den utspädda vattenlösningen innehåller dioktyldietylentriamin och trioktyldietylentriamin.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att de immobiliserade enzymerna är insatta i en reaktor med kolonnartad struktur och den utspädda vattenlösningen ledes genom kolonnen enligt motströmsprincipen under betingelser, som är tillfyllest för att fluidisera det immobiliserade enzymet.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 115 549 (C 07 c 87/20).
Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Ranska-Frankrike(FR) 2 110 303, 2 080 797.