



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149079 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Patentansøgning nr.: 4427/83
(22) Indleveringsdag: 28 sep 1983
(41) Alm. tilgængelig: 07 apr 1984
(44) Fremlagt: 13 jan 1986
(86) International ansøgning nr.: –
(30) Prioritet: 06 okt 1982 DK 4430/82

(51) Int.Cl.⁴: C 12 N 11/00

- (71) Ansøger: *NOVO INDUSTRI A/S; Patent- og Varemærkeafdelingen, Novo Alle, 2880 Bagsværd, DK.
(72) Opfinder: Shmuel *Amotz; DK, Susanne *Rugh; DK, Erik Kjær *Markussen; DK, Kurt *Thomsen; DK.

(74) Fuldmægtig: –

- (54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et immobili-
seret enzympræparat**
(57) Sammendrag:

4427-83

Fremgangsmåden omfatter, at man bringer en bærer, der omfatter to faser, nemlig a) en kontinuerlig fase af et binde-
middel og b) en diskontinuerlig fase af mange separate, hårde
og indifferente partikler, i kontakt med et enzym. Bæreren har
god hårdhed, er i stand til at blive produceret i industriel
skala og under anvendelse af en simpel kemisk behandling og har
lav produktionspris.

DK 149079 B

Opfindelsen omhandler en fremgangsmåde til fremstilling af et partikelformet, immobiliseret enzympræparat bestående af en bærer, på hvis overflade enzymet er bundet. Ved overfladen af bæreren skal her både forstås den eksterne overflade og den 5 interne overflade i tilfælde af en porøs bærer.

Det område, som omfatter bærere til immobilisering af enzymer, er i hastig vækst. Sædvanligvis foreligger bæreren i form af små partikler, som eventuelt er forsynet med tunge bestanddele, og i hvilke enzymet er indlejret, eller på hvis over- 10 flade enzymet er bundet eller fikseret. Der henvises til US patentskrift nr. 4 266 029, US patentskrift nr. 4 116 771 og DK patentskrift nr. 133 380, som kun er tre eksempler på bærere (på hvilke eller i hvilke enzymer er fikseret), der er kendt på området.

15 Den bærer, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hører til den kategori af bærere, på hvis overflade enzymet er bundet, i modsætning til den kategori af bærere, hvor enzymet er fordelt over hele bærerens volumen.

En typisk kendt bærer hørende til denne netop angivne 20 kategori af bærere, på hvis overflade enzymet er bundet, består af granuleret gelatine og er beskrevet i Derwent 08061 C/5 (J 5 4156-892). Partikler af ren gelatine er dog ikke hårde nok til anvendelse i procestrin omfattende en fikseret masse i stor skala, hvor man kræver meget store strømningshastigheder. Desuden 25 er partikler af ren gelatine relativt dyre.

En lignende bærer, der også hører til denne kategori, hvor en indifferent kerne er overtrukket med gelatine, kan fremstilles i henhold til US patentskrift nr. 4 266 029. Selvom denne bærer har gode strømningssegenskaber, lider den af den ulempe, at 30 formen og størrelsen af bæreparklerne ikke kan vælges i overensstemmelse med kriterierne for den bedste drift i en søjle, men er fastsat i kraft af den særlige sandfraktion eller fraktion af andet partikelformet, tungt materiale, der anvendes som råmateriale. Hertil kommer, at det ganske vist er let at 35 fremstille denne bærer på laboratorieskala, men at det er

vanskeligt eller måske umuligt at fremstille denne bærer på industriel skala.

En anden typisk bærer, der hører til denne kategori, er beskrevet i *Advances in Experimental Medicine and Biology*, bind 5 42, side 191 - 212, *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*. Denne bærer består af glasperler med et silan-koblingsmiddel. Disse perler har udmærkede strømningsegenskaber og relativt høj ladekapacitet. De er imidlertid meget dyre, og for at gøre dem velegnet til immobilisering af enzymer må man, ligesom i 10 forbindelse med alle andre uorganiske bærere, udsætte dem for komplicerede kemiske behandlinger, herunder anvendelsen af uønskede materialer.

Det er således opfindelsens formål at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat 15 omfattende en bærer, på hvis overflade enzymet er bundet, hvorved denne bærer udviser alle de ovenfor anførte, fordelagtige egenskaber, d.v.s. tilstrækkelig hårdhed, evne til at kunne produceres i industriel skala og under anvendelse af simpel kemisk behandling, og lav produktionspris.

20 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne. Hvis det medium, hvori det immobiliserede enzympræparat slutteligt skal anvendes, er et vandigt medium, vil det være nødvendigt at uopløseliggøre det 25 (oprindeligt) vandopløselige bindemiddel ved en kemisk eller fysisk behandling, f.eks. ved tværbinding eller opvarmning. Hvis det medium, hvori det immobiliserede enzym slutteligt skal anvendes, er et ikke-vandigt medium, kan det (oprindeligt) vandopløselige bindemiddel være uopløseligt i dette ikke-vandige medium, og 30 i dette tilfælde skal man således ikke nødvendigvis uopløseliggøre bindemidlet. For fuldstændighedens skyld skal der gøres opmærksom på, at bæreren kan indeholde andre komponenter ud over de ovenfor angivne imperative komponenter a) og b), f.eks. fyldstoffer og/eller granuleringshjælpemidler.

Ifølge opfindelsen har det overraskende vist sig, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen opfylder det ovenfor angivne formål med opfindelsen. Det har også overraskende vist sig, at bæreren bibeholder sin udmærkede fysiske integritet selv ved 5 meget høje andele af de indifferente partikler op til ca. 98 vægt%, i forhold til bærerens vægt. Dette er meget vigtigt, eftersom bæreren er desto hårdere og desto billigere, jo større andelen af de indifferente partikler er (op til den ovenfor angivne, øvre grænse).

10 Hvis det immobiliserede enzym er en lipase, og hvis det er tilsigtet, at lipasen skal omestre lipider i en petroletheropløsning, kan man som bindemiddel anvende albumen, casein, sojaprotein, hydroxyethylcellulose, agar, alginat, polyvinylalkoholer, stivelse, methylcellulose eller carboxymethylcellulose, da 15 disse materialer er uopløselige i petrolether. I dette tilfælde er kun en løs binding mellem bæreren og enzymet nødvendig. Hvis på den anden side det enzym, med hvilket bæreren til slut skal anvendes, er amyloglucosidase, og hvis det er tilsigtet, at amyloglucosidasen skal spalte dextriner i vandig opløsning, vil 20 det være nødvendigt at uopløseliggøre det (oprindeligt) vandopløselige bindemiddel. Sædvanligvis vil amyloglucosidasen blive bundet eller fikseret på overfladen af bæreren ved tværbinding med glutaraldehyd.

Det må forstås, at ikke hver eneste kombination af et 25 vilkårligt enzym og to vilkårlige bærefaser a) og b) nødvendigvis er operative. Den sagkyndige vil vide, at nogle enzymer ikke tolererer visse kationer, som i små mængder kan afgives fra fase b), og desuden kan nogle bestanddele fra fase a) i tilfælde af, at det er tilsigtet at anvende det immobiliserede enzym i 30 næringsmiddelindustrien, være mindre ønskværdige p.g.a. diffusion af skadelige bestanddele til det fra enzymreaktoren udgående materiale.

Immobiliseret glucoseisomerase, der ved ionbytning er bundet til en bærer bestående af fibrøst, ionbyttende cellulose 35 inkorporeret i en hydrofob polymer og eventuelt indeholdende et

fortætningsmiddel som pulveriserede metaloxyder er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 1592/78 (Standard Brands), svarende til US-patentskrift nr. 4 110 164 eller BE-patentskrift nr. 865 900. Bæreren fremstilles ved at smelte den hydrofobe polymer og ved at blande cellulosen og fortætningsmidlet i den smeltede polymer. Denne kendte metode medfører imidlertid flere ulemper. For det første er prisen for sådanne hydrofobe polymere temmeligt høj, og for det andet er det meget lettere at arbejde med vandige opløsninger eller suspensioner af bindemidler ifølge opfindelsen end med smeltede, hydrofobe polymere. Desuden er den fremgangsmåde, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 1592/78, ubetinget begrænset til enzymer, der er immobiliserede på ionbyttere, d.v.s. med et monomolekylært enzymlag, hvorimod den foreliggende opfindelse kan tilpasses til alle metoder til binding af enzymer på bæreren, således at der kan fremstilles bærere med både monomolekylære og multimolekylære enzymlag. P.g.a. dette frie valg hvad angår tykkelsen af enzymlaget er det således f.eks. i tilfælde af glucoseisomerase muligt at opnå meget høje værdier for specifik aktivitet ifølge opfindelsen, hvorimod den maksimale værdi for specifik aktivitet af den immobiliserede glucoseisomerase, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 1592/78, er relativt lille og afgjort for lille til industrielle anvendelser.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 2 angivne. Herved fremkommer der billige og let opnåelige bærerpartikler.

Kendte fremgangsmåder til fremstilling af gelatinekugler eller afrundede gelatinepartikler er ret dyre og besværlige. Der skal henvises til DK patentskrift 133 380, hvori det beskrives, at sådanne gelatinepartikler fremstilles ved tilsætning af en vandig opløsning af gelatine (og enzym) til n-butanol og ved separation af de dannede, dråbelignende partikler. Ifølge opfindelsen har det imidlertid vist sig, at kugler eller afrundede partikler af en blanding af et bindemiddel og et

indifferent materiale kan fremstilles på en meget billigere måde, f.eks. ved hjælp af et "Marumerizer" sfæroniseringsapparat (jfr. f.eks. US patentskrift nr. 3 277 520) eller ved hjælp af et specielt granuleringsapparat (jfr. f.eks. US patentskrift nr. 4 106 991). Yderligere meddeler inkorporeringen af et stort antal små, hårde partikler bæreparklerne en høj hårdhed, hvorved deres strømningsegenskaber forbedres væsentligt, hvilket gør dem velegnet til søjleprocesser med meget høj strømningshastighed i stor målestok.

10 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 3 angivne. Herved kan man opnå partikler med meget regelmæssig form.

 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge 15 opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 4 angivne. Herved kan man opnå partikler med meget regelmæssig form og med udmærket kohæsion.

 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af 20 krav 5 angivne. Herved kan man opnå partikler med meget regelmæssig form og med udmærket kohæsion.

 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 6 angivne. På denne måde opnås der en god kombination 25 af lav pris og udmærkede fysiske egenskaber hvad angår bæreren.

 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 7 angivne. Med sådanne dimensioner af de indifferente partikler kan formgivningen gennemføres uden vanskeligheder.

30 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 8 angivne. På denne måde forbedres den mekaniske integritet af bæreparklerne yderligere.

 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge 35 opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af

krav 9 angivne. Herved tilvejebringes der en bærer med et godt kompromis mellem strømningsegenskaber og overfladeareal.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af 5 krav 10 angivne. Herved opnås der en fremragende adhæsion mellem bærer og enzym og dermed et immobiliseret enzympræparat, der har en ekstremt god fysisk stabilitet.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af 10 krav 11 angivne. Herved kan det immobiliserede enzympræparat produceres med en meget høj ladning af enzymet på bæreren.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 12 angivne. Herved kan det immobiliserede enzym 15 fremstilles med en meget høj ladning af enzymet på bæreren.

I relation til de foretrukne udførelsesformer, der er angivet i de to foregående afsnit, skal det tages i betragtning, at bæreren, tværbindingsmidlet, enzymet og yderligere midler, hvis sådanne er tilstede, kan bringes sammen i enhver vilkårlig 20 rækkefølge. Sådanne yderligere midler kan f.eks. være granuleringshjælpemidler (f.eks. cellulosefibre eller meget små, hårde og indifferente partikler), opløselige materialer, der tænkes anvendt som porøsitetsforøgende midler (f.eks. NaCl) eller andre proteiner.

25 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 13 angivne. Det har vist sig, at det således fremstillede immobiliserede glucoseisomerasepræparat kan tilvejebringes i et udmærket aktivitetsudbytte og med overlegne egenskaber hvad angår 30 drift i en kontinuerlig søjle.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan den kontinuerlige fase være et protein, især gelatine, sojaprotein, casein, albumen, zein, gluten, eller et proteinhydrolysat, eller et polysaccharid, især agar, alginat eller andre gummiarter, mel, 35 stivelse eller chitosan eller et syntetisk materiale, såsom

carboxymethylcellulose, methylcellulose, ethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon eller natriumsilikat. Den kontinuerlige fase kan være enhver blanding af de bindemidler, som kan anvendes ved opfindelsen, f.eks. enhver blanding af de ovenfor angivne materialer. Med disse bindemidler er det muligt at frembringe en bærer med udmærkede fysiske egenskaber, selv i det tilfælde, at den kontinuerlige fase er en meget lille andel i forhold til den diskontinuerlige fase.

10 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan den diskontinuerlige fase være diatoméjord, knust sand, murstensstøv, ler, nylonpulver, uopløselige metaloxider eller uopløselige metalsalte, formalet silica, "Aerosil" silica, formalet alumina, korund, formalet glas, formalet flint, formalet kvarts, formalet
15 granit, aluminiumsphosphat, kaolin, bentonit, perlit, zeolitter, calciumsilicat, mikrocellet filterhjælpemiddel, knust magnesiumsilikat, talk, asbest, afslidt hornblende, titandioxid, stannioxid, polerpulver, formalet zirconsilicat, kønrøg, aktivt kul, benmel, flyveaske eller fint metalpulver. Den diskontinuer-
20 lige fase kan være enhver blanding af de separate, hårde og indifferente partikler, der kan anvendes ved opfindelsen, f.eks. enhver blanding af de ovenfor angivne materialer. Disse materialer er billige, og de giver anledning til fremkomsten af en bærer med gode mekaniske egenskaber.

25 Det immobiliserede enzympræparat kan indføres som et lag i en søjle, hvorefter en opløsning af et substrat for enzymet føres gennem dette lag med en hastighed, som muliggør, at i det mindste en del af substratet konverteres af enzymet.

De følgende eksempler illustrerer fremgangsmåden ifølge
30 opfindelsen. I nogle af eksemplerne er kun fremstillingen af bæreren beskrevet. I forbindelse med alle disse eksempler må det forstås, at bæreren behandles med den samme enzymopløsning som den, der er angivet i eksempel 12, og at den behandles yderligere, hvorved der fremstilles et immobiliseret enzympræparat.

I det følgende henvises der til forskellige NOVO-referencer. Kopier af alle disse referencer kan rekvireres fra NOVO Industri A/S, Novo Alle, 2880 Bagsværd, Danmark.

I nogle af disse eksempler er der angivet en værdi for trykfaldet (fysisk styrke) under søjledriften. Denne værdi bestemmes i henhold til AF 166/2, der er en beskrivelse af en laboratoriemetode. Nogle teoretiske betragtninger i forbindelse med denne trykfaldsbestemmelse er beskrevet i Starch/Stärke 31 (1979) nr. 1, side 13 - 16. Med henblik på sammenligning med kendte kommercielle produkter kan det anføres, at de bedste værdier for trykfaldet for de immobiliserede SWEETZYME® gluco-seisomerasepræparater er ca. 10 g/cm^2 . Det fremgår af eksemplerne, at trykfald med de immobiliserede enzympræparater fremstillet ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan være så små som 2 g/cm^2 , og at alle værdier er betydeligt lavere end 10 g/cm^2 , hvilket tydeligt viser den tekniske fordel ved opfindelsen.

Eksempel 1

10 g "Bloom" 260 gelatine blev dispergeret i 60 ml H_2O , der tilsattes 33 g 6% w/v Na-alginat, blandingen blev opvarmet til 60°C for at opløse gelatinen, derpå tilsattes 10 g "Hyflo Celite" diatomejord, hele blandingen blev omrørt i 10 minutter ved 55°C og pumpet gennem en vibrerende injektionssprøjte for at frembringe meget fine, små dråber, som man lod dryppe ind i en 2% w/v $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ opløsning, der blev holdt ved 5°C . De således fremstillede, kuglelignende partikler blev omrørt i CaCl_2 opløsningen i nogle få minutter, og de blev derpå fjernet fra opløsningen og vasket med afioniseret vand, og man lod dem tørre i 2 dage ved stuetemperatur. Partiklerne blev derpå udsat for en mild omrøring i en time i 200 ml 1% w/v glutaraldehydopløsning ved pH 8,5, hvorefter de blev fjernet og vasket i afioniseret vand, og igen lod man dem tørre. På denne måde opnåede man sfæriske og yderst hårde og sammenhængende partikler, der havde en diameter

på ca. 2 mm, og som udviste udmærkede strømningssegenskaber. Trykfaldet var 2 g/cm^2 . Partiklerne kunne behandles med citrat eller phosphat for om ønsket af fjerne Ca^{++} og alginatet, uden nogen skadelig virkning på partiklerne.

5 Eksempel 2

Den i eksempel 1 beskrevne metode blev gentaget, med undtagelse af, at man anvendte halvdelen af gelatinemængden, d.v.s. 5 g, og to gange så meget "Hyflo Celite" diatomejord, d.v.s. 20 g, og at man ikke lod partiklerne tørre før behandling 10 gen med glutaraldehyd. Herved opnåede man partikler, der i det væsentlige var identiske med de i eksempel 1 opnåede partikler, med noget reduceret hårdhed, men dog med næsten de samme udmærkede strømningssegenskaber. Trykfaldet var 3 g/cm^2 .

Eksempel 3

15 Den i eksempel 2 beskrevne metode blev gentaget, med undtagelse af, at man anvendte "Bloom 200" gelatine, og at mængden deraf blev reduceret til 4 g. Koncentrationen af glutaraldehyd blev også reduceret til 0,2% w/v. På denne måde opnåede man partikler, der i det væsentlige havde egenskaber, der 20 var identiske med egenskaberne af de i eksempel 2 angivne partikler.

Eksempel 4

I dette eksempel anvendte man et pilot-plant anlæg. Man sammenblandede således 0,7 kg "Arbocel BC 200" cellulosefibre, 25 2,8 kg "Clarcel Celite" diatomejord og 4 kg 20% w/w opløsning af "Bloom 200" gelatine, alle ved 60°C , i en "Lödige FM 130 D" blander, af den type, der er udstyret med et plovskær, og den således fremkomne, tykke masse blev ekstruderet med en ekstruder, der var forsynet med en 1,5 mm sigte, og derpå sfæroniseret i et

"Marumerizer" sfæroniseringsapparat, som beskrevet i USA pat. nr. 3.287.520. Ekstruderen, der var af tvillingskruetypen, var model EXDC-100, og sfæronisatoren var model Q-400. De således fremkomne partikler blev tørret i et "Glatt" fluidiseringstårn 5 (type WSG 15) og sigtet, og fraktionen 1,2 - 2,0 mm blev opsamlet, idet remanensen blev recirkuleret. En prøve, der vejede 10 g, blev derpå i tre timer behandlet ved stuetemperatur med 100 ml 1% w/v glutaraldehydopløsning, hvis pH var indstillet på 7,0, fjernet fra opløsningen og grundigt vasket med afioniseret vand. 10 Selv uden tørring var de således fremkomne partikler yderst hårde og sammenhængende og med udmærkede strømningsegenskaber. Trykfaldet var 2 g/cm^2 . I dette eksempel udgjorde den diskontinuerlige fase 65 vægt-% af partiklerne.

Eksempel 5

15 I dette eksempel anvendte man det samme "Marumerizer" sfæroniseringsapparat som i eksempel 4, med undtagelse af, at der ikke anvendtes nogen ekstruder. Yderligere blev indholdet af den diskontinuerlige fase hævet til 94% w/w af bærerens totale vægt. Man indførte således 1,5 kg Skamol® lerpartikler med en partikel- 20 størrelse på 0,7 - 1,0 mm i sfæronisatoren, og man tilsatte vekselvis 0,4 kg "Hyflo Celite" diatomejord og 1,15 kg 10% w/w opløsning af "Bloom 80" gelatine ved 60° C, således at man undgik klumpdannelse. De således fremkomne partikler blev behandlet som i eksempel 4, hvorved der dannedes meget hårde partikler med 25 udmærkede strømningsegenskaber. Trykfaldet var 5 g/cm^2 .

Eksempel 6

I dette eksempel indførte man i en granulator hørende til en "Lödige FM 50" blander af plovskærstypen, der var udstyret med et hurtigtgående skæreorgan, som beskrevet i USA patent nr. 30 4.106.991, 5,0 kg "Clarcel Celite" diatomejord, og man sprøjtede 5,95 kg 16% w/w "Bloom 200" gelatine ind deri, hvorved

behandlingstiden og rotationshastighederne for blanderen og skæreorganet blev valgt på en sådan måde, at der fremkom en partikelstørrelse mellem 0,7 og 1,5 mm. Disse partikler blev behandlet som i eksempel 4, hvorved der dannedes bæreparkler 5 med i det væsentlige de samme egenskaber som i eksempel 4. Trykfaldet var 4 g/cm^2 .

Eksempel 7

1 kg cellulosefiber, 4 kg "Clarcel Celite" diatomejord og 10 kg recirculeret materiale fremkommet i henhold til dette eksempel blev besprøjtet med 10,5 kg 10% w/w "Bloom 200" gelatine i en "Lödige" blander med plovskær og af typen FM 130 D, hvorved der dannedes afrundede partikler af varierende størrelse. Under alle de tidligere beskrevne operationer blev både bestanddele og udstyr holdt ved en temperatur af 55°C . De afrundede partikler 15 blev tørret i et tårn med fluidiseret masse og sigtet, og fraktionen 0,5 - 0,7 mm omfattende 32% blev opsamlet. Remanensen, der omfattede grovere partikler, som blev formalet, og fine partikler, som blev anvendt direkte, blev recirkuleret, som beskrevet i begyndelsen af dette eksempel.

20 Eksempel 8

Til den samme blander som i eksempel 4, d.v.s. "Lödige FM 130 D" blander, tilførte man 3 kg cellulosefiber, 10,5 kg "Clarcel Celite" diatomejord, og 1,5 kg albumen ved omgivelsernes temperatur, og der sprøjtedes med 15,2 kg vand. Behandlingstiden 25 og rotationshastighederne af blanderen og skæreren blev valgt på en sådan måde, at der fremkom partikler med den ønskede størrelse. Partiklerne blev tørret i en fluidiseret masse, og en sigteanalyse på de tørrede partikler viste følgende partikelstørrelsesfordeling:

30	> 1000 μm	19,7%
	> 850 -	35,6%

> 707 -	58,8%
> 600 -	78,2%
> 500 -	92,1%
< 420 -	1,1%

5 Eksempel 9

Man gentog metoden fra eksempel 8, med undtagelse af, at man i stedet for albumen anvendte 1,5 kg isoelektrisk opløseligt sojaproteinhydrolysat, og at vandmængden var 14,8 kg. Sigteanalyse på de tørrede partikler viste følgende

10 partikelstørrelsesfordeling:

	> 1000 μm	24,2%
	> 850 -	43,2%
	> 707 -	66,1%
	> 600 -	84,2%
15	> 500 -	95,2%
	< 420 -	1,0%

Eksempel 10

Til den samme blander som i eksempel 6, d.v.s. "Lödige FM 50" blander, tilførte man 11,3 kg Al_2O_3 og 3,0 kg cellulosefibre, og der sprøjtedes med 650 g "Bloom 200" gelatine i 4,55 kg vand. Temperaturen blev holdt på 55°C. De partikler, der dannedes ved rotationen af blanderen og skæreren, blev tørret i en fluidiseret masse. Med sigteanalyse konstateredes følgende partikelstørrelsesfordeling:

25	> 1000 μm	8,5%
	> 850 -	16,1%
	> 707 -	31,2%
	> 600 -	46,2%
	> 500 -	65,3%
30	< 420 -	15,6%

Eksempel 11

Til "Lödige FM 130 D" blanderen tilførte man 2,1 kg cellulosefibre, 8,4 kg "Clarcel Celite" diatomejord og 4,5 kg natriumchlorid, og der sprøjtedes med 11,0 kg 10% (w/w) Bloom 80 5 gelatine. Temperaturen var 55°C. Partiklerne blev dannet og tørret. Ved sigteanalyse konstaterede man følgende partikelstørrelse:

	> 1000 µm	14,2%
	> 850 -	23,7%
10	> 707 -	40,1%
	> 600 -	59,1%
	> 500 -	79,1%
	< 420 -	5,8%

Eksempel 12

15 Dette eksempel beskriver en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat. Man fluidiserede således 4,5 kg bærerpartikler fremstillet som i eksempel 4 og behandlet med glutaraldehyd, vasket og tørret, i et apparat med fluidiseret masse af pilot-plant typen ("Glatt", type 20 WSG 15), og 9,3 kg opløsning af 19% w/w delvist rensat glucoseisomerase fra *Bacillus coagulans* NRRL 5650 (aktivitet 3240 enheder/g tørstof, hvorved aktivitetseenheden er defineret i NOVO analyseforskrift AF 189/1) blev sprøjtet på partiklerne ved 50 - 55° C, og man lod partiklerne tørre. Det således opnåede produkt 25 indeholdt 28 vægt-% delvist rensat glucoseisomerase, og aktivitetsgenvindingen var 85%. 20 g af disse partikler blev derpå behandlet i 500 ml opløsning indeholdende 0,06 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,4 M Na_2SO_4 og 0,1% w/v glutaraldehyd, og pH blev indstillet på 7,0 med 1 N NaOH. Efter 1 time ved stuetemperatur blev partikler- 30 ne fjernet og vasket grundigt med 0,06 M natriumphosphat med pH 7,0 og derefter overfladisk med afioniseret vand, og man lod en del af dem tørre. Både de våde og de tørrede partikler udviste de samme udmærkede strømningsegenskaber som den oprindelige bærer,

og man kunne ikke iagttage nogen bortsvivning af aktivitet. I de våde partikler var aktivitetsgenvindingen imidlertid 70%, medens den i de tørrede partikler kun var 48%.

Eksempel 13

- 5 20 g tørrede bærerpartikler, der var fremstillet som i eksempel 4, blev fluidiseret i en fluidiseret masse af laboratorietypen. 45,8 g af 11,0% w/w homogeniseret celleslam (fermenteret som angivet i eksempel 1 af dansk patentansøgning nr. 5190/79, slam produceret som angivet i eksempel 4 af dansk
- 10 patentansøgning nr. 5190/79) indeholdende 80,1 enheder/g thermophil lactase fra *Bacillus species* NRRL B-11.229 blev sprøjtet på bærerpartiklerne ved 30 - 40°C, og man lod de overtrukne partikler tørre. Lactaseaktivitetseenheden er defineret som den mængde lactase, som vil spalte 1 μmol lactose/minut under følgende
- 15 reaktionsbetingelser: substratkoncentration = 10% lactose, temperatur = 60°C, pH = 6,5 og reaktionstid = 30 minutter. Udbyttet af enzymaktivitet var 79,8%. 10 g overtrukne kugler blev derpå behandlet i 250 ml opløsning indeholdende 0,06 M Na_2HPO_4 , 1,4 M Na_2SO_4 og 0,1% w/v glutaraldehyd ved pH 7,5. Efter 1 time ved
- 20 stuetemperatur blev partiklerne fjernet og grundigt vasket med 0,06 M K_2HPO_4 ved pH 7,5. Udbyttet af enzymaktivitet under tværbindingstrinnet var 17,2%.

Eksempel 14

- 24 g tørrede bærerpartikler fremstillet som i eksempel
- 25 4 blev udblødt i 20,2 g opløsning af en 39,6% w/w delvist rensed amyloglucosidase fra *A. niger* produceret ved ultrafiltrering af det kommercielle produkt "AMG 200 L" (beskrevet i NOVO-brochuren AMG, B 020 g - GB 2500 July 1982) for at fjerne lavmolekylære bestanddele til et tørstofindhold af 39,6% w/w (aktivitet 2610
- 30 IAG/g, hvorved aktivitetsenheden er defineret i NOVO Analyseforskrift AF 159/2). Man vacuumbehandlede i 1 time. Det således

fremkomne produkt indeholdt 25 vægt% enzymtørstof med 77,9% udbytte af enzymaktivitet.

20 g partikler med 71,8% tørstof blev derpå behandlet i 1600 ml af en opløsning af 1% w/v NaH_2PO_4 , 20% w/v Na_2SO_4 og 0,2% 5 glutaraldehyd ved pH = 4,5. Efter 1 time blev partiklerne fjernet ved filtrering og vasket med 1% NaH_2PO_4 ved pH = 4,5.

Udbyttet af enzymaktivitet under tværbindingstrinnet var 55,1%.

Eksempel 15

10 40 g bærerpartikler fremstillet som angivet i eksempel 4 og med et tørstofindhold på 98,8% og 24 g vacuumfordampet, delvist rensat glucoseisomerasekoncentrat fra *Bacillus coagulans* (NRRL 5650), hvortil der var tilsat 5% glucose og 8% natriumsulphat (tørstof 41,8%) blev blandet, og man lod væsken fortrænge 15 luften i porerne af partiklerne ved vacuumbehandling. Vægt efter blanding var 63,22 g. Tørstof var 79,2%.

18 gram portioner af dette præparat (14 g tørstof) blev i 1 time ved stuetemperatur behandlet med 375 ml af en opløsning, som i alle tilfælde indeholdt 22% natriumsulphat, 5% 20 glucose og 1% natriumphosphat, indstillet til pH 7,5, og som yderligere indeholdt enten 0,1, 0,2 eller 0,3% glutaraldehyd.

Efter denne behandling blev præparaterne vasket fem gange med ca. 150 ml 1% natriumphosphat, pH 7,5. Enzymaktiviteten blev bestemt i henhold til AF 189/1 efter at væsken var løbet 25 bort fra partiklerne. Man bestemte også tørstof på de drænedes partikler.

	% tør- stof	enhe- der/g våd	enhe- der/g tør	udbyt- te, %	immobilise- ringsudbytte, %
5 Enzymkoncentrat	41,8	1415	3385	-	-
Enzymkoncentrat + bærer	79,2	463	585	86	-
Immobiliseret med 0,1% GA	32,5	158	486	72	83
10 Immobiliseret med 0,2% GA	38,9	141	362	53	62
Immobiliseret med 0,3% GA	-	117	333	49	57

Man undersøgte trykfaldet med portioner, der var ækvi-
15 valente med 5 g tørstof.

	Glutaraldehyd- koncentration under immobi- lisering	Trykfald	
		25 timer	50 timer
20	0,1%	3	5
	0,2%	1	3
	0,3%	2	3

Eksempel 16

25 Til den samme blander som i eksempel 4, d.v.s. "Lödige
FM 130 D" blander, tilførte man 3 kg cellulosefibre og 13,5 kg
"Clarcel Celite" diatomejord, og der sprøjtedes med 15 kg 10% w/v
"PEI 15 T" polyethylenimin, Taihei Sangyo Kaisha Ltd., ved
omgivelsernes temperatur, derpå med 3,0 kg vand og slutteligt med
30 2 kg 50% w/v glutaraldehyd. Behandlingstiden og rotationshastig-

hederne af blanderen og skæreren blev valgt sådan, at der dannedes partikler med den foretrukne partikelstørrelse. Partiklerne blev tørret i en fluidiseret masse.

Eksempel 17

- 5 Til den samme blander som i eksempel 4, d.v.s. "Lödige FM 130 D" blander, tilførte man 3 kg cellulosefibre og 12,0 kg "Picactif FGV" aktivt kul (fra firmaet Pica S.A., Levallois, Cedex, Frankrig), og der sprøjtedes med 20,0 kg 10% w/w opløsning af "Bloom 200" gelatine og slutteligt med 4,5 kg vand.
- 10 Behandlingstiden og rotationshastighederne af blanderen og skæreren blev valgt sådan, at der dannedes partikler med den foretrukne partikelstørrelse. Partiklerne blev tørret i en fluidiseret masse.

Anvendeligheden af et immobiliseret enzymprodukt fremstillet ifølge opfindelsen fremgår af det følgende anvendelsesforsøg. Man fremstillede et immobiliseret glucoseisomeraseprodukt generelt som i eksempel 12. Produktet indeholdt 32,6 vægt% delvist rensat glucoseisomerase, og tværbindingen blev gennemført som i eksempel 12.

- 20 Efter vaskningen med 1% w/v natriumphosphat (pH = 7,0) fyldte man 27,6 g fugtige partikler, svarende til 10 g partikel-tørstof, i en med vandkappe forsynet søjle med en diameter på 1,5 cm. Søjlen blev holdt på 65°C, og man pumpede kontinuerligt en 45% w/w glucosesirup ved pH 7,8 (indstillet med Na₂CO₃) gennem
- 25 enzymmassen med en hastighed, som vil muliggøre en konvertering af glucose til fructose på 40 - 42%. Den initiale aktivitet var 538 IGIC/g præparattørstof (hvorved aktiviteten beregnes i henhold til NOVO Analyseforskrift AF 147/6), og aktivitetens halveringstid blev bestemt til 450 timer. Udgangs-pH var 7,4 - 7,5.
- 30 Med henblik på sammenligning kan det nævnes, at det vidt udbredte, kommercielle, immobiliserede SWEETZYME® glucoseisomerase har en aktivitet på 225 - 300 IGIC/g og en lignende halveringstid for aktiviteten, og at man med SWEETZYME®

glucoseisomerase under de samme betingelser som før angivet,
d.v.s. 65°C og 45% w/w glucosesirup, må gøre brug af et
indgangs-pH på 8,2 for at opnå et udgangs-pH på 7,4 - 7,5.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et partikelformet, immobiliseret enzympræparat omfattende en bærer, på hvis overflade enzymet er bundet, k e n d e t e g n e t ved, at bæreren
5 dannes ved kombination af to faser, nemlig a) en kontinuerlig fase af et vandopløseligt bindemiddel, der i det mindste delvist er opløst eller dispergeret i et vandigt medium, og b) en diskontinuerlig fase af en mængde separate, hårde og indifferente partikler, hvis størrelse er så ringe, at den ikke interfererer
10 med bærerens formgivning, at bindemidlet om nødvendigt gøres uopløseligt i det medium, hvori enzymet slutteligt vil blive anvendt, og at bæreren bringes i kontakt med et enzym, som bindes til bærerens overflade.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at kombinationen af de to komponenter er en blanding af den kontinuerlige fase og den diskontinuerlige fase, og at blandingen derpå formgives til den partikelformede bærer, fortrinsvis ved sfæronisering.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at bindemidlet består af eller indeholder et gelerbart middel, og at blandingen ekstruderes eller dryppes i et gelerende medium, hvorved et tværbindingsmiddel kan tilsættes på ethvert stadium.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at det gelerbare middel er gelatine, alginat, carrageenan eller chitosan.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at det gelerende medium er en opløsning, som indeholder Ca^{++} , Ba^{++} , K^{+} , polyphosphat eller ferricyanid eller koldt vand
30 eller en strøm af kold luft.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 5, k e n d e t e g n e t ved, at mængden af den diskontinuerlige fase ligger mellem ca. 10 og ca. 98 vægt%, i forhold til den totale vægt af bæreren, fortrinsvis mellem 50 og 95 vægt%, i forhold til den totale vægt af 5 bæreren.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 6, k e n d e t e g n e t ved, at den lineære størrelse af en enkelt indifferent partikel i den diskontinuerlige fase, beregnet som diameteren af den kugle, der har samme volumen som den enkelte, indifferente partikel, er 10 under 1/5 af diameteren af bærerpartiklen, fortrinsvis mindre end 1/20 af diameteren af bærerpartiklen.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 7, k e n d e t e g n e t ved, at den kontinuerlige fase uopløseliggøres ved at blive tværbundet ved hjælp af et passende tværbindingsmiddel, fortrins- 15 vis glutaraldehyd.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 8, k e n d e t e g n e t ved, at formen af bæreren er sfærisk eller afrundet, og at den gennemsnitlige bærer diameter er mellem 0,1 og 5 mm, fortrinsvis mellem 0,2 og 2 mm, især mellem 0,2 og 1 mm.
- 20 10. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 9, k e n d e t e g n e t ved, at bæreren behandles med en opløsning af enzymet og med et tværbindingsmiddel.
11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at bæreren indføres i et tårn som en fluidiseret masse, og 25 at opløsningen af opløseligt enzym indføres i tårnet som et indsprøjtet materiale, hvorefter den således fremkomne masse fjernes fra tårnet og behandles med tværbindingsmidlet.
12. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at bæreren indføres i et tårn som en fluidiseret masse, og 30 at en blanding af opløsningen af opløseligt enzym og et tværbindingsmiddel indføres i tårnet som et indsprøjtet materiale, hvorefter den således fremkomne masse fjernes fra tårnet.
13. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 12, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er en glucoseisomerase, fortrinsvis hidrørende 35 fra *Bacillus coagulans*.

Fremdragne publikationer:
