



FI000101400B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 101400 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.06.98

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 12N 11/06, 9/92

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 882732

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 09.06.88

(24) Alkupaivä - Löpdag 09.06.88

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 11.12.88

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

10.06.87 DE 3719324 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Kali-Chemie Aktiengesellschaft, Postfach 220, Hans-Böckler-Allee 20, 3000 Hannover, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Mücke, Ingo, Schmiedekampstrasse 2, 3012 Barsinghausen, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Borenus & Co Oy Ab, Kansakoulukuja 3, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kantajaan sidottujen entsyymien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av bärarbundna enzymer

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 832633 (C 12N 11/14), FI A 863782 (C 12N 11/14), FI C 62139 (C 12N 11/14),
FI C 72142 (C 12P 19/24), FI C 80474 (C 12P 19/24), US A 3519538 (C 07G 7/04),
US A 3796634 (C 07G 7/02), US A 4251631 (C 12P 13/04), US A 4337172 (B 01J 31/06)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön mukaan kantajiin sidottujen entsyymien stabiilisuutta voidaan parantaa huomattavasti, mikäli ne käsitellään lisäksi bifunktionaalisella, ristisidoksia muodostavalla aineella sekä polyaminiilla.

Enligt uppfinningen kan man märkbart förbättra stabiliteten hos bärarbundna enzymer ifall man ytterligare behandlar enzymerna med ett bifunktionellt tvärbindningsmedel.

Menetelmä kantajaan sidottujen entsyymien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av bärarbundna enzymer.

Keksintö kohdistuu menetelmään kantajaan sidottujen entsyymien valmistamiseksi, jossa menetelmässä kantajaan, jonka käsittämät funktionaaliset ryhmät kykenevät muodostamaan kovalenttisia sidoksia, liitetään entsyymi.

Entsyymillä katalysoituja reaktioita toteutettaessa vaihtoehtoina voivat periaatteessa tulla kysymykseen homogeenisesti katalysoidut prosessit vapaita entsyymejä käyttäen sekä heterogeenisesti katalysoidut prosessit kantajaan sidottuja entsyymejä käyttäen. Vapaisiin entsyymeihin verrattuna kantajaan sidotuilla entsyymeillä on lukuisia etuja, joista voidaan mainita ennen kaikkea se, että niiden käyttäminen uudestaan on helppompaa ja että ne soveltuvat erinomaisesti jatkuviin prosesseihin. Käyttökelpoisina kantajina tulevat kysymykseen sekä orgaanista että epäorgaanista materiaalia olevat kantajat. Eri-tyisesti jatkuvissa, teollisessa mitassa toteutettavissa prosesseissa, joissa käytetään kantajaan sidottuja entsyymejä pylväsreaktoreissa vastaavana panostuskorkeutena, epäorgaanisten kantajien etuna on pienempi kokoonpuristuvuus. Toisaalta taas kuitenkin orgaanisissa kantajissa on tavallisesti luonnostaan sellaisia funktionaalisia ryhmiä, joihin entsyymit voivat sitoutua, kun taas epäorgaanisista kantajista tällaiset funktionaaliset ryhmät yleensä puuttuvat. Näin ollen epäorgaanisiin kantajiin on liitettävä erityisessä vaiheessa tällaisia funktionaalisia ryhmiä. Tähän tarkoitukseen käytetään nykyään pääasiallisesti käsittelyä silaaneilla, joissa on epäorgaanisia funktionaalisia ja orgaanisia funktionaalisia jäännöksiä. Klassinen esimerkki tällaisista silaaneista on gamma-aminopropyyli-trietoksi-silaani, joilla kantajaan saadaan aikaan Si-O-sidos etoksiryhmiä hydrolysoimalla, kun taas orgaanisina funktionaalisina jäännöksinä aminopropyyli-ryhmä voi liittää sidoksia entsyymiin suuntaan.

Täten esimerkiksi julkaisussa DE-1944418-B2, joka on tärkein kirjallisuuslähde edellä mainitun kaltaista menetelmää ajattel-
len, ehdotetaan, että epäorgaaniset kantajat käsitellään mai-
nitun kaltaisilla silaaneilla, minkä jälkeen entsyymit sido-
taan suoraan tai "välittäjäryhmän" avulla tällä tavalla funk-
tionaaliseksi saatuun kantajaan, jota kutsutaan mainituksa
julkaisussa aminoalkyyilisilaanijohdannaiseksi. Julkaisussa
mainitaan sopivina epäorgaanisina kantajina piitä sisältämät-
tömät metallioksidit kuten esimerkiksi alumiinioksidi, hydrok-
syyliapatiitti tai nikkelioksidi, sekä piitä sisältävinä ai-
neina huokoinen lasi, piimaa, wollastoniitti, silikageeli tai
bentoniitti.

Julkaistu DE-1944418-B2, jossa kuvataan alussa mainittu mene-
telmä, on mielenkiintoinen, koska siinä esitetään, että ja
miten epäorgaanisia kantajia voidaan käyttää kantajaan sidot-
tujen entsyymien valmistamiseen, kun taas julkaisussa
DE-2726188-C2 (vastaa julkaisua EP-28-B1) on kehitelty alussa
mainittua menetelmää edelleen esittämällä, miten useampien
kysymykseen tulevien kantajien joukosta saadaan selville se
kantaja, joka on optimaalinen huokoskoon ja huokosten jakautu-
misen suhteen, ja millaisen tulee olla sen entsyymiliuoksen,
jonka kanssa funktionaaliseksi tehty kantaja on tarkoitus
saattaa reagoimaan, pitoisuus, jotta mahdollisimman pienellä
entsyymimäärällä saataisiin mahdollisimman aktiivinen valmis-
te, jonka ominaisuutena on erityisesti myös se, että kantajaan
sidotun entsyymin aktiivisuus on yhtäsuuri tai ainoastaan
vähän pienempi kuin vapaan entsyymin aktiivisuus.

Vaikka julkaisun DE-2726188-C2 mukaisella menetelmällä voi-
daankin valmistaa erinomaisia kantajaan sidottuja entsyymejä,
joiden alkuaktiivisuus on suuri, niin ei kuitenkaan ainoastaan
näiden, vaan periaatteessa kaikkien kantajaan sidottujen ent-
syymien haittana on vain rajallinen stabiilisuus, toisin sano-
en kantajaan sidotun entsyymin aktiivisuus heikkenee enemmän
tai vähemmän käytössä siihen kohdistuvien vaikutusten seurauk-
sena.

Tämä haitta pyritään poistamaan julkaisussa DE-3148603-C1 (vastaa julkaisua EP-81185-B1) SiO_2 -kantajaan perustuen valmistetun, kantajaan sidotun entsyymin tapauksessa siten, että substraatti saatetaan kosketukseen SiO_2 - tai aluminosilikaattimuodosteiden kanssa ennen kantajaan sidotussa entsyymissä tapahtuvaa reaktiota. Vaihtoehtoisesti julkaisussa DE-3405035-C1 (vastaa julkaisua EP-152036-A2) ehdotetaan kantajan suhteen samankaltaisen kantajaan sidotun entsyymin tapauksessa, että substraattiin lisätään vesiliukoista silikaattia. Molemmat viimeksi mainitut parannukset rajoittuvat kuitenkin sellaisiin kantajaan sidottuihin entsyymeihin, joiden kantajat ovat kokonaan tai olennaiselta osaltaan pihappopitoista materiaalia.

Keksinnön tehtävänä on näin ollen saada aikaan menetelmä, joka parantaa kantajiin sidottujen entsyymien stabiilisuutta, ja jota voidaan myös käyttää sellaisten kantajiin sidottujen entsyymien tapauksessa, joiden entsyymien kantajat ovat jotakin muuta kuin pihappopitoista materiaalia.

Tähän päästään keksinnön mukaisesti siten, että kantajaan sidottu entsyymi käsitellään lisäksi mielivaltaisessa järjestyksessä bifunktionaalisella, ristisidoksia muodostavalla aineella ja polyamiinilla. Keksinnön tunnusmerkit ilmenevät oheisista patenttivaatimuksista.

Bifunktionaalisilla, ristisidoksia muodostavilla aineilla tarkoitetaan sellaisia aineita, kuten glutaaridialdehydiä, tolueenidi-isosyanaattia, heksametyleenidi-isosyanaattia, jne. Keksinnössä käytetään edullisesti glutaaridialdehydiä. Polyamineilla tarkoitetaan sellaisia vesiliukoisia aineita, kuten etyleenidiamiinia, dietyleenitriamiinia, trietyleenitetra-amiinia, tetraetyleenipenta-amiinia, pentaetyleeniheksa-amiinia, heksametyleenidiamiinia, polyetylenei-imiiniä, jne. Keksinnössä käytetään edullisesti polyetylenei-imiiniä, myös haaraketjuista polyetylenei-imiiniä, jonka molekyylipaino on korkeintaan 2 000 000 Daltonia, ja jonka molekyylipaino on edullisesti alueella 600...1 000 000 Daltonia.

Käyttämällä keksinnön mukaista ylimääräistä käsittelyä bifunktionaalisella, ristisidoksia muodostavalla aineella ja polyamiinilla, erityisesti glutaaridialdehydillä ja polyetyleniimiinillä, voidaan valmistaa huomattavasti stabiilimpia kantajiin sidottuja entsyymejä kuin tunnetuilla menetelmillä.

Glutardialdehydin ja polyetyleni-imiinin käyttö kantajiin sidottuja entsyymejä valmistettaessa on sinänsä tunnettua. Esimerkiksi julkaisussa DE-2605797-B2 (vastaa julkaisua US-4141857-A) kuvataan epäorgaanisten huokoisten kantajien käsittely polyetyleni-imiinillä ja glutaaridialdehydillä yhdistetyn orgaanis-epäorgaanisen perusmateriaalin, kuten julkaisussa mainitaan, tuottamiseksi epäorgaanisesta huokoisesta kantajasta, jonka huokosiin on adsorboitunut ja joiden huokosten sisään on sulkeutunut orgaanista polymeerimateriaalia. Entsyymi sidotaan tähän orgaaniseen polymeerimateriaaliin tämän jälkeen seuraavassa vaiheessa.

Kantajen käsitteleminen polyetyleni-imiinillä ja glutaaridialdehydillä vastaa siis edellä mainittua silanointia niin, että itse asiassa kantajan ja entsyymin väliin muodostetaan välikerros, joka kykenee muodostamaan toisaalta sidoksen kantajan kanssa - silanoinnin tapauksessa siloksaanin muodostumisen seurauksena, polyetyleni-imiinillä ja glutaaridialdehydillä käsittelemisen tapauksessa kantajan huokosissa syntyneen polymeerin muotoliitoksen avulla - sekä toisaalta sidoksen entsyymin kanssa. Toisin sanoen, "yhdistetty orgaanis-epäorgaaninen perusmateriaali", joka saadaan käsittelemällä huokoinen epäorgaaninen kantaja polyetyleni-imiinillä ja glutaaridialdehydillä, vastaa alaan liittyvässä menetelmässä määriteltä "kantajaa, joka käsittää kovalenttisten sidosten muodostamiseen kykeneviä funktionaalisia ryhmiä".

Julkaisussa DE-2605797-B2 kantaja käsitellään polyetyleni-imiinillä ja glutaaridialdehydillä ennen reaktiota entsyymin kanssa, kun taas sitä vastoin keksinnössä käsitteleminen poly-

etyleeni-imiinillä ja glutaaridialdehydillä toteutetaan ylimääräisenä toimenpiteenä vasta sitten, kun entsyymi on jo sidottu kantajaan.

Julkaisun DE-2605797-B2 yhteydessä esitetty pätee myös julkaisuun US-4438196-A, jossa julkaisun DE-2605797-B2 mukaista yhdistettyä orgaanis-epäorgaanista perusmateriaalia vastaavan tuotteen muodostamiseksi aktiivihiiolta käsitellään polyetyleenin-imiinillä ja glutaaridialdehydillä.

Vieläkin kauempana ovat ne polyetyleenin-imiiniä käyttävät menetelmät, joita edustaa esimerkiksi julkaisu EP-133531-B1, ja joissa polyetyleenin-imiiniä käytetään mahdollisesti muihin aineisiin yhdistettynä veteen liuenneita entsyymejä tai veteen suspendoituneita, solun sisäisiä entsyymejä sisältävien mikro-organismisolujen erottamiseen höytälöittämällä. Tämän jälkeen höytälöittämällä erotetusta materiaalista valmistetaan seuraavissa vaiheissa immobilisoituja biokatalyyttejä.

Keksinnön mukainen käsittely glutaaridialdehydillä ja polyetyleenin-imiinillä voidaan toteuttaa mielivaltaisessa järjestyksessä.

Glutaaridialdehydillä käsiteltäessä katalyytin yhtä grammaa kohden, kuiva-aineena laskien, käytetään 5...500 mg, edullisesti 25...250 mg, glutaaridialdehydiä. Katalyytin kuiva-aineella tarkoitetaan tällöin silaanilla käsitellyn kantajan painoa, kantajaan sidottu entsyymi mukaan lukien. Koska kantajaan sitoutuneen silaanin ja siihen sitoutuneen entsyymin massat ovat vain murto-osa kantajan massasta, niin katalyytin kuiva-aine voidaan olettaa yhtäsuureksi kuin kantajan massa. Käsittely toteutetaan edullisesti glutaaridialdehydin vesiliuoksella, jonka pitoisuus (w/v) on 0,1...10 %, mielellään 0,5...5 %, pH-arvon ollessa 4...9, mielellään 5...8, ja käsittelyn kestäessä 15...120 minuuttia, mielellään 30...60 minuuttia.

Käsittely polyetyleenimiiniinillä toteutetaan tarkoituksenmukaisesti polyetyleenimiinin vesiliuoksella, jonka pitoisuus (w/v) on 0,1...20 %, mielellään 0,5...8 %. Tässä käsittelyssä polyetyleenimiiniä käytetään edullisesti 3...600 mg, mielellään 15...240 mg katalyytin yhtä grammaa kohden, kuivapainona laskien. Käsittelyn aikana pH-arvo asetetaan sopivasti alueelle 4...9, mielellään 5...8. On järkevää, että käsittely kestää vähintään 5 minuuttia, edullisesti mielellään 15 minuuttia. Polyetyleenimiiniinillä käsittelyn ajallinen yläraja riippuu siitä, kuinka paljon polyetyleenimiiniä käytetään katalyytin kuiva-aineen yhtä grammaa kohden, sekä käytetyn polyetyleenimiiniliuoksen pitoisuudesta. Keksinnön mukaisesti korkeintaan 24 tunnin pituinen ajanjakso on riittävä, ja tyydyttäviä tuloksia saadaan jo 12 tunnin kuluttua. 24 tuntia pitempi käsittely ei tuota enää mitään erityistä lisävaikutusta.

Periaatteessa keksinnön mukaisessa menetelmässä kantajana voidaan käyttää kaikkia myös muuten käyttökelpoisia kantajia. Keksinnössä käytetään edullisesti huokoisia epäorgaanisia kantajia, jotka perustuvat metallioksidin tai silikaattiin. Tyypillisiä esimerkkejä ovat alumiinioksidi, zirkoniumoksidi, magnesiumoksidi, piidioksidi, näiden oksidien sekaoksidit, aluminosilikaatit sekä zeoliitit. Keksinnössä käytetään erityisen edullisesti kantajia alumiinioksidista ja piidioksidista.

Kantajaan sidottava entsyymi voi olla oksidoreduktaasi, transferaasi, hydrogenaasi, lyasaasi, ligaasi tai isomeraasi. Keksinnön mukaisessa menetelmässä entsyymeinä tulevat kysymykseen erityisesti ne, joita käytetään teollisissa prosesseissa, kuten esimerkiksi glukoamylaasi, glukoosioksidaasi, laktaasi, trypsiini, pepsini, papaiini, muut proteaasit, lipaasi, pektinaasi, invertaasi, fumaraasi, aspartaasi, ureaasi, aminohap-po-oksidaasi, penisillinasyaasi, glukoosi-isomeraasi. Erityisen edullinen on glukoosi-isomeraasi.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä edelleen.

Lähtö- ja vertailupreparaattien valmistaminen

Käyttäen hyväksi patenttijulkaisun DE-2726188-C2 mukaista menetelmää, ajatellen erityisesti entsyymiliuoksen optimaalisen pitoisuuden määrittämistä, SiO_2 -kantajasta, jonka hiukkaskoko oli 0,1...0,2 mm, ja jossa huokosten tavallisin halkaisija oli 430 Å, valmistettiin kantajaan sidottu glukoosi-isomeraasipreparaatti, minkä lisäksi entsyymiin muodostettiin ristisidoksia glutaaridialdehydillä keksinnön erään osapiirteen mukaisesti.

Ristisidosten muodostamiseksi entsyymiin preparaattia käsiteltiin 30 minuuttia glutaaridialdehydiä sisältävässä kiinnityspuskurissa (50 mM fosfaattipuskuria, pH 6, joka sisältää 0,4 mM yhdistettä MgSO_4), johon oli lisätty niin paljon väkevämpää glutaaridialdehydiliuosta, että siinä glutaaridialdehydin pitoisuus (w/v) oli 1 %. Glutaaridialdehydiä käytettiin määrä, joka oli 40 mg/g katalyytin kuiva-ainetta. Sen jälkeen, kun preparaatti, johon oli muodostettu ristisidoksia, oli pesty glutaaridialdehydiä sisältämättömällä kiinnityspuskurilla, sitä säilytettiin muuhun käyttöön saakka varastointipuskurissa (50 mM fosfaattipuskuri, pH 6, joka sisältää 0,4 mM yhdistettä MgSO_2 ja yhteensä 2000 ppm para-hydroksibentsoehapon esterinä). Tätä preparaattia kutsutaan seuraavassa "standardi-1"-preparaatiksi.

Analogisella tavalla alumiinioksidikantajasta, jonka hiukkaskoko oli 0,3...0,6 mm, ja jossa huokosten tavallisin halkaisija oli 340 Å, valmistettiin kantajaan sidottu glukoosi-isomeraasipreparaatti, ja entsyymiin muodostettiin ristisidoksia glutaaridialdehydillä. Tätä valmistetta nimitetään seuraavassa "standardi-2"-preparaatiksi. Myös tätä preparaattia säilytettiin muuhun käyttöön saakka edellä kuvatun kaltaisessa varastointipuskurissa.

Esimerkki 1

Samalla tavalla kuin "standardi-1"-preparaatin yhteydessä koh-

dassa "lähtö- ja vertailupreparaattien valmistaminen" esitettiin, tässä esimerkissä valmistettiin preparaatteja, jotka käsiteltiin polyetyleenimiiniin (alkuperä luettelon 1 mukainen) 0,5-prosenttisella (w/v) vesiliuoksella, pH 5, ennenkuin niihin muodostettiin ristisidoksia glutaaridialdehydillä. Tätä tarkoitusta varten kosteat preparaatit pinnoitettiin 3 millilitralla mainittua 0,5-prosenttista polyetyleenimiiniliuosta katalyytin yhtä grammaa, kuiva-aineesta laskien, kohden. Seosta inkuboitiin huoneen lämpötilassa silloin tällöin sekoittaen. Tämän jälkeen päällimmäinen liuos poistettiin imulla ja jäänös pestiin kiinnityspuskurilla. Sitten ristisidosten muodostaminen glutaaridialdehydillä toteutettiin edellä kuvatulla tavalla ja preparaatteja säilytettiin varastointipuskurissa.

Luettelo 1

Tutkitut polyetyleenimiinit

Tyyppi	Valmistaja	Preparaatin no.
7000	BASF	Esimerkki 1/1
20000	BASF	1/2
80000	BASF	1/3
Sedipur VP/FD	BASF	1/4
Sedipur VP/mf	BASF	1/5
Sedipur VP/ST	BASF	1/6
Sedipur VP/P	BASF	1/7
Polymin P	BASF	1/8
Epomin-SP-006	Sumitomo	1/9
Epomin-SP-018	Sumitomo	1/10
Epomin-SP-200	Sumitomo	1/11
Epomin-SP-1000	Sumitomo	1/12

Esimerkki 2

5 grammaa "standardi 1"-preparaattia pinnoitettiin 15 millilitralla 0,5-prosenttista (w/v) polyetyleenimiiniliuosta (Polymin P, BASF), pH 5, ja sitä inkuboitiin 30 minuuttia huoneen lämpötilassa silloin tällöin sekoittaen. Preparaatti pes-

tiin kiinnityspuskurilla, minkä jälkeen sitä säilytettiin varastointipuskurissa.

Esimerkki 3

Analogisesti esimerkissä 2 esitetyllä tavalla "standardi 2"-preparaatti muokattiin polyetyleenimiiniinillä.

Esimerkki 4

Analogisesti esimerkissä 1 kuvatulla tavalla valmistettiin preparaatti 2-prosenttista polyetyleenimiiniliuosta käyttäen (Polyimin P, BASF)

Koe 1

Keksinnön mukaisesti valmistettujen, kantajaan sidottujen entsyymien suuremman stabiilisuuden osoittamiseksi esimerkissä 1 valmistettuja preparaatteja verrattiin "standardi 1"-preparaattiin.

Tätä tarkoitusta varten kulloinkin 1 ml preparaattia täytettiin 10 senttimetrin pituisiin pylväisiin, joissa oli lämpötilan säätämisen mahdollistava vaippa. Tämän jälkeen pylväisiin johdettiin substraattiliuosta. Substraattiliuoksena käytettiin 45-prosenttista (w/v) glukoosiliuosta, jonka pH oli asetettu arvoon 7,5, ja joka sisälsi kofaktoreina 120 ppm Mg^{++} -ioneja ja 200 ppm yhdistettä SO_2 muodossa Na_2SO_3 . Substraattiliuos lämmitettiin etukäteen 75 °C:n lämpötilaan ja sitä johdettiin vakiona pidettynä läpivirtaamana (tilavuusnopeus 35 v/vh) pylvään läpi. Preparaattien aktiivisuuden mittaamiseksi glukoosista kantajaan sidotun glukoosi-isomraasin vaikutuksesta muodostunut fruktoosi määritettiin polarimetrisesti säännöllisin väliajoin pylväästä poistuvasta substraatista. Tästä saatava isomeroitumisaste esitettiin yksinkertaisesti logaritmipaperilla ajan funktiona. Stabiilisuuden mittana toimi se alue, jossa aktiivisuus

pienenee lineaarisesti ajan funktiona, ja se esitetään isomeroitumisasteen pienenemisenä [%] 100 tunnissa.

Stabiilisuus on tällöin sitä suurempi, mitä vähäisempää aktiivisuuden pieneneminen on tämän ajanjakson aikana. Saadut arvot esitetään taulukossa 1.

Standardipreparaateille esitetyt arvot saatiin substraattilla, joka käsittää mainittujen kofaktoreiden ohella vielä 1 ppm Co^{++} -ioneja.

Taulukko 1

Erilaisten polyetylenei-imiinien stabiloiva vaikutus

Preparaatti	Isomeroitumisasteen pieneneminen (%) / 100 h
Esimerkki 1/1	5,1
1/2	7,0
1/3	8,8
1/4	6,7
1/5	6,6
1/6	7,2
1/7	7,3
1/8	7,0
1/9	9,2
1/10	6,1
1/11	7,7
1/12	7,3
Standardi 1	10,7

Koe 2

Vertailun vuoksi koe 1 toistettiin eräillä preparaateilla käyttäen muunnettuja olosuhteita (70 °C, 30,5 v/vh). Tulokset esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2

Erilaisten polyetyleen-imiinien stabiloiva vaikutus

Preparaatti	Isomeroitumisasteen pieneneminen (%) / 100h
Esimerkki 1/8	3,5
1/9	3,9
1/12	2,9
Esimerkki 2	4,3
Standardi 1	4,8

Koe 3

Käytännön olosuhteiden jäljittelemiseksi koe 1 toistettiin 60 °C:n lämpötilassa, käyttämättä kuitenkaan vakiona pysyvää läpivirtaamaa, vaan läpivirtaama (tilavuusnopeus) asetettiin vastaamaan aktiivisuudesta riippuen vakiona, eli arvossa 46,5 %, pysyvää isomeroitumisastetta. Stabiilisuuden mittana käytettiin tunteina mitattua puoliintumisaikaa. Saadut arvot esitetään taulukossa 3. Kokeessa 3 käytettiin myös "standardi 2"-preparaattia sekä esimerkin 3 mukaista preparaattia.

Taulukko 3

Eri preparaattien puoliintumisajat käytäntöä vastaavissa olosuhteissa

Preparaatti	Puoliintumisaika* (h)
Standardi 1	1260
Esimerkki 1/8	2150
Esimerkki 2	2200
Standardi 2	1900
Esimerkki 3	2500

* Puoliintumisaika määritettiin diagrammista $\ln$ aktiivisuus $\rightarrow$ t, jolloin A_0 saatiin ekstrapoloimalla.

Koe 4

Jotta saataisiin osoitetuksi, etteivät keksinnön mukaisesti valmistetut kantajaan sidotut entsyymit ole ainoastaan ajan suhteen stabiilimpia, vaan että myös niiden lämpöstabiilisuus on parantunut, koe 1 toistettiin "standardi 1"-preparaatilla sekä esimerkin 4 mukaisella preparaatilla, jossa kokeessa substraattiliuos lämmitettiin edeltäkäsien 70, 75 ja 80 °C:n lämpötilaan, mitä vastaten läpivirtaama asetettiin tilavuusnopeutena esittäen arvoon 30,5 v/vh, 35 v/vh ja 41 v/vh. Stabiilisuuden mitattuna käytettiin kuten kokeessa 1 aktiivisuuden pienenemistä 100 tunnissa, ilmaistuna prosentteina isomeroitumisasteesta. Saadut arvot esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4

Lämpötila (°C)	Isomeroitumisasteen pieneneminen (%) / 100 h	
	Preparaatti	
	Standardi 1	Esimerkki 4
70	4,8	2,0
75	10,7	6,8
80	60,3	42,2

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kantajiin sidottujen entsyymien valmistamiseksi, jossa menetelmässä kantajaan, joka käsittää kovalenttisten sidosten muodostamiseen kykeneviä funktionaalisia ryhmiä, liitetään entsyymi, t u n n e t t u siitä, että saatu, kantajaan sidottu entsyymi käsitellään lisäksi mielivaltaisessa järjestyksessä bifunktionaalisella, ristisidoksia muodostavalla aineella, kuten glutaaridialdehydin 0,1...10 prosenttisella (w/v) vesiliuoksella, sekä polyamiinilla, kuten polyetyleniimiinin 0,1...20 prosenttisella (w/v) vesiliuoksella.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kantajaan sidottu entsyymi käsitellään ensin polyamiinilla ja sitten ristisidoksia muodostavalla aineella.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittelemiseen käytetään 5...500 mg glutaaridialdehydiä, edullisesti 25...250 mg glutaaridialdehydiä, katalyytin yhtä kuiva-ainegrammaa kohden.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glutaaridialdehydiä käytetään 0,5...5-prosenttisena (w/v) vesiliuoksena.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely glutaaridialdehydillä toteutetaan pH-alueella 4...9, edullisesti pH-alueella 5...8.
6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä käytetään polyetyleniimiiniä, jonka molekyylipaino on korkeintaan 2 000 000 Daltonia, edullisesti alueella 600...1 000 000 Daltonia.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyetyleniimiiniä käytetään 3...600 mg, edullisesti 15...240 mg, katalyytin yhtä kuiva-ainegrammaa kohden.

8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että polyetyleenimiiniä käytetään
0,5...8-prosenttisena (w/v) vesiliuoksena.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 6...8 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käsittely polyetyleenimiinillä
toteutetaan pH-alueella 4...9, edullisesti pH-alueella 5...8.

10. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että siinä käytetään huokoista
epäorgaanista kantajaa, joka perustuu alumiinioksidiin tai pii-
happoon.

11. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että entsyyminä käytetään glu-
koosi-isomeraasia.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av bärarbundna enzymer, varvid man belägger en bärare, som uppvisar funktionella grupper som förmår bilda kovalenta bindningar, med ett enzym, k ä n n e t e c k n a t av att man ytterligare behandlar det erhållna bärarbundna enzymet i valfri ordning med ett bifunktionellt tvärbindningsmedel, såsom glutardialdehyd i 0,1...10 procentig (w/v) vattenlösning, samt en polyamin, såsom polyetylenimin i 0,1...20 procentig (w/v) vattenlösning.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att det bärarbundna enzymet behandlas först med en polyamin och därefter med tvärbindningsmedlet.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att man för behandlingen använder 5...500 mg glutardialdehyd, företrädesvis 25...250 mg glutardialdehyd, per gram katalysatortorrsubstans.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t av att man använder glutardialdehyd i 0,5...5-procentig (w/v) vattenlösning.
5. Förfarande enligt patentkravet 3 eller 4, k ä n n e t e c k n a t av att behandlingen med glutardialdehyd utförs vid ett pH mellan 4 och 9, företrädesvis ett pH mellan 5 och 8.
6. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att man använder polyetylenimin, vars molekylvikt är högst 2 000 000 Dalton, företrädesvis mellan 600 och 1 000 000 Dalton.
7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t av att man använder 3...600 mg, företrädesvis 15...240 mg polyetylenimin per gram katalysatortorrsubstans.

8. Förfarande enligt patentkravet 6 eller 7, k ä n n e -
t e c k n a t av att man använder polyetylenimin i 0,5...8
procentig (w/v) vattenlösning.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 6...8, k ä n -
n e t e c k n a t av att behandlingen med polyetylenimin ut-
förs vid ett pH om 4...9, företrädesvis ett pH om 5...8.

10. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven,
k ä n n e t e c k n a t av att man använder en porös oorganisk
bärare på basen av aluminiumoxid eller kiselsyra.

11. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven,
k ä n n e t e c k n a t av att man som enzym använder glukos-
isomeras.

⋮

•

•