



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146417 B

DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: C 12 N 11/06

- (21) Patentansøgning nr.: 2921/77  
(22) Indleveringsdag: 30 jun 1977  
(41) Alm. tilgængelig: 03 jan 1978  
(44) Fremlagt: 03 okt 1983  
(86) International ansøgning nr.: -  
(30) Prioritet: 02 jul 1976 GB 27749/76

- (71) Ansøger: \*NOVO INDUSTRI A/S; Novo Alle, 2880 Bagsværd, DK.  
(72) Opfinder: Shmuel \*Amotz; DK, Tage Kjær \*Nielsen; DK, Poul Børge Rosenius \*Poulsen; DK, Barrie Edmund \*Norman; DK.

(74) Fuldmægtig: -

- (54) **Immobiliseret forsukringsenzymprodukt og fremgangsmåde til fremstilling heraf**

Opfindelsen angår et partikelformet, immobiliseret forsukringsenzymprodukt, i hvilket forsukringsenzymet består af amyloglucosidase eller maltosedannende alfa-amy-lase, som begge sædvanligvis udvindes ved dyrkning af svampe, samt en fremgangsmåde til fremstilling af et sådant produkt.

Immobilisering af extracellulære og intracellulære, vandopløselige enzymer, d.v.s. binding af katalytisk aktive (native) enzymer i et uopløseligt fast eller halvfast, formbart eller formet produkt har i de senere år fået stor økonomisk betydning, fordi denne teknologi har muliggjort dels genbrug af enzymer i en batch-proces, dels gjort

DK 146417 B

enzymmer egnede for anvendelse i en kontinuerligproces i en såkaldt enzymreaktor. I de seneste år har bestræbelserne været koncentreret om udviklingen af immobiliseringsteknologien i stivelsesindustrien i forbindelse med fremstillingen af sådanne produkter som glucosesirup og isomeriseret glucosesirup (i det følgende benævnt isosirup), idet førstnævnte sædvanligvis er betegnelsen for en vandig glucoseopløsning med et tørstofindhold på mindst 30%, og sidstnævnte en glucose-fructose-opløsning med et lignende tørstofindhold og et fructoseindhold på mindst 42% af totalindholdet af monosaccharider. Isosirup er i løbet af de seneste år blevet et vigtigt produkt for levnedsmiddelindustrien som en fordelagtig erstatning for saccharose og for glucosesirup (hvoraf sidstnævnte har mindre sødeevne end isosirup). Andre typer sukkersirup, som er baseret på stivelseshydrolyse og kendetegnet ved at have et højt indhold af maltose, nemlig høj-maltosesirup og såkaldt højkonverteret sukkersirup bruges i stadig større målestok, f.eks. i henholdsvis konfektur- og konserverindustrien.

Den industrielle konvertering af stivelse til glucosesirup og derefter til isosirup omfatter tre processer, nemlig forflydning af stivelsen til dextriner, hvilken proces katalyseres af syre eller/og af bakterie-alfa-amylase, efterfulgt af forsukring til glucosesirup og derefter isomerisering af denne til isosirup, idet de sidstnævnte procestrin er katalyseret af hver sit specifikke enzym, nemlig henholdsvis amyloglucosidase og glucoseisomerase. De seneste års teknologiske udvikling har medført, at kontinuerlige processer er til rådighed for både første og tredje trin af ovennævnte produktionsproces. Derimod er den industrielle forsukringsproces stadig hovedsageligt en batchproces. Udgangsproduktet for høj-maltosesirup er også forflydet stivelse, fremstillet som oven for angivet. I dette tilfælde udføres den efterfølgende forsukringsproces, der resulterer i en sukkersirup med højt maltoseindhold (og sædvanligvis indeholdende en relativt ringe mængde glucose)

ved hjælp af en maltosedannende amylase, fortrinsvis en svampe-alfa-amylase. For denne forsukringsproces gælder ligeledes, at den sædvanligvis udføres som en batch-proces ved hjælp af det opløste enzym.

Til trods for at fordelene ved en helt igennem kontinuerlig bruttoproces er indlysende, er udviklingen af enzymreaktorteknikken i forbindelse med brugen af immobiliseret amyloglucosidase i forsukringstrinnet kun på begyndelsesstadiet.

En række metoder til immobilisering af amyloglucosidase, f.eks. ved binding af enzymet til et uopløseligt uorganisk eller organisk bæremateriale, er kendt fra teknikken. Imidlertid synes kun få af disse metoder at være udviklet ud over laboratorieskala. Af metoder, som øjensynligt har passeret dette stadium, kan nævnes immobiliseringen af amyloglucosidase ved covalent binding af dette til porøse partikler af glas eller keramisk materiale. I denne forbindelse henvises til en artikel publiceret af D.D. Lee et al. i "Die Stärke", vol. 27 (1975) pp. 384 - 387.

I en kontinuerlig proces i halvt teknisk (pilot plant) skala, i hvilken en kolonne blev pakket med et sådant enzymprodukt og derefter tilført opløsninger af kommercielt tilgængelige dextriner, opnåedes en konverteringsgrad til glucose, der nærmede sig den i en batch-vis forsukringsproces med opløselig amyloglucosidase tilstræbte konverteringsgrad på mindst 92% (idet dog en konvertering til 93% og derover naturligvis er at foretrække). Imidlertid viste produktanalyser, at reversions-reaktioner, d.v.s. repolymerisation af glucose til maltose, isomaltose og højere oligomere, katalyseret af amyloglucosidase, forekommer i højere grad i kolonneprocessen end i den batch-vise proces med det frie enzym.

Den omstændighed, at reversion finder sted i højere grad med det immobiliserede enzymprodukt, synes at være en ulempe, som tildels hænger sammen med brugen af et porøst bæremateriale for enzymet. Det er klart, at den porøse struktur yder et væsentligt bidrag til det totale overfladeareal, som er til rådighed for binding af enzymet og, som følge deraf, til den maksimalt opnåelige enzymaktivitet i det immobiliserede enzymprodukt.

Imidlertid er det uundgåeligt, at den høje koncentration af amyloglucosidase, som er bundet til overfladen i bærematerialets porer, og den nedsatte diffusionshastighed i selve porerne i forening medfører, at der lokalt opstår høje glucosekoncentrationer. Dette indebærer gunstige betingelser for fremskyndelsen af enzymprocesser med høje  $K_m$ -værdier, hvilket netop karakteriserer de uønskede reversionsreaktioner, og især dem, der fører til dannelsen af isomaltose og isomaltotriose.

Et immobiliseret maltosedannende alfa-amylaseprodukt, fremstillet ved binding af det opløselige enzym til aminoethylcellulose ved hjælp af glutaraldehyd, er omtalt i U.S. patentskrift nr. 4.011.137 (Thompson et al.). Imidlertid er brugen af det immobiliserede enzym begrænset til at øge konverteringsgraden af dextrin til glucose med en på lignende måde immobiliseret amyloglucosidase, idet forsukringsprocessen gennemføres ved hjælp af en blanding af de to immobiliserede enzymer. Det pågældende patent omhandler overhovedet ikke brugen af immobiliseret maltosedannende alfa-amylase til fremstillingen af højmaltoseisrup.

Det er fra dansk patentskrift nr. 133.380 kendt at fremstille et partikelformet, immobiliseret forsukringsenzymprodukt, i hvilket enzymet er krydsbundet til et gelerende protein, hvorved enzymet forefindes hovedsageligt homogent fordelt i partikler med en porøs eller netformet struktur.

Alle dextriner, uanset om de er fremstillet ved sur eller enzymatisk hydrolyse af stivelse, indeholder væsentlige mængder af oligomere af glucose, idet forflydningsprocessen sædvanligvis standses, når den gennemsnitlige kædelængde af hydrolysatet svarer til 6 - 10 glucose-rester. Dette medfører, at sterisk hindring hæmmer diffusionen af de større dextrinmolekyler til enzymcentre, som ligger under en vis dybde i den porøse eller netformede partikelstruktur og dermed utilfredsstillende udnyttelse af enzymet.

Formålet med denne opfindelse er at overvinde eller i det mindste at formindske de væsentligste ulemper ved de kendte immobiliserede forsukringsenzymprodukter ved tilvejebringelse af et immobiliseret produkt med i alt væsentligt lignende proceskarakteristika som det opløselige enzym, uanset om det immobiliserede produkt bruges i en batch-vis eller kontinuerlig proces.

For den immobiliserede amyloglucosidases vedkommende indebærer denne betingelse normalt, at der ved en kontinuerlig fosukringsproces, gennemført under industrielle procesbetingelser (i henseende til dextrin-substratets sammensætning og tilløbshastighed til kolonnen), opnås en glucosekoncentration i udløbet på mindst 92%, og at den totale koncentration af disaccharider (maltose og isomaltose) og trisaccharider (hovedsagelig panose og isomaltotriose) ikke overstiger henholdsvis 4 og 1%.

For den immobiliserede maltosedannende alfa-amylases vedkommende vil de tilstræbte konverteringsparametre tilsvarende være: 40 - 60% maltose, 25 - 35% maltotriose og, fortrinsvis, mindre end 10% glucose.

Da kommercielt tilgængelige, opløselige forsukringszymer er relativt billige og særdeles aktive, må der tilvejebringes økonomisk konkurrencedygtige immobiliserede

produkter. En forudsætning herfor er anvendelsen af relativt billige, kommercielt tilgængelige bærematerialer og andre hjælpestoffer, samt bibeholdelsen af en væsentlig del af enzymaktiviteten under immobiliseringsprocessen. Derudover er det nødvendigt, at alle anvendte materialer er utoxiske og godkendte til anvendelse i levnedsmiddelindustrien.

Forsøg på fremstilling af immobiliserede produkter med et proteinagtigt lag bestående af forsukringsenzymet alene, krydsbundet med glutaraldehyd, gav dårlige resultater. Uanset valget af bæremateriale førte de til ufuldstændigt immobiliserede produkter med et deraf følgende udtalt tab af enzymaktivitet under brug. Lignende vanskeligheder opstod med et udvalg af vandopløselige, partikkelformede bærematerialer af uorganisk (f.eks. mineralsk eller keramisk) oprindelse eller under anvendelse af visse proteiner (som f.eks. granuleret soyaprotein). Årsagen hertil må formentlig søges i manglen på et tilstrækkeligt stort antal for krydsbinding tilgængelige grupper på overfladen af sådanne partikler.

Det har nu overraskende vist sig, at de fysiske og enzymatiske egenskaber af sådanne produkter i høj grad forbedres, såfremt det anvendte bæremateriale består af kaseingranuler og, ydermere, at krydsbindingen af enzymet med glutaraldehyd i overstrækslaget foregår i nærværelse af det vandopløselige, ikke-enzymatiske protein æggehvide som binder, idet disse materialer åbenbart udgør en gunstig kombination for tilvejebringelsen af et tilstrækkeligt antal enzymstabiliserende krydsbindinger.

Det partikelformede, immobiliserede forsukringsenzymprodukt ifølge opfindelsen, i hvilket forsukringsenzymet er amyloglucosidase eller maltosedannende alfa-amylase, er i overensstemmelse hermed ejendommeligt derved, at bærematerialet består af kaseingranuler, som er overtrukket med

et væskegennemtrængeligt, proteinagtigt lag, i hvilket forsukringsenzymet og æggehvide er krydsbundet ved reaktion med glutaraldehyd.

De relative mængder af de indgående konstituenters i form af forsukringsenzym, kasein og æggehvide kan variere inden for ret vide grænser, bl.a. afhængigt af aktiviteten (som defineret nedenfor) af det opløselige forsukringsenzym, der bruges som udgangsmateriale. I et foretrukket produkt ifølge den foreligende opfindelse er vægtforholdet mellem forsukringsenzym og kasein beliggende i området fra 1:200 til 1:2, fortrinsvis 1:25 til 1:5, idet mængden af amyloglucosidase og maltosedannende alfa-amylase er beregnet på basis af et produkt med en enzymaktivitet på henholdsvis 10.000 og 3.000 enheder pr. g. På samme måde foretrakkes et vægtforhold mellem forsukringsenzym og æggehvide, der er beliggende i området fra 1:5 til 1:0.05 og fortrinsvis i området fra 1:2 til 1:0.2.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at et bæremateriale af kaseingranuler overtrækkes med en reaktionsblanding af forsukringsenzymet, æggehvide og glutaraldehyd som, når reaktionen er tilendebragt, danner et væskegennemtrængeligt proteinagtigt lag, i hvilket forsukringsenzymet og æggehvide er krydsbundet ved reaktion med glutaraldehyd, hvorefter det opnåede produkt, om ønsket, yderligere behandles.

Ved udøvelse af fremgangsmåden kan en tør blanding af kaseingranulat og æggehvidepulver under kraftig omrøring befugtes med en vandig blanding bestående af forsukringsenzymet og glutaraldehyd opløst ved pH 4 - 7; efterfulgt af et trin, i hvilket den resulterende befugtede blanding henstår, sædvanligvis ved stuetemperatur, indtil krydsbindingsprocessen er afsluttet. Befugtningsprocessen kan udføres enten manuelt, f.eks. ved omhyggelig blanding og æltning i en morter, eller mekanisk, f.eks. i et med

horizontalt placeret, plovformet omrører forsynet blandeapparat af en type, som f.eks. leveres af Gebr. Lödige Maschinenbau G.m.b.H., Paderborn, Vesttyskland. Fremgangsmåden kan, om ønsket, varieres på den måde, at æggehvidepulveret bringes i opløsning sammen med enzymet i stedet for at blive blandet i tør tilstand med kaseinet.

Vægtforholdet mellem glutaraldehyd (der sædvanligvis tilsættes som en 50 vægt % vandig opløsning) og overtrækslagets proteiner (enzym + æggehvide) kan variere betydeligt, idet dog det foretrukne interval er 0.1 til 1. Vandindholdet af den totale reaktionsblanding inklusive kaseingranulat tilpasses sædvanligvis til at ligge i intervallet fra 10 til 50 vægt %.

Egenskaberne af det kaseingranulat, der vælges som bæremateriale, er af betydning for opnåelsen af opfindelsens formål. Det er således nødvendigt, at kaseingranulerne besidder en fysisk stabilitet der er tilstrækkelig til at modstå en væsentlig deformation, når de udblødes under trykbetingelserne i en pakket kolonne. Derudover må kvældningsgraden i vand have en rimelig øvre grænse, som fortrinsvis ikke overstiger 200%. Et eksempel på et produkt der opfylder disse betingelser er syrefældet kaseingranulat. Et sådant produkt, godkendt til levnedsmiddelbrug og med en partikeldiameter overvejende i intervallet fra 100 - 500  $\mu$ , er kommercielt tilgængeligt, f.eks. fra det franske firma Scerma S.A. Undersøgelse af sådanne partikler ved hjælp af scanning elektronmikroskopi (SEM) viser, at deres overflade har en meget ujævn og uregelmæssig foldet struktur, som har visse lighedspunkter med det makroskopiske udseende af pimpsten. Det er sandsynligt, at en overflade med en mikrostruktur af denne type blotlægger et stort antal grupper, der er egnede til krydsbinding med glutaraldehyd.

Det er vigtigt for udførelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, at en væsentlig fraktion af det som binder benyttede æggevide går næsten øjeblikkeligt i opløsning i vand. Denne egenskab forefindes sædvanligvis hos kommercielt tilgængelige kvaliteter af spraytørret æggevide, som derfor er foretrukket.

Blandingsprocessen medfører sædvanligvis en vis grad af sammenklumpning af de overtrukne partikler, således at resultatet efter krydsbindingsreaktionens afslutning er et grovkornet og klumpet produkt. Dette produkt kan underkastes sønderdeling, f.eks. ved granulering, med det formål at frembringe et partikelformet produkt med partikelstørrelser inden for et foretrukket interval. Granuleringen kan udføres ved hjælp af et oscillerende granuleringsapparat af en type, som leveres af flere firmaer (Diaf, København eller Manosty, Liverpool). Det granulerede produkt, der har passeret granuleringsapparatets sigte (i hvilken sigtehullerne kan have en diameter på 1 - 2 mm), kan befries for fine partikler på konventionel vis. Det således opnåede produkt kan, hvis det ønskes, vaskes og derefter tørres til ønsket vandindhold.

Det tørrede enzymprodukt udblødes sædvanligvis i en vandig opløsning forud for dets anvendelse. En vis ud-sivning af enzymet iagttages undertiden på dette trin og ligeledes i den efterfølgende første fase af forsukringsprocessen. Dette tab af enzymaktivitet kan reduceres væsentligt ved at indskyde endnu en krydsbindingsproces, om ønsket i forbindelse med udblødningsprocessen. I henhold til en udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres forbehandlingen af enzymproduktet derfor i en vandig opløsning, der indeholder passende mængde glutaraldehyd, fortrinsvis 0.5 - 5 vægt %, efterfulgt af fjernelsen af overskud af reagenset ved udvaskning og, om ønsket, gen-vinding af det tørrede produkt.

Det er iagttaget, at forbehandling af enzymproduktet med et salt af svovlsyrling kan medføre en væsentlig øgning af konverteringsgraden af det forsukrede produkt (udtrykt i % dextrose ækvivalent eller DE-værdi). Der har været fremsat den teori, at virkningen af sulfit beror på en "oplukning" af visse i det proteinagtige, enzymatisk aktive lag forekommende netagtige strukturer, som åbenbart ikke omfatter bindingen af enzymet, men som letter adgangen af de højere oligosaccharider til enzymets aktive centre. Endnu en udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter derfor behandlingen af enzymproduktet med en fortyndet, vandig opløsning af natriumsulfit, fortrinsvis en 0.1 - 2 % opløsning med pH 4 - 5. Sulfitbehandlingen udføres fortrinsvis ved stuetemperatur og afsluttes fortrinsvis efter 2 timer ved vaskning med vand, om ønsket efterfulgt af genvinding af det tørrede produkt. Efter sulfitbehandlingen forekommer yderligere udsivning af enzymet sædvanligvis ikke.

De partikelformede enzymprodukter ifølge opfindelsen kan anvendes til gentagen batch-vis forsukring, idet enzymproduktet efter hver enkelt batch-proces fraskilles og genbruges, eller til kontinuerlig forsukring, f.eks. i en kolonneproces.

Foretrukne amyloglucosidaser til anvendelse ifølge den foreliggende opfindelse fås ved dyrkning af svampestammer tilhørende Aspergillus eller Rhizopus, f.eks. Aspergillus niger eller Rhizopus delemar. Foretrukne maltosedannende alfa-amylaser fås på lignende måde fra stammer af Aspergillus oryzae.

Bestemmelse af aktiviteten af amyloglucosidase. Aktiviteten af såvel opløselig som immobiliseret amyloglucosidase, defineret som den mængde enzym eller enzymprodukt, der hydrolyserer en vandig opløsning indeholdende 30% (vægt/volumen) maltose med en begyndelseshastighed på 1

$\mu$  mol maltose pr. minut, bestemmes under standardbetingelser, som er pH 4.5 og en temperatur på 55.0°C. Aktiviteten af det immobiliserede enzymprodukt bestemmes i en batch-proces, i hvilken prøven holdes suspenderet ved hjælp af en rysteanordning.

Bestemmelse af aktiviteten af svampe-alfa-amylase. Aktiviteten af såvel opløselig som immobiliseret alfa-amylase, defineret som den mængde enzym eller enzymprodukt, der hydrolyserer en vandig opløsning indeholdende opløselig stivelse (Merck Amylum solubile, DAB, Erg. B VI), (6.95 g pr. 1000 ml) med en begyndelseshastighed på 5.26 mg stivelse pr. time, bestemmes under standardbetingelser, som er pH 5.6 - 5.7, en temperatur på 37.0°C  $\pm$  0.05°C og i nærværelse af 4.3 mmolær Ca<sup>++</sup> ion. Reaktionen følges ved hjælp af den blå farve, der dannes med jod, og som under nedbrydningen af stivelsen gradvis bliver svagere og skifter til rødbrun. Farveændringen bestemmes visuelt ved sammenligning med standarder af farvet glas. Aktiviteten af det immobiliserede enzymprodukt bestemmes under betingelser, der er analoge med de for amyloglucosidase angivne.

De opløselige forsukringsenzymer er kommercielt tilgængelige. Som eksempler på sådanne produkter kan nævnes AMYLOGLUCOSIDASE NOVO 150 (der sælges som en vandig opløsning) og FUNGAMYL 1600<sup>®</sup> (der sælges i pulverform). Enzymer i vandig opløsning omdannes sædvanligvis til et spray-tørret pulver forud for deres anvendelse ifølge den foreliggende opfindelse. Forud for tørringsprocessen kan, om ønsket, indskydes en ultrafiltrering, sædvanligvis kombineret med en vaskeproces med det formål at fjerne lavmolekylære forureninger. Under anvendelse af sådanne fremgangsmåder for koncentrering og rensning, som alle er velkendte fra teknikken, opnås med lethed et amyloglucosidaseprodukt i fast form med en aktivitet på 5000 enh./g eller højere. Det kommercielle produkt FUNGAMYL 1600 (med en aktivitet på

1600 enh./g) er direkte anvendeligt som udgangsmateriale. Aktiviteten af produktet kan, om ønsket, øges ved koncentreret og rensning som omtalt ovenfor.

Den totale genvinding af enzymaktivitet ved immobiliseringsprocessen vil afhænge af de betingelser, hvorunder denne gennemføres, men er sædvanlig ikke under 40% og ofte højere.

De immobiliserede enzymprodukter ifølge opfindelsen kan som substrat anvende et hvilket som helst oligosaccharid, som forsukres i nærværelse af det tilsvarende opløselige enzym. Eksempler på foretrukne substrater er dextriner med DE-værdier i området fra 5 til 40, fremstillet ved syre- og/eller enzymkatalyseret forflydning af stivelse; maltosesirupper (DE fra 35 til 60); og tilbageblivende oligosaccharider i moderluden fra krystallisationen af dextrose eller i såkaldt raffinatlud fra fructoseglucosefraktionering. De immobiliserede forsukringsenzymprodukter er særligt anvendelige til forsukring af dextrinopløsninger med et tørstofindhold i området fra 20 til 55% (vægt/volumen).

Opfindelsen beskrives i det følgende nærmere under henvisning til de anførte eksempler.

#### Eksempel 1

Et forholdsvis groft saltsyrefældet kaseingranulat (9 g "caséine alimentaire" (Scerma S.A., Frankrig) med en partikelstørrelse på 100 - 500  $\mu$ , hvoraf fraktionen på 300 - 500  $\mu$  udgjorde ca. 60%) blev blandet med spray-tørret æggehvide (1.2 g). Til denne blanding blev tilsat en forud fremstillet opløsning af amyloglucosidase i pulverform (6.5 ml af en 18.5% (vægt/volumen) vandig opløsning) og glutaraldehyd (1.2 ml af en 50% vandig opløsning). Amyloglucosidasen var et ultrafiltreret, spray-tørret produkt,

fremstillet ud fra AMYLOGLUCOSIDASE NOVO (NOVO INDUSTRI A/S, Danmark). Blandingen blev omhyggeligt æltet i en morter og hensat ved stuetemperatur i 1 time. Det resulterende sammenklumpede produkt pulveriseredes i en morter til et granuleret produkt, som tørredes i et døgn ved stuetemperatur.

Det tørrede granulat (11.4 g) havde en aktivitet på 425 enh./g, hvilket repræsenterer et genvindingsudbytte på 38.8%.

#### Eksempel 2

Saltsyrefældet kaseingranulat (1500 g af typen M60 (Scerma S.A.) med en partikelstørrelse på 100 - 500  $\mu$ , hvoraf fraktionen på 150 - 350  $\mu$  udgjorde ca. 70%) blev blandet i tør tilstand med en handelsvare af spray-tørret æggehvide (120 g) i et 20 liter blandeapparat forsynet med en horizontalt placeret omrører af plovtypen (Gebr. Lödige Maschinenbau, G.m.b.H., Vesttyskland).

Et ultrafiltreret koncentrat af amyloglucosidase, fremstillet ud fra AMYLOGLUCOSIDASE NOVO (650 g af en opløsning med et tørstofindhold på ca. 25% og indeholdende ca. 3200 enh. af opløselig amyloglucosidase/g koncentrat) blev blandet med glutaraldehyd (180 ml af en 50% (vægt/volumen) vandig opløsning) ved pH 4.9 og en temperatur på 18°C. Den færdige opløsning blev sat til tørblandingen i blandeapparatet. Der fortsattes med kraftig omrøring i 1/2 - 1 minut, hvorefter det befugtede granulat fjernedes fra blandeapparatet og henstod i ro i ca. 45 minutter indtil krydsbindingsprocessen var tilendebragt. Herved opstod et produkt bestående af grove klumper.

Produktet granuleredes i et oscillerende granuleringsapparat (f.eks. af en type fremstillet af Diaf A/S, København) gennem en sigte med 1.5 mm huller.

Granulatet blev vasket med afioniseret vand (10 liter) i 10 minutter, frafiltreret og tørret i en opadrettet luftstrøm (fluid-bed-metoden). Det tørrede produkt (1600 g, 450 amyloglucosidase enh./g) blev befriet for småpartikler ved sigtning.

### Eksempel 3

En opløsning af spray-tørret pulver af amyloglucosidase (105 g, aktivitet: 11.400 enh./g, fremstillet som beskrevet i eksempel 1) og spray-tørret æggehvide (105 g) i vandværksvand (400 ml) henstilledes natten over i køleskab ved 6 - 7°C. Opløsningens pH var 5.4

Glutaraldehyd (100 ml af en 50% (vægt/vægt) vandig opløsning) blev tilsat, hvorefter denne blanding i løbet af 3 minutter blev sat til en kraftig omrørt portion af saltsyrefældet kaseingranulat (725 g af samme type som i eksempel 2). Den færdige blanding omrørtes kraftigt i få minutter, hvorefter den henstod i ro indtil krydsbindingsreaktionen var tilendebragt efter ca. 1 time.

Det resulterende, uregelmæssigt sammenklumpede produkt blev granuleret i et oscillerende granuleringsapparat gennem en sigte med 2 mm huller.

Granulatet blev vasket med en vandig opløsning af natriumacetat (pH 4.2) efterfulgt af vacuumtørring ved 35°C.

Det tørrede, granulerede produkt (925 g) havde en aktivitet på 800 enh./g, hvilket repræsenterer et udbytte ved immobiliseringsprocessen på 67.8%.

Eksempel 4

Det immobiliserede amyloglucosidaseprodukt (20 g), fremstillet som i eksempel 3, blev udblødt i en time ved stuetemperatur i en vandig opløsning af glutaraldehyd (500 ml af en 1% opløsning af glutaraldehyd indstillet på pH 7), efterfulgt af genvinding af det tørrede produkt (20 g).

Produktets aktivitet var 625 enh./, hvilket repræsenterer et udbytte på 78% i andet immobiliserinstrin og et totaludbytte på 53% beregnet på opløst amyloglucosidase.

Eksempel 5

En vandig opløsning af maltosedannende alfa-amy-lase (2 ml af en 5% (vægt/volumen) opløsning af FUNGAMYL 1600 (NOVO INDUSTRI A/S, Danmark) i afioniseret vand ved pH 6.2) blev blandet med en vandig opløsning af glutaraldehyd (0.3 ml af en 50% (vægt/vægt) opløsning) og hurtigt sat til en tør blanding af syrefældet kaseingranulat (4.0 g af typen M60) og en handelsvare af spray-tørret æggehvide (0.5 g). Efter gennemæltning i en morter blev det færdige produkt hensat 1 time ved stuetemperatur. Klumper blev knust i en morter, hvorefter produktet blev tørret ved stuetemperatur i et døgn.

Eksempel 6

En kolonne med en indre diameter på 15 mm, forsynet med en kappe med cirkulerende, 55°C varmt vand, blev pakket med det immobiliserede amyloglucosidaseprodukt (5.7 g), fremstillet i henhold til eksempel 1. En 30% (vægt/volumen) dextrinopløsning, fremstillet af en syre/enzymhydrolyseret dextrin (CPC Snow Flake Maltodextrin 01915, DE ca. 20) med følgende omtrentlige sammen sætning:

	%
glucose (DP <sub>1</sub> ):	4-5
disaccharider (DP <sub>2</sub> ):	8-9
trisaccharider (DP <sub>3</sub> ):	6-7
tetra- og oligosaccharider (DP <sub>4+</sub> )	79-82

hvori yderligere var opløst 0.2% (vægt/volumen) af natrium-sulfit efterfulgt af indstilling af pH på 4.5, blev tilført kolonnen som en nedadrettet fødestrøm med en konstant strømningshastighed på 15 ml pr. time.

Udløbet fra kolonnen, der blev analyseret ved hjælp af højtryks-væskechromatografi (HPLC), havde følgende sammensætning:

Dage	DP <sub>1</sub> %	DP <sub>2</sub> %	DP <sub>3</sub> %	DP <sub>4+</sub> %	Beregnet DE
1	92.0	5.6	0.7	1.7	95.3
4	93.2	4.2	0.6	2.0	95.8
5	92.9	3.9	0.7	2.5	95.4
7	93.6	3.2	0.6	2.5	95.8
9	93.3	3.1	0.7	2.9	95.5
11	92.6	3.2	0.8	3.3	94.9
13	92.6	2.9	0.9	3.6	94.9

Eksempel 7

En kolonne med en indre diameter på 25 mm, forsynet med en kappe med cirkulerende, 55°C varmt vand, blev pakket med det immobiliserede amyloglucosidaseprodukt (20 g), fremstillet i henhold til eksempel 2.

En opadrettet fødestrøm med samme koncentration, sammensætning og pH som den i eksempel 6 anvendte blev tilført kolonnen med en konstant strømningshastighed på 50 ml pr. time. Kolonneudløbets glucoseindhold (% DP<sub>1</sub>), bestemt efter hexokinasetoden, varierede på følgende måde over en periode på 8 dage:

Dage	DP <sub>1</sub> %
1	89.0
4	93.6
6	93.6
8	93.1

Eksempel 8

En kolonne med en indre diameter på 25 mm, forsynet med en kappe med cirkulerende, 55°C varmt vand, blev pakket med det immobiliserede amyloglucosidaseprodukt (25 g), fremstillet i henhold til eksempel 2. Der anvendtes en opadrettet fødestrøm af samme sammensætning som den i eksempel 6 angivne. Opløsningens tørstofindhold var 30% (vægt/volumen), pH var indstillet på 4.5 og kaliumsorbat (2

g/liter) var tilsat som konserveringsmiddel. Strømningshastigheden blev reguleret på en sådan måde, at der opnåedes en tilnærmelsesvis konstant konverteringsgrad.

Udløbet fra kolonnen blev analyseret ved hjælp af HPLC og viste følgende konvertering til glucose (DP<sub>1</sub>) i afhængighed af tiden:

Dage	DP <sub>1</sub> %	Strømnings- hastighed ml/time
1	92.6	115
2	-	112
3	92.4	101
4	92.0	82
5	92.2	75
6	92.3	70
7	92.1	66
8	92.6	64
9	-	60
10	92.0	57

Efter kolonneprocessens afslutning kunne der ikke konstateres ændringer i kolonnematerialet, hverken med hensyn til dets hårdhed eller andre fysiske egenskaber.

#### Eksempel 9

Ved anvendelse af fremgangsmåden i henhold til eksempel 7, idet dog det immobiliserede amyloglucosidaseprodukt fremstillet ifølge eksempel 2 erstattedes med det tilsvarende fremstillet efter eksempel 4, opnåedes følgende resultater:

Dage	DP <sub>1</sub> %
1	90.3
2	92.9
4	93.7
13	93.3

#### Eksempel 10

En kolonne, udstyret med en kappe med cirkulerende, 45°C varmt vand, blev pakket med det immobiliserede maltogene alfa-amylaseprodukt (4 g), fremstillet ifølge den i eksempel 5 beskrevne fremgangsmåde. En nedadrettet fødestrøm af en dextrinopløsning (CPC Snow Flake Maltodextrin 01913), indeholdende 30% (vægt/volumen) tørstof og natriumsulfit (0.2%) førtes til kolonnen. Opløsningens pH var indstillet på 4.5 og strømningshastigheden på 15 ml/time. Idet DP<sub>2</sub> i alt væsentligt repræsenterer indholdet af maltose, viser tabellen, at kolonneudløbets sammensætning svarer til sammensætningen af en høj-maltosesirup:

Dage	DP <sub>1</sub> %	DP <sub>2</sub> %	DP <sub>3</sub> %	DP <sub>4+</sub> %	Beregnet DE
1	5.3	45.4	21.0	28.3	42.5
2	5.0	44.9	21.6	28.5	42.1
3	4.7	44.1	22.0	29.2	41.7
4	4.4	43.5	22.7	29.4	41.2

#### Eksempel 11

A. En kolonne med en 15 mm indre diameter, forsynet med en kappe med cirkulerende, 55°C varmt vand, blev pakket med immobiliseret amyloglucosidase (12 g), fremstillet efter den i eksempel 2 angivne metode. En væskestrøm bestående af en dextrinopløsning (31% (vægt/vægt) baseret på tørstofindholdet), blev ledt til kolonnen i nedadgående retning. Den anvendte dextrin var fremstillet ved forflydning af stivelse med TERMAYL<sup>®</sup> L60 (NOVO INDUSTRI, Danmark) og havde følgende sammensætning:

	%
glucose (DP <sub>1</sub> ):	1
disaccharider (DP <sub>2</sub> ):	7-8
trisaccharider (DP <sub>3</sub> ):	10-12
tetra- og oligosaccharider (DP <sub>4+</sub> ):	79-82
DE	21

Opløsningen indeholdt natriumsulfit (0.2% vægt/volumen) som konserveringsmiddel og havde pH 4.5. Strømningshastigheden reguleredes på en sådan måde, at der opretholdtes en konstant konverteringsgrad (i form af % DP<sub>1</sub>). Analyse af kolonneudløbet ved hjælp af HPLC gav følgende resultater:

Dage	DP <sub>1</sub> %	DP <sub>2</sub> %	DP <sub>3</sub> %	DP <sub>4+</sub> %	Strømningshastighed ml/time
3	92.1	4.2	0.7	3.1	35
7	92.3	3.6	0.8	3.3	33
14	92.2	3.6	0.7	3.5	27
28	92.4	3.1	0.9	3.6	18
56	92.1	3.3	0.8	3.7	15

B. Et dextrinsubstrat, fremstillet i henhold til den under (A) beskrevne metode havde følgende sammensætning:

	%
glucose (DP <sub>1</sub> ):	1.1
disaccharider (DP <sub>2</sub> ):	6.8
trisaccharider (DP <sub>3</sub> ):	11.0
tetra- og oligosaccharider (DP <sub>4+</sub> ):	81.0

Opløsningen blev behandlet med 0.01% (baseret på det totale tørstofindhold) maltogen alfa-amylase (FUNGAMYL 1600, NOVO INDUSTRI A/S) ved pH 5.0 og 50°C i 2 timer. Efter denne behandling havde opløsningen følgende sammensætning:

	%
glucose (DP <sub>1</sub> ):	1.3
disaccharider (DP <sub>2</sub> ):	13.9
trisaccharider (DP <sub>3</sub> ):	22.3
tetra- og oligosaccharider (DP <sub>4+</sub> ):	62.5

2 kolonner, hver med 15 mm indre diameter og forsynet med kapper med cirkulerende, 55°C varmt vand, blev pakket med immobiliseret amyloglucosidase (10 g, fremstillet i henhold til eksempel 2, til hver). Opløsninger, der hver indeholdt 30% (vægt/vægt) af de to typer af dextrin og yderligere var tilsat 0.2% (vægt/volumen) af kaliumsorbit, efterfulgt af justering af pH til 4.5, blev tilført kolonnerne i nedadgående retning. Analyse af glucoseindholdet i hver af de to kolonneudløb gav følgende resultat til sammenligning:

Substrat	før FUNGAMYL behandling	efter FUNGAMYL behand- ling
Udløbets maximale DX, %	92.7	93.3

#### Eksempel 12

Portioner (hver på 10 g) af immobiliseret amyloglucosidase, fremstillet i henhold til den i eksempel 2 angivne metode, blev udblødt i opløsninger (å 100 ml), i nærværelse af opløst natriumsulfit i forskellige koncentrationer. Opløsningernes pH var forud indstillet på 4.5 ved tilsætning af eddikesyre. Efter udblødning i 2 timer ved stuetemperatur blev enzymprøverne vasket med afioniseret vand og pakket i kolonner med 15 mm indre diameter, forsynet med kapper gennemstrømmet af 55°C varmt vand. Som tilledning til kolonnerne anvendtes en dextrinopløsning

(30% (vægt/vægt)), fremstillet ifølge den i eksempel 11 A givne metode. Dextrinopløsningen var tilsat kaliumsorbit (0.2% (vægt/volumen)) efterfulgt af indstilling af pH til 4.5

Ved at indstille strømningshastigheden for hver kolonne til den maksimalt opnåelige DX-værdi i kolonneudløbet opnåedes følgende resultater:

Natriumsulfit	0	0.01	0.1	0.2	0.5	1.0
g/100 ml						
Maximum DX	90.3	90.2	91.2	91.7	91.9	92.4

### Eksempel 13

Den opsamlede høj-maltosirup (DE ca. 42) fra FUNGAMYL-kolonnen i eksempel 10 anvendtes som fødestrøm for en kolonne med immobiliseret amyloglucosidase i henhold til eksempel 6. Strømningshastigheden indstilledes på en sådan værdi (ca. 73 ml/time), at der opnåedes en sammensætning af kolonneudløbet svarende til sammensætningen af en højkonverteret sirup (DE ca. 65):

	%
glucose (DP <sub>1</sub> ):	38.1
disaccharider (DP <sub>2</sub> ):	39.6
trisaccharider (DP <sub>3</sub> ):	2.8
tetra- og oligosaccharider (DP <sub>4+</sub> ):	19.6

Eksempel 14

En kolonne med 25 mm indre diameter, forsynet med en kappe med cirkulerende, 55°C varmt vand, blev pakket med et immobiliseret amyloglucosidase-produkt (20 g) fremstillet i henhold til eksempel 3.

En opløsning bestående af moderluden (også kaldet raffinat) fra fraktioneringen af fructose og glucose med følgende sammensætning:

	%
fructose	3.25
glucose	85.71
disaccharider	9.17
trisaccharider	1.42
polysaccharider	0.54

med pH 4.5 og med et tørstofindhold på 25% (vægt/vægt) blev ledet til kolonnen i opadgående retning. Sammensætningen af kolonneudløbet, der opsamledes ved en strømningshastighed på 250 ml pr. time, bestemtes ved hjælp af HPLC.

	%
fructose	3.25
glucose	91.16
disaccharider	4.14
trisaccharider	1.15
polysaccharider	0.30

PATENTKRAV

1. Partikelformet, immobiliseret forsukringsenzymprodukt, i hvilket forsukringsenzymet er amyloglucosidase eller maltosedannende alfa-amylase, k e n d e t e g n e t ved, at bærematerialet består af granuleret kasein, som er overtrukket med et væskegennemtrængeligt, proteinagtigt lag, i hvilket forsukringsenzymet og æggehvide er krydsbundet ved reaktion med glutaraldehyd.
2. Produkt ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at vægtforholdet mellem forsukringsenzym og kasein er beliggende i området fra 1:200 til 1:2, fortrinsvis fra 1:25 til 1:5.
3. Produkt ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at vægtforholdet mellem forsukringsenzym og æggehvide er beliggende i området fra 1:5 til 1:0.05, fortrinsvis fra 1:2 til 1:0.2.
4. Produkt ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at partikeldiameteren af det granulerede kasein er fra 100 til 500  $\mu$ .
5. Produkt ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det granulerede kasein er syrefældet kasein.
6. Fremgangsmåde til fremstilling af et partikelformet, immobiliseret forsukringsenzymprodukt ifølge krav 1, i hvilket forsukringsenzymet er amyloglucosidase eller maltosedannende alfa-amylase, k e n d e t e g n e t ved, at et bæremateriale af granuleret kasein overtrækkes med en reaktionsblanding af forsukringsenzymet, æggehvide og glutaraldehyd, som, når reaktionen er tilendebragt, danner et væskegennemtrængeligt proteinagtigt lag, i hvilket forsukringsen-

zymet og æggehvide er krydsbundet ved reaktion med glutaraldehyd, hvorefter det opnåede produkt, om ønsket, yderligere behandles.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendt tegnet ved, at der anvendes et vægtforhold mellem forsukringsenzym og kasein i området fra 1:200 til 1:2, fortrinsvis fra 1:25 til 1:5.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendt tegnet ved, at der anvendes et vægtforhold mellem forsukringsenzym og æggehvide i området fra 1:5 til 1:0.05, fortrinsvis fra 1:2 til 1:0.2.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendt tegnet ved, at der anvendes granuleret kasein med en partikeldiameter fra 100 til 500  $\mu$ .

10. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendt tegnet ved, at det anvendte granulerede kasein er syrefældet kasein.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendt tegnet ved, at forholdet mellem vægtmængden af glutaraldehyd og den samlede vægtmængde af forsukringsenzym og æggehvide, som er inkorporeret i det proteinagtigt lag, er beliggende i området fra 0.1 til 1.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendt tegnet ved, at det opnåede immobiliserede forsukringsenzymprodukt yderligere behandles med en vandig opløsning af glutaraldehyd, eller med en vandig opløsning af et salt af svovlsyrling, eller med begge dele.

Fremdragne publikationer:

DK patent nr. 133380.