

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 832633 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **832633**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.07.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.07.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.01.1984**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

20.07.1982 US 400,141 07.02.1983 US 464,376

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Genex Corporation, 6110 Executive Boulevard, Rockville, Maryland, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Swann, Wayne Elliott, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Vermikuliitti immobilisoitujen biologisten materiaalien kantaja- alustana.

Vermikulit som bärarunderlag för immobiliserade biologiska material.

Menetelmä biologisten materiaalien immobilisoimiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää immobilisoida biologisia materiaaleja. Tarkemmin sanottuna keksintö koskee biologisten materiaalien immobilisoimista siten, että materiaalit absorboidaan vermikuliittihiukkasiin, jotka päällystetään sitten polymeerillä.

Biologisia materiaaleja kuten entsyymejä tai entsyymejä tuottavia mikro-organismeja tai soluja käytetään usein katalysaattoreina synteettisissä reaktioissa ja analyysitekniikassa. Tällaiset katalysaattorit ovat edullisia, koska ne toimivat erittäin spesifisesti ja tehokkaasti olosuhteissa, jotka ovat tavallisesti hellävaraisia.

Koska entsyymit ja muut biokatalysaattorit ovat tavallisesti vesiliukoisia, ne soveltuvat käytettäväksi panostyyppisissä reaktiosysteemeissä. Tällaisten entsyymien ja muiden biokatalysaattorien uudelleenkäyttö on rajoitettua, koska näiden materiaalien talteenotto käytetystä reaktioväliaineesta aktiivisessa tai käyttökelpoisessa muodossa on vaikeata. Materiaaleilla on myös taipumus jäädä valmistettuun tuotteeseen epäpuhtauksina. Näiden pulmien välttämiseksi on kehitetty menetelmiä sellaisten biologisten materiaalien immobilisoimiseksi, joiden katalyyttinen aktiivisuus säilyy liukenemattomissa kiinteissä kantaja-alustoissa. Immobilisoinnin avulla on tarkoituksena saada aikaan stabiloitua biologista materiaalia, joka kestää toistetun tai jatkuvan käytön rasitukset.

Useita biologisten materiaalien immobilisoimissysteemejä on jo selostettu. Entsyymejä on immobilisoitu absorboimalla liukenemattomaan materiaaliin kuten hiileen, lasiin, selluloosaan, kalsiumfosfaattigeeliin, montmorillonittiin, orgaanisiin ioninvaihtohartseihin ym. Immobilisointi on tapahtunut myös sulkemalla tärkkelykseen ja akryyliamidigeeleihin, kiinnittämällä kovalenttisesti entsyymit ja liukenemattomat

orgaaniset polymeerit toisiinsa, sekä kiinnittämällä itse entsyymimolekyylit kovalenttisesti toisiinsa.

Aikaisemman tekniikan mukaisissa menetelmissä päädytään usein tuotteisiin, joissa on pienempi biologinen aktiivisuus verrattuna vastaavaan sitomattomaan biologiseen materiaaliin. Näiden biologisten materiaalien tiedetään olevan herkkiä termiselle ja kemialliselle denaturoimiselle tai inaktivoimiselle. Biologisen aktiivisuuden väheneminen on usein tuloksena silloin, kun immobilisoimistoimenpiteet suoritetaan kovakouraisesti, ja erikoisen vaikeiksi tulevat olosuhteet, kun mukaan liittyvät polymeerin kondensoimisreaktiot. Aikaisemman tekniikan mukaisesti valmistetut tuotteet ovat lisäksi epäedullisia hydrofiilisyytensä, lujuutensa, kestävyytensä ja huokoisuutensa puolesta.

Kyseessä olevan keksinnön kohteena on sen vuoksi kehittää menetelmä biologisten materiaalien immobilisoimiseksi siten, että tuotteiden biologinen aktiivisuus ei pienene.

Tämän keksinnön kohteena on myös kehittää menetelmä biologisten materiaalien immobilisoimiseksi siten, että tuloksena olevissa tuotteissa on erinomainen lujuus, kestävyys, huokoisuus ja biologinen stabiilisuus. Keksinnön kohteena on vielä saada aikaan menetelmä, jonka avulla voidaan immobilisoida hyvin suuri määrä biologista materiaalia lopullisen kantaja-alustan tilavuusyksikköä kohti (suuri tiheys).

Nyttemmin on keksitty, että biologisia materiaaleja voidaan immobilisoida yksinkertaisella ja hyvin taloudellisella tavalla ja säilyttää samalla niiden katalyyttinen aktiivisuus korkealla tasolla. Kyseessä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan aikaan liukenemattomaksi tehtyä biologisen materiaalin seosta, joka sisältää biologista materiaalia suljettuna vermikuliittihiukkasiin, jotka on päällystetty polymeerillä. Valitun polymeerin laadusta ja vermikuliitin sisään suljetun

biologisen materiaalin laadusta riippuen saattaa olla edullista verkkouttaa tai kondensoida polymeeri. Aktiivisuuden vähenemistä tapahtuu vain hyvin vähän kun seos valmistetaan ja tällaisilla seoksilla on erinomainen lujuus ja kestävyys. Lisäksi, kun polymeeri verkkoutetaan tai kondensoidaan, voidaan näiden materiaalien hydrofiilisyyttä säätää vaihtelemalla verkkouttamis- tai kondensoimisastetta. Kyseessä olevan keksinnön mukaisen menetelmän avulla valmistetaan seosta, joka voidaan erottaa reaktioseoksista yksinkertaisen suodatuksen avulla, tai käyttää jatkuvissa reaktioprosesseissa kuten sellaisissa, joissa reagoiva substraatti virtaa pakatun pyl-
väsreaktorin läpi.

Kyseessä olevan keksinnön mukaan pannaan vermikuliittihiukkaset kontaktiin biologisen materiaalin kuten kokonaisten märkien solujen kanssa, jotka on saatu käymisliemestä. Biologisen materiaali absorboidaan vermikuliittihiukkasiin. Vermikuliittiin lisätään jotakin polymeeristä päällystysainetta hiukkasten päällystämiseksi. Erilaisia verkkouttamis-, kondensointi- ja geeliyttämisaineita voidaan sitten lisätä verkkouttamaan ja vahvistamaan polymeeriä ja/tai biologista materiaalia ja muodostamaan kova permeabeli päällystys. Valinnanvaraisesti voidaan polymeeriin yhdistää polykarboksyylihappoa muodostamaan veteen liukenevaa pre-polymeeriä ennen kuin se yhdistetään vermikuliittiin. Tämän menettelytavan tuloksena on biologisen materiaaliseoksen muodostuminen, jossa biologinen materiaali on immobilisoituna polymeerillä päällystettyyn vermikuliittiin.

Biologisen materiaalin immobilisoiminen vermikuliittiin voi tapahtua fysikaalisesti sulkemalla, tai sitomalla polymeeri kovalenttisesti verkkouttamis- tai kondensointiaineen ja biologisen materiaalin päällä olevien reaktiokykyisten ryhmien välityksellä, tai verkkouttamalla vermikuliittihiukkasten sisällä sopivan verkkouttamismateriaalin välityksellä. Kun polymeeri on esimerkiksi polyalkyleeni-imiiniä, voidaan

biologinen materiaali immobilisoida kovalenttin sidoksen kautta, koska biologisen materiaalin amiini- ja karboksyyli-ryhmät voivat substituoida joko amiiniryhmän polyalkyleeni-iminissä tai karboksyyli-ryhmän polykarboksyylihapossa, jota voidaan lisätä päällystettyyn vermikuliittiin. Kovalenttinen sitoutuminen polymeeriin tapahtuu lopuksi kondensointiaineen kautta.

Kyseessä olevan keksinnön menetelmän avulla voidaan valmistaa suuri joukko biologisen materiaalin seoksia. Biologinen materiaali voi olla entsyymejä, mikrobisoluja, antigeenejä, vasta-aineita, antibiootteja, koentsyymejä, kasvisoluja, eläinsoluja, bakteereja, hiivoja, sieniiä, kudosisviljelyjä tai niiden seoksia. Biologiset materiaalit lisätään vermikuliittiin mieluummin vettä sisältävässä muodossa.

On havaittu, että vermikuliitti on erinomainen kantaja-alusta biologisen materiaalin immobilisoimiseen. Vermikuliittihiukkaset pystyvät absorboimaan hyvin suuria määriä biologisia materiaaleja, niin että tuloksena on hyvin tiheä panostus. Vermikuliitti on myös hyvin halpaa ja helposti saatavissa, niin että sen käyttö tulee kantaja-alustana hyvin edulliseksi tuotteiden suuren mittakaavan valmistuksessa. Lopuksi vielä immobilisoitu kantaja-alusta, joka saadaan tällä biologisen materiaalin immobilisointimenetelmällä, on tukeva ja erittäin aktiivinen.

Tämän keksinnön mukaisessa immobilisointimenetelmässä käytetty vermikuliitti voi analyysien mukaan vaihdella hiukkaskokonsa puolesta hyvin paljon. Vermikuliitin hiukkaskoko voi esimerkiksi vaihdella hienosta jauheesta noin 1 cm:iin, etupäässä noin 0,5-1 mm välillä. Vermikuliittiin lisätyn biologisen materiaalin määrä voi vaihdella biologisen materiaaliseoksen lopullisen spesifisen käytön mukaan. Tavallisesti se on noin 0,001-2 g (kuivapaino) grammaa kohti käytettyä vermikuliittia, etupäässä noin 0,01 - noin 1 g grammaa kohti vermikuliittia.

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän avulla valmistetut biologisen materiaalin seokset voivat vaihdella suuresti hydrofiilisyyden, lujuuden, kestävyys ja huokoisuuden suhteen. Vermikuliitin päällystämiseen käytetyn polymeerin verkkouttamisasteen alentaminen voi aiheuttaa sen, että seoksen hydrofiilisyyden on suurempi. Multifunktionaalisten verkkouttamisaineiden lisääminen voi suurentaa polymeeri-vermikuliittibiologisen materiaaliseoksen lujuutta ja kestävyttä, ja lisätyt funktionaaliset ryhmät kondensoivat vielä lisää polymeeriä ja tekevät seoksen hydrofobisemmaksi.

Matriksen kokonaishuokoisuutta voidaan lisätä vesiliukoisen hiukkasmateriaalin avulla, joka lisätään polymeeriseokseen ennen kuin se on täysin kondensoitunut. Kuiva materiaali poistetaan sitten lisäämällä vettä kondensoinnin jälkeen, mikä liuottaa kiinteän aineen. Se osa seosta, jonka kiinteät aineet aikaisemmin syrjäyttivät, jää tyhjäksi, mikä lisää matriksen huokoisuutta. Mitä tahansa vesiliukoista hiukkasmateriaalia, joka ei vaikuta merkittävästi vahingollisesti polymeeriin, vermikuliittiin tai biologiseen materiaaliin, voidaan käyttää seoksen huokoisuuden parantamiseen. Vesiliukoiset polykarboksyylihapot, kuten ne joita käytettiin reaktiossa kondensoitumattomien polymeerien kanssa, ovat erikoisen sopivia matriksen huokoisuuden parantamiseen, koska ylimäärät huokoisuuden parantamiseen käytettyinä eivät häiritse lainkaan kondensaatio-reaktioita.

Menetelmässä käytettyjen polymeerien ja kyseessä olevan keksinnön mukaisten seosten molekyylipaino tavallisesti vaihtelee reaktio-olosuhteista riippuen ja niillä on etupäässä haarautunut ketjurakenne. Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan käyttää hyvin erilaista polymeerimateriaalia, kuten polyalkyleeni-imiinejä, polysakkarideja, polyakryyliamidia, polyuretaania, alginaattia ja karrageenania. Parhaina pidettyjä polymeerejä ovat polyalkyleeni-imiinit.

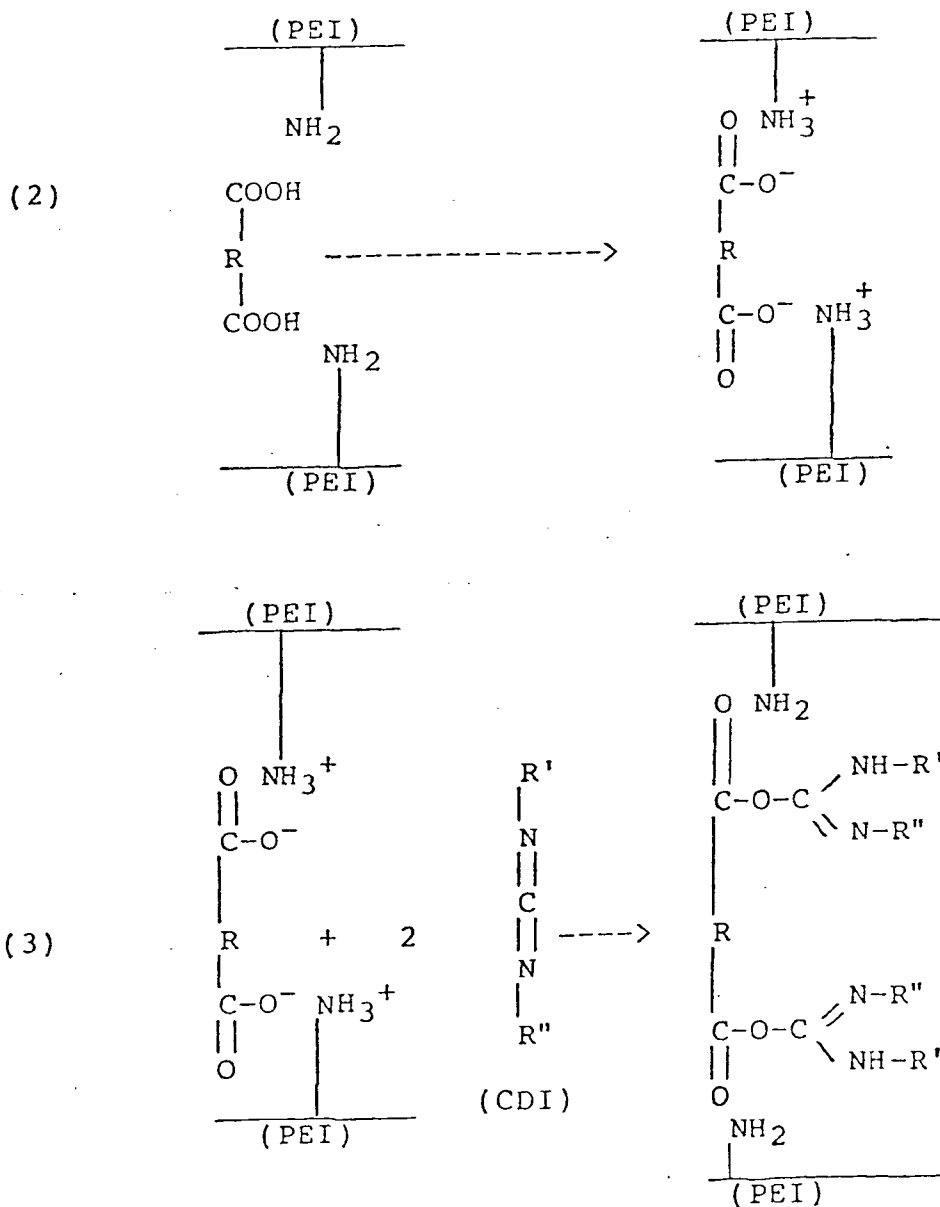
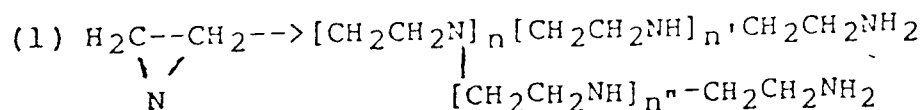
Polyalkyleeni-imiinejä voidaan valmistaa synteettisesti happokatalysoidun lisäyspolymeroinnin avulla alkyleeni-imiinimono-meereistä. Parhaana pidetty polyalkyleeni-imiini on polyetyyleeni-imiini (PEI), koska sitä on nykyisin helposti saatavissa suhteellisen alhaisella hinnalla ja se toimii hyvin kyseessä olevan keksinnön kondensaatioreaktioissa käytettynä. Polyetyyleeni-imiiniä valmistetaan renkaan avaus-polymeroinnin avulla etyleeni-imiinistä ja läsnä on esimerkiksi mineraalihappokatalysaattoreita. Polymeeri on hyvin haarautunut ja se sisältää primäärisiä, sekundäärisiä ja tertiäärisiä aminoryhmiä. PEI on vesiliukoinen ja verkkouttamalla tai kondensoimalla polymeeriketjuja saadaan veteen liukenematonta ainetta.

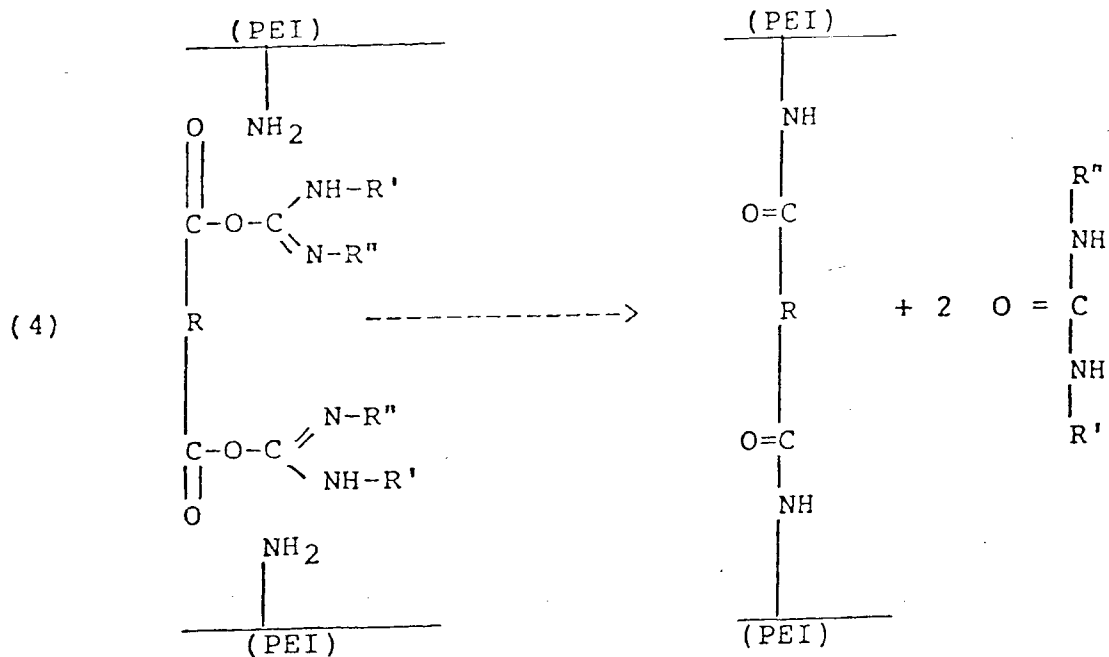
Polyetyyleeni-imiini voidaan verkkouttaa amiinia verkkouttavan aineen kanssa, mikä antaa lisästabiilisuutta ja voimakkuutta. Tällä käsittelyllä päästään suljettuun biologiseen materiaaliin, jossa on tapahtunut jonkin verran verkkoutumista polyalkyleeni-imiinin ja biologisen materiaalin vapaiden amiiniryhmien välillä. Verkkouttamisaineita ovat glutaari-dialdehydi, di-isosyanaatit, polyisosyanaatit, 2,4,6-trikloori-s-triatsiini, bisoksiraani, bis-imidaatti, divinyyliisulfoni, 1,5-difluori-2,4-dinitrobentseeni yms. Glutaari-dialdehydiä pidetään parhaana tähän tarkoitukseen.

Valittua polymeeriä tavallisesti lisätään seokseen riittävä määrä päällystämään vermikuliittihiukkaset hyvin ja tämä määrä voi vaihdella suuresti vermikuliitin hiukkasten koosta, biologisten materiaalien luonteesta ja halutuista fysikaalisista ominaisuuksista riippuen. Polymeeriä on tavallisesti noin 0,5 - noin 25 paino-% seoksesta ja etupäässä noin 2 % - noin 15 paino-% seoksesta. Verkkouttavan ja/tai kondensoivan aineen määrä, joka käytetään, on riippuvainen polymeerin määrästä, kuten edellä on esitetty.

Kun polymeeri on polyetyyleeni-imiiniä, käytetään eräässä erittäin tehokkaassa menetelmässä polykarboksyylihappoa

(PCA) kytkemään amiiniryhmiä viereisiin PEI-ketjuihin. Kondensointiaineet, etupäässä karbodi-imidit saavat helposti aikaan kondensoitumisen. Keksinnön mukaisen kondensoidun polyetyleeni-imiinin valmistukseen liittyviä reaktioita voidaan valaista seuraavalla kaaviolla:





Reaktio 1) esittää etyleeni-imiinin polymeroitumista, jolloin muodostuu PEI, jolla on haarautunut ketjurakenne ja jossa n ja n' ovat kokonaislukuja, jotka ovat suuremmat kuin 0 ja n'' voi olla 0 /mikä ilmoittaa, että ryhmä $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})$ on poissa/ tai suurempi kuin 0. Reaktio 2) esittää PEI:n amiiniryhmien suolan muodostuksen polykarboksyylihapon kanssa, jossa R voi olla substituoitu tai hiilivetyryhmä, reaktiot 3) ja 4) esittävät PEI:n ja polykarboksyylihapon kondensoitumisen käyttämällä karbodi-imidiä kondensointiaineena. R ja R' ovat hiilivetyryhmiä, jotka tullaan selostamaan täydellisemmin jatkossa muiden reagoivien aineiden ja esitettyjen reaktioiden olosuhteiden yhteydessä.

Kyseessä olevassa keksinnössä sopivat polykarboksyylihapot voivat tavallisesti olla substituoituja tai ei-substituoituja karboksyylihappoja, joissa on vähintään kaksi karboksyyli-ryhmää. Karboksyylihapot ovat mieluummin vesiliukoisia, niin että niitä voidaan käyttää seoksen huokoisuuden lisäämiseen samoin kuin polyalkyleeni-imiinin kondensoimiseen. Esimerkkeinä karboksyylihappoista, joita voidaan käyttää kyseessä olevan keksinnön mukaisissa menetelmissä ja seoksissa, ovat adipiinihappo, atselaiinihappo, 1,11-undekaanidioiinihappo, 1,12-dodekaanidioiinihappo, traumaattihappo, pentadekaanidioiini-

happo, heksadekaanidioiinihappo, sebasiinihappo, suberiinihappo, glutaarihappo, malonihappo, pimelliinihappo, meripihkahappo, maliinihappo, maleiinihappo, glutamiinihappo, asparagiinihappo, oksaalihappo, fumaarihappo, polyasparagiinihappo yms. Seuraaville dikarboksyylihapoille annetaan etusija tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi, nimittäin maleiinihappo, meripihkahappo, glutaarihappo ja adipiinihappo. Korkeampia polykarboksyylihappoja voi olla mikä tahansa aine, joka sisältää kaksi tai useampia karboksyylihapporyhmiä, ja niitä ovat korkean molekyyllipainon omaavat polymeerimateriaalit kuten polyasparagiinihappo, jonka molekyyllipaino on 5000-50 000. Kondensaatioreaktiot ovat tavallisesti eksotermisiä, sen vuoksi reaktioseokset on edullista jäähdyttää lämpötilaan, joka ei ole haitallinen immobilisoitavalle biologiselle materiaalille, esimerkiksi noin 37°C:een tai alemmaksi.

Polykarboksyylihapon ja polyalkyleeni-imiinin moolisuhde (PCA:PAI) voi vaihdella paljon reagoivien aineiden molekyyllipainon eroavaisuuden vuoksi. Tämä suhde on tavallisesti välillä 1:20-1:0,0005. Kun polykarboksyylihappoa lisätään kyseessä olevan keksinnön mukaisen seoksen huokoisuuden parantamiseksi, käytetään usein huomattava mooliylimäärä polykarboksyylihappoa.

Polykarboksyylihappoa voidaan lisätä kondensoiva määrä polyalkyleeni-imiiniin prepolymerointiolosuhteissa muodostamaan vesiliukoista prepolymeeriä. Prepolymeeri on tavallisesti viskoosia nestettä, johon voidaan mukavasti lisätä vermikuliittiä, joka sisältää immobilisoidun biologisen materiaalin ja ylläpitää suspensiossa kondensoimisreaktion ajan. Kondensointiaine lisätään ja tämä saa aikaan prepolymeeri-vermikuliitti-seoksen kondensoitumisen ja kiinteytymisen. Reaktioseoksen pH pidetään tasolla, joka ei olennaisesti inaktivoi tai vaikuta haitallisesti biologiseen materiaaliin. pH-alue voi olla välillä noin 2 - noin 12 ja etupäässä välillä noin 5 - noin 10.

Kuten edellä on huomautettu, jotta saataisiin aikaan polyalkyleeni-imiiniketjujen kondensoituminen polykarboksyylihappojen kanssa, käytetään edullisesti kondensointiainetta. Yleensä voidaan käyttää mitä tahansa kondensointiainetta, joka katalysoi tai helpottaa amiinien ja karboksyylihappojen reaktiota. Esimerkkeinä sellaisista kondensointiaineista ovat N-etyyli-5-fenyyli-isoatsolium-3-sulfonaatti, n-etoksikarbonyyli-2-etoksi-1,2-dihydrokinoliini, ja eri karbodi-imidit. Kondensointiaineina käytetyillä karbodi-imideillä tämän keksinnön mukaisissa seoksissa on kaava $R'-N=C=N-R''$, jossa R' ja R'' ovat hydrokarbyyliryhmiä, jotka sisältävät 3 - noin 20 hiiliatomia, etupäässä noin 5 - noin 12 hiiliatomia. Tällaisia kondensointiaineita ovat 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyyli-karbodi-imidi, di-sykloheksyyli-karbodi-imidi, 1-sykloheksyyli-3-(2-morfoliino-etyyli)-karbodi-imidimeto-p-tolueeni-sulfonaatti, tai niiden suolat. Karbodi-imidi kondensointiaineita lisätään reaktioseokseen kondensoiva määrä, joka on tavallisesti lähes stökiometrinen määrä, esimerkiksi noin 0,2-3 kertaa, etupäässä noin 0,5-1,5 kertaa stökiometrinen määrä. Kukin karbodi-imidimolekyyli reagoi yhden ainoan polykarboksyylihapon happoryhmän kanssa. Kyseessä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään tavallisesti karbodi-imidi/dikarboksyylihappo moolisuhteita noin 2:1. Kun kondensointiaine lisätään huoneen lämmössä, on kolmenkymmenen sekunnin kuluttua huomattavissa polymerisoitumista, ja se on tavallisesti tapahtunut täydelleen noin kahden tunnin kuluttua.

Kun polyetyleni-imiini on tehty liukenemattomaksi lisäämällä kondensointiainetta, vaihtoehtoisena jälkikäsitteilyvaiheena verkkoutetaan kondensoitu päällystetty vermikuliitti amiinia verkkouttavan aineen kuten glutaaridialdehydin kanssa kuten edellä on selostettu, minkä avulla saadaan lisälujuutta ja stabiilisuutta lopulliseen seokseen.

Valitun polymeerin tyypistä riippuen voidaan kondensointi- ja verkkoutumisaineet valita tekniikasta tunnetuista, seosta

vahvistavista aineista. Keksinnön mukaisten edellä selostettujen menetelmien avulla on mahdollista immobilisoida hyvin erilaisia biologisia materiaaleja ja saada uusia biokatalyyttisiä seoksia. Seuraavissa esimerkeissä on selostettu immobilisoimismenetelmiä yksityiskohtaisemmin. Nämä esimerkit selostavat keksinnön hyväksikäyttöä ja valmistusmenetelmiä ja -tapoja ja keksinnön useita toteutusmuotoja, mutta niitä ei ole tullut kattava rajoittaviksi.

Esimerkki I

Valmistettiin 80 g aspartaasia sisältävää E.coli'n solumassaa, joka sisälsi noin 75 paino-% vettä, tuoreesta aspartaasia sisältävästä E.coli'sta. Massan valmistamiseksi valmistettiin käymisväliainetta liuottamalla yhteen litraan vettä 24 g hiivauutetta, 30 g fumaarihappoa, 2 g natriumkarbonaattia, 2 mM magnesiumsulfaattia ja 0,1 mM kalsiumkloridia, ja pH säädettiin arvoon noin 7,2 ammoniumhydroksidin avulla. Tämä väliaine ympätettiin 1 ml:n kanssa E.coli'n viljelyä (ATCC n:o 31976), jota oli inkuboitu 12-16 h ajan 37°C:ssa peptoniväliaineessa, joka sisälsi 0,5 % mononatriumglutamaattia. Ympättyä väliainetta inkuboitiin 12-14 h 37°C:ssa. Solut koottiin sentrifugoimalla 5000 kierr/min 30 min ajan.

80 g aspartaasia sisältävää E.coli'a lisättiin 20 g:aan vermikuliittihiukkasia. Kun solumassan oli annettu absorboitua vermikuliittiin, lisättiin 10 g polyetyleni-imiiniä seokseen ja sekoitettiin kunnes jakautuminen oli tasaista. Sen jälkeen lisättiin glutaaridialdehydiä (20 g 25-prosenttista vesiliuosta) ja sekoitettiin kunnes tuloksena oli kovia hiukkasia. Toinen materiaalierä tehtiin saman menettelytavan mukaan. Molemmat materiaalierät jätettiin kuivamaan yli yön.

Materiaali pakattiin pylvääseen, jonka lopullinen alustavolyymi oli 353 cm³. Pylvästä käytettiin konvertoimaan ammoniumfumaatti L-asparagiinihapoksi. Ammoniumfumaraatin 1,5 M liuoksen, jossa oli 1 mM magnesiumsulfaattia, pH 8,5 37°C:ssa,

annettiin virrata läpi pylvään $360 \text{ cm}^3/\text{h}$ ($1,0 \text{ SV}^{\text{h}^{-1}}$). Laskuvirtaa monitoroitiin aspartaasi-aktiivisuuden suhteen mittaamalla fumaarihapon häviäminen spektrofotometrissä aallonpituudella 240 nm . Pylväs oli jatkuvassa toiminnassa 151 vrk. Tänä aikana tutkittiin pylvään laskuvirran näytteitä substraatin konversioprosentin määrittämiseksi. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Päivä	1,5 M ammoniumfumaraatin konversioaste (1 läpivirtaus 1 SV/h)
1	98,2
6	99,2
16	99,4
26	99,2
37	99,0
55	98,7
90	98,2
120	91,0
151	91,3

Esimerkki II

Seurattiin esimerkin 1 yleistä menettelytapaa käyttäen 120 g solumassaa ja 15 g polyetylenei-imiiniä. Yksi erä immobilisoitua materiaalia pakattiin 173 cm^3 :n alustavolyymiksi pylväsreaktoriin. Pylväs konvertoi menestyksellä 99 % $1,8 \text{ M}$ ammoniumfumaraattiliuoksesta $360 \text{ cm}^3/\text{h}$ virtaamalla ($2,08 \text{ SV}^{\text{h}^{-1}}$). Tämän pylvään tuotto laskettiin 493 g:ksi tuotettua L-asparagiinihappoa/litraa kohti alustavolyymiä immobilisoituja soluja/h lämpötilassa 37°C ($3,7 \text{ mol/l/h}$).

Esimerkki III

Kymmenen erää immobilisoituja *E.coli*'n soluja (100 g vermikuuliittia/erä) valmistettiin esimerkin II yleisen menettelytavan mukaisesti.

Biokatalysaattori pakattiin sitten 12,5 l alustavolyymiin pylvääseen. Ammoniumfumaraatin (1,8 M) 37°C:ssa annettiin virrata läpi pylvään eri suuruisilla virtausnopeuksilla ja laskuvirtaa tutkittiin ammoniumfumaraatin konversion suhteen kuten esimerkissä I. Taulukko II esittää testin tulokset.

Taulukko II

Virtausnopeus (l/h)	Konversio-% (fumaarihappo)	kg/h (L-asparagiini- happo)	Mol/l/h (L-asparagiinihappo)
12,50	99,1	2,97	1,79
18,75	97,5	4,38	2,63
25,00	95,0	5,69	3,42
62,50	56,00	8,38	5,04

Esimerkki IV

Toistettiin esimerkin III yleinen menettelytapa käyttäen tuoreita E.coli'n soluja sillä poikkeuksella, että tuoreissa soluissa oli 29 % enemmän aktiivisuutta kuin aikaisemmassa erässä. Kun substraatti virtasi pylvään läpi nopeudella 62,5 l/h (kuten esimerkissä III) oli tuotetun asparagiinihapon määrä 10,56 kg/h (6,35 mol/l/h). Tämä on 27 %:n nousu tuotoksessa esimerkkiin III nähden.

Esimerkki V

Entsyymi-tryptofaanin syntetaasia voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä katalysoimaan indolin ja seriinin konversiota tryptofaaniksi. Vermikuliitin hiukkasia (2 g) ja 4 ml puhdistamatonta tryptofaanin syntetaasin uuttoluosta E.coli-soluista sekoitettiin keskenään. Uutteen annettiin absorboitua vermikuliittiin. Sitten lisättiin polyetyleenimiiniä (1 g) seokseen vermikuliitti-hiukkasten päällystämiseksi. Sitten lisättiin glutaaridialdehydiä (2 ml 25-prosenttista vesiliuosta) ja sekoitettiin kunnes saatiin tulokseksi kovia päällystettyjä hiukkasia. Koko materiaalmäärä pantiin sitten pylvääseen ja pestiin substraattiliuoksella, joka sisälsi 0,5 M seriiniä, 0,05 M indolia, 0,005 M glutatonia,

0,005 M kaksiemäksistä kaliumfosfaattia ja 200 mg pyridoksaali-5-fosfaattia/litra, pH säädettiin arvoon 7,8. Pylvästä käytettiin sitten toistuvasti erien uudelleen kiertosysteemissä, jolloin tuotettiin 80 mg L-trypofaania 24 h aikana.

Esimerkki VI

9 g kokonaisia hiivasoluja *R. rubra*'sta, jotka sisälsivät entsyymi-fenyylialaniinin ammoniakkilyaasia sekoitettiin 3 g:aan vermikuliittihiukkasia, annettiin absorboitua ja päällystää täysin hiukkaset, sen jälkeen jäähdytettiin 10°C:een. Valmistettiin polysakkaridi-päällystysliuos lisäämällä 0,8 g Kelco-polysakkaridia (K9 A 50) jauheena 100 ml:aan deionoitua vettä 80°C:ssa ja sekoittaen 10 min ajan. Jauhe liukeni ja sitten lisättiin 1 g kaliumkloridia liuokseen. Liuoksen annettiin jäähtyä 50°C:een (pysyi liuoksena). Lämmin liuos kaadettiin sitten kylmän vermikuliittimateriaalin päälle sekoittaen. Polysakkaridi muodosti geelin hyvin nopeasti ja päällysti vermikuliittihiukkaset, jotka sisälsivät *R. rubra*'a. Hiukkaset pantiin 100 ml:aan 0,01 M kaliumfosfaattipuskuria, pH 7,0, ja pestiin sekoittaen läpikotaisin. Hiukkaset poistettiin puskuriliuoksesta. Liuos ei osoittanut mitään merkkiä samentumisesta ja se oli täysin vapaa hiivasoluista, mikä ilmoitti immobilisoitumisen onnistuneen. Hiukkaset pantiin 50 ml:aan 0,1 M ammoniumkinnamaattia pH-arvolla 9,3 ja liuoksen PAL-aktiivisuutta testattiin monitorimalla L-fenyylialaniinin tuotos. Immobilisoitu solumateriaali tuotti hyvällä menestyksellä L-fenyylialaniinia; aikaa myöten havaittiin lisääntyviä määriä L-fenyylialaniinia reaktioliuoksessa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, jonka avulla voidaan immobilisoida biologisia materiaaleja valmistamalla liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, t u n n e t t u siitä, että suoritetaan seuraavat vaiheet:

- a) lisätään vermikuliittihiukkasia biologisen materiaalin vesipitoiseen väliaineeseen;
- b) annetaan mainitun biologisen materiaalin vesipitoisen väliaineen absorboitua mainittuun vermikuliittiin; ja
- c) päällystetään mainittu vermikuliitti polymeerillä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen c) päällystetty vermikuliitti verkkoutetaan verkkouttamisaineen kanssa tai kondensoidaan kondensointiaineen kanssa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polymeeri valitaan ryhmästä, jonka muodostavat polyalkyleeni-imiinit, polysakkaridit, polyakryyliamidi, polyuretaani, alginaatti ja karrageenⁿⁱani.

4. Menetelmä, jonka avulla voidaan immobilisoida biologisia materiaaleja valmistamalla liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheet:

- a) lisätään vermikuliittihiukkasia biologisen materiaalin vesipitoiseen väliaineeseen;
- b) annetaan mainitun biologisen materiaalin vesipitoisen väliaineen absorboitua mainittuun vermikuliittiin;
- c) päällystetään mainittu vermikuliitti polyalkyleeni-imiini-polymeerillä; ja
- d) verkkoutetaan mainittu päällystetty vermikuliitti amiinia verkkouttavan aineen kanssa tai kondensoidaan se kondensointiaineen kanssa.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu polymeerillä päällystetty vermiku-

liitti sekoitetaan verkkouttavan määrän kanssa amiinia verkkouttavaa ainetta niin, että biologinen materiaali immobilisoituu mainitun päällystetyn vermikuliitin sisään.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu polyalkyleeni-imiini-polymeeri sekoitetaan kondensoivan määrän kanssa polykarboksyylihappoa, jolloin muodostuu osittain polymeroitua prekondensoitua veteen liukevaa polymeeriä ennen kuin se sekoitetaan mainitun vermikuliitin kanssa.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu päällystetty vermikuliitti kondensoidaan lisäämällä kondensoiva määrä karbodi-imidiä kun kondensoivaa ainetta kondensoimisolosuhteissa.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu päällystetty vermikuliitti kondensoidaan lisäämällä kondensoiva määrä karbodi-imidiä kondensoivaa ainetta kondensoimisolosuhteissa.

9. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisäksi modifioidaan liukenemattomaksi tehty biologinen materiaaliseos jälkikäsittelemällä sitä amiinia verkkouttavalla aineella, jotta seos saisi lisälujuutta ja stabiilisuutta.

10. Patenttivaatimuksen 4, 5, 6, 7 tai 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiini-polymeeri valitaan ryhmästä, jonka muodostavat polyetyleenimiini, polypropyleeni-imiini, polybutyleeni-imiini ja polypentyleeni-imiini.

11. Patenttivaatimuksen 4, 5, 6, 7 ja 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiini-polymeeri on polyetyleenimiini.

12. Patenttivaatimuksen 6 tai 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polykarboksyylihapo valitaan ryhmästä, jonka muodostavat maleiinihapo, meripihkahapo ja adipiinihapo.

13. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karbodi-imidin kondensoiva aine valitaan ryhmästä, jonka muodostavat 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyyli-karbodi-imidin hydrokloridi, disykloheksyyli-karbodi-imidi ja 1-sykloheksyyli-3-(2-morfoliinoetyyli)-karbodi-imidimeto-p-tolueeni-sulfonaatti ja niiden suolat.

14. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu amiinia verkkouttava aine valitaan ryhmästä, jonka muodostavat glutaaridialdehydi, di-isosyanaatit, polyisosyanaatit, 2,4,6-trikloori-5-triatsiini, bis-oksiraani, bis-imidaatti, divinyylisulfoni ja 1,5-difluori-2,4-dinitrobentseeni.

15. Patenttivaatimuksen 1 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun biologisen materiaalin määrä, joka lisätään mainittuun vermikuliittiin, on noin 0,001- noin 2 g laskettuna kuiva-aineesta grammaa kohti vermikuliittia.

16. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiinin ja polykarboksyylihapon moolisuhde on noin 1:20-1:0,0005.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karbodi-imidiä käytetään sellainen määrä, että se on noin 0,2-3 kertaa stökiometrinen määrä suhteessa polykarboksyylihappoon.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karbodi-imidiä käytetään sellainen määrä, että se on noin 0,5-1,5 kertaa stökiometrinen määrä suhteessa polykarboksyylihappoon.

19. Patenttivaatimuksen 1 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoitu biologinen materiaali valitaan ryhmästä, jonka muodostavat entsyymit, mikrobisolut, antigeenit, vasta-aineet, antibiootit, koentsyymit, bakteerit, hiivat, sienet, kasvisolut, eläinsolut ja kudosisviljelyt.
20. Patenttivaatimuksen 1 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologinen materiaali on mikrobisesti valmistettua aspartaasia.
21. Patenttivaatimuksen 1 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on tryptofaanin syntetaasia.
22. Liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää biologisesti aktiivia materiaalia absorboituneena vermikuliittihiukkasiin, jotka on immobilisoitu polymeerin sisään.
23. Liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, joka sisältää biologisesti aktiivia materiaalia absorboituna vermikuliittihiukkasiin, jotka on immobilisoitu polymeerin sisään, t u n n e t t u siitä, että mainittu polymeeri on verk-koutettu verkkouttamisaineen kanssa.
24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, t u n n e t t u siitä, että polymeeri on polyalkyleeni-imiiniä ja verkkouttamisaine on amiinia verkkouttava aine.
25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että amiinia verkkouttava aine valitaan ryhmästä, jonka muodostavat glutaaridialdehydi, di-isosyanaatit, polyisosyanaatit, 2,4,6-trikloori-S-triatsiini, bis-oksiraani, bis-imidaatti, divinyylisulfoni ja 1,5-difluori-2,4-dinitrobentseeni.
26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että amiinia verkkouttava aine on glutaaridialdehydi.

27. Liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, joka sisältää biologisesti aktiivista materiaalia adsorboituna vermikuliittihiukkasiin, jotka on immobilisoitu polymeerin sisään, t u n n e t t u siitä, että mainittu polymeeri kondensoidaan kondensointiaineen kanssa.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen liukenemattomaksi tehty biologisen materiaalin seos, t u n n e t t u siitä, että polymeeri on polyalkyleeni-imiiniä ja kondensointiaine on karbodi-imidiä kondensoiva aine.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että kondensointiaine valitaan ryhmästä, jonka muodostavat l-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidin hydrokloridi, disykloheksyyli-karbodi-imidi ja l-sykloheksyyli-3(2-morfoliinoetyyli)-karbodi-imidi-meto-p-tolueeni-sulfonaatti ja niiden suolat.

30. Patenttivaatimuksen 24 tai 26 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiini-polymeeri valitaan ryhmästä, jonka muodostavat polyetylenei-imiini, polypropyleeni-imiini, polybutyleeni-imiini ja polypentyleeni-imiini.

31. Patenttivaatimuksen 22, 23, 24, 27 tai 28 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen materiaali valitaan ryhmästä, jonka muodostavat entsyymit, mikrobisolut, antigeenit, vasta-aineet, koentsyymit, kasvisolut, eläinsolut, bakteerit, hiivat, sienet ja kudosisäilyt.

32. Patenttivaatimuksen 22, 23, 24, 27 tai 28 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen materiaali on aspartaasia.

33. Patenttivaatimuksen 22, 23, 24, 27 tai 28 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen materiaali on tryptofaanin syntetaasia.

34. Menetelmä, jonka avulla voidaan valmistaa asparagiinihappoa siten, että pannaan kontaktiin asparagiinihapon valmistusolosuhteissa substraattia, joka sisältää ammoniumfumaraattia, liukenemattomaksi tehdyn biologisen materiaalin seoksen kanssa, jossa on aspartaasia tai aspartaasia sisältäviä mikrobisoluja absorboituina vermikuliittihiukkasiin ja immobilisoituna polymeeriin, t u n n e t t u siitä, että immobilisoitu vermikuliitti on verkkoutettu verkkouttamisaineen kanssa tai kondensoitu kondensointiaineen kanssa.

35. Menetelmä, jonka avulla voidaan valmistaa tryptofaania siten, että pannaan kontaktiin tryptofaanin valmistusolosuhteissa substraatti, joka sisältää indolia ja seriiniä, liukenemattomaksi tehdyn biologisen materiaalin seoksen kanssa, joka sisältää tryptofaanin syntetaasia tai tryptofaanin syntetaasia sisältäviä mikrobisoluja absorboituina vermikuliittihiukkasiin ja immobilisoituina polymeeriin, t u n n e t t u siitä, että immobilisoitu vermikuliitti on verkkoutettu verkkouttamisaineen kanssa tai kondensoitu kondensointiaineen kanssa.

36. Menetelmä, jonka avulla voidaan valmistaa L-fenyylialaniinia siten, että pannaan kontaktiin L-fenyylialaniinin valmistusolosuhteissa substraatti, joka sisältää ammoniumkinnamaattia, liukenemattomaksi tehdyn biologisen materiaalin seoksen kanssa, joka sisältää fenyylialaniinin ammoniakki-liuosta tai fenyylialaniinin ammoniakki-lyyaaasia sisältäviä mikrobisoluja absorboituina vermikuliittihiukkasiin ja immobilisoituina polymeeriin.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

FI

WO -4-81/03338 (~~to~~ C12N 11/14)

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Biotechnology Letters, vol. 4, no 5,
May, 1982, ss. 323-28

Zaborsky, O., *Immobilized Enzymes*,
3. p., 1974, CRC Press, Ohio

14/7-87 Reen Tirkkainen

Allekirjoitus