



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8002658**

Nederland

⑲ **NL**

- ⑤④ **Reactievat.**
- ⑤① Int.Cl.³: C12N11/12.
- ⑦① Aanvrager: Italfarmaco S.p.A. te Milaan, Italië.
- ⑦④ Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②① Aanvraag Nr. 8002658.
- ②② Ingediend 8 mei 1980.
- ③② Voorrang vanaf 8 mei 1979.
- ③③ Land van voorrang: Italië (IT).
- ③① Nummer van de voorrangsaanvraag: 2244879 .
- ②③ --
- ⑥① --
- ⑥② --

-
- ④③ Ter inzage gelegd 11 november 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Reactievat.

De uitvinding heeft betrekking op een reactievat, dat geschikt is voor het uitvoeren van enzymatische reacties. Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een stromingsreactievat, waarin de enzymen, die worden gebruikt, onbeweeglijk worden gemaakt op een vaste matrix, voorzien van een vlak oppervlak.

Het is algemeen bekend, dat enzymen een zeer sterke specifieke hoedanigheid vertonen met betrekking tot de betreffende substraten. Deze specifieke hoedanigheid is de grond voor het gebruik van de enzymen voor produktie-, alsmede analytische doeleinden op een verscheidenheid van gebieden, zoals verontreinigingscontrole, produktie van voedingsmiddelen, alsmede klinische chemie.

De beperkingen bij de toepassingsmogelijkheid van de enzymen zijn in hoofdzaak het gevolg van twee factoren:

a) de betrekkelijke instabiliteit van het enzym in een oplossing in water, en

b) de kosten van dergelijke enzymatische reacties, welke kosten veelal zeer hoog zijn en in aanzienlijke mate zouden kunnen worden verlaagd indien het enzym op een ononderbroken of onderbroken wijze opnieuw zou kunnen worden gebruikt.

Het algemeen bekende beginsel van het onbeweeglijk maken van enzymen op een vaste matrix, hetgeen wordt bereikt door een chemische reactie of door adsorptie, beperkt de genoemde moeilijkheden tot een minimum, omdat het, het terugwinnen mogelijk maakt van het katalytische vermogen van het enzym. Vanuit dit beginsel en met het oog op de noodzaak van het op een ononderbroken wijze terugwinnen van de katalytische activiteit van het enzym, zijn drie werkwijzen ontwikkeld, welke werkwijzen stoelen op het gebruik van reactievaten met een ononderbroken stroming, waarbij de enzymen onbeweeglijk worden gemaakt voor produktie-, alsmede analytische doeleinden. De drie werkwijzen stoelen op het gebruik van:

1. een kolom, waarbij het enzym wordt vastgezet aan kralen van passende polymeren;

2. een buis, waarbij het enzym wordt vastgezet aan de wand van de buis, die is gemaakt van een passend materiaal;

5 3. een membraan, waarbij het enzym wordt vastgezet aan een passend semi-permeabel membraan of onbeweeglijk wordt gemaakt binnen twee semi-permeabele membranen.

Een gemeenschappelijk kenmerk van elke soort stromingsreactievat is de aanraking tussen het enzym, dat onbeweeglijk is gemaakt, en het substraat, en in bepaalde gevallen eveneens de bijkomende factoren, welk substraat in een ononderbroken stromende oplossing wordt opgelost.

10 Indien de aanraking tussen het substraat en het enzym wordt uitgedrukt in de tijdsduur, wordt deze tijdsduur de belangrijkste, zo niet de enige factor, die de biochemische omvorming van het substraat beïnvloedt, hetgeen ook de opbrengst van de substraatomzetting wordt genoemd. Ten behoeve van het bereiken van hoge substraat-omzettingen, hetgeen een proces is, dat veelal het signaal bepaalt, dat moet worden gebruikt bij het analytisch bepalen van het substraat zelf, is het van voordeel, dat de aanrakingstijdsduur tussen het enzym en het substraat zo lang mogelijk is, zo lang het verenigbaar is met 1) de afmetingseigenschappen, alsmede de vervaardigings-eisen van het stromingsreactievat, en 2) de totale tijdsduur met betrekking tot de analyse, zodat de enzymatische werkwijze op routineschaal bruikbaar is. Dit is bedoeld een zodanige omzettingso-
20 mbrengst te bereiken, dat het mogelijk is een waarneemgevoeligheid te verkrijgen, die bruikbaar is bij analytische toepassingen.

Reactievaten met een ononderbroken stroming, waarin gebruik wordt gemaakt van een dunne buis, zijn met goed gevolg toepasbaar
30 gebleken voor analytische doeleinden ondanks het feit, dat dergelijke reactievaten aanzienlijke moeilijkheden verschaffen bij het onbeweeglijk maken van het enzym op de inwendige wand van de buis, welk onbeweeglijk maken alleen kan worden bereikt door chemische middelen en niet door adsorptie. Verder omvat deze soort reactievaten vloeistofvolumes, die niet verwaarloosbaar zijn bij een aanzien-
35



800 2658

lijk verbruik van reagentia.

Ook stromingsreactievaten, die kolommen hebben, die zijn gevuld met kralen, zijn gebruikt, maar vertonen ernstige moeilijkheden van mechanische sterkte als een functie van de stroming naast
5 de moeilijkheden van het normaliseren van de stroming bij toepassing op een ononderbroken wijze.

Hoewel de produktiekosten natuurlijk veranderlijk zijn van een model tot een ander en van een enzym tot een ander enzym, zijn deze kosten verder in het algemeen betrekkelijk hoog, in het bijzonder indien het feit wordt beschouwd, dat de levensduur van het reactievat afhankelijk is van de activiteitsduur van het enzym, dat
10 onbeweeglijk wordt gemaakt.

De kern van de uitvinding ligt in het verschaffen van een bijzondere soort reactievat voor het uitvoeren van enzymatische reacties, waarbij het enzym onbeweeglijk wordt gemaakt op een matrix, voorzien van een vlak oppervlak, welk reactievat de hiervoor
15 vermelde nadelen opheft en de volgende voordelen vertoont:

1) het gebruik van enzymen, die door chemische middelen gemakkelijk onbeweeglijk worden gemaakt op een vaste matrix, alsmede
20 het gebruik van enzymen, die eenvoudiger worden geadsorbeerd op een vaste matrix;

2) het gebruik van reactievolumes, die over het algemeen zeer klein zijn;

3) laminaire stromingswerking, die plat is in plaats van cilindrisch met een daaruit voortvloeiende vergroting van de aanraking tussen het enzym en de substraatoplossing, en in bepaalde gevallen eveneens de bijkomende factoren;

4) het gebruik van een draagmatrix, die hydrofoob, alsmede proteïnehoudend van aard kan zijn;

5) het gebruik van een matrix van de soort, bestaande uit filterpapier, hetgeen het mogelijk maakt een stromingsreactievat te verkrijgen met eigenschappen, die zeer veel lijken op de eigenschappen van reactievaten, bestaande uit een gevulde kolom, met
30 een aanzienlijke verbetering van de stromingseigenschappen;

6) het gedurende de enzymatische reactie opheffen van diffusieverschijnselen, die optreden in reactievaten, voorzien van een
35

800 2658

semi-permeabel membraan , welke verschijnselen gebruikelijk zijn in b.v. reactievaten, voorzien van een membraan volgens een spiraalvormige opstelling of in reactievaten, waarin het enzym onbeweeglijk is gemaakt tussen twee semi-permeabele membranen. Deze
5 diffusieverschijnselen veroorzaken een opnieuw mengen met als gevolg, dat de feitelijke concentratie van het substraat in de reactiekamer afneemt, en tevens dat de snelheid van de enzymatische reactie afneemt. Het uiteindelijke resultaat is een vermindering van de omzettingsopbrengst en derhalve een verlaging van de sterkte
10 van het. waarneemsignaal van de enzymatische reactie zelf;

7) het tot een minimum beperken van de mogelijkheid van het weer mengen van de materialen nadat de enzymatische reactie heeft plaats gevonden, welk opnieuw mengen een aanzienlijke vermindering veroorzaakt van de gevoeligheid omdat het de concentratie vermindert van het produkt van de enzymatische reactie, met een daaruit
15 voortvloeiende verlaging van de sterkte van het waarneemsignaal;

8) gemakkelijke vervaardiging, hetgeen nog belangrijker is indien de aanzienlijke moeilijkheden worden beschouwd die samenhangen met andere inrichtingen, in het bijzonder membraanreactievaten;

20 9) een aanzienlijke verlaging van de produktiekosten.

Deze voordelen worden alle bereikt zonder verlies van de voordelen van andere soorten reactievaten, die gewoonlijk worden gebruikt, omdat de eenvoudige vervanging van de matrix, waarop het enzym onbeweeglijk is gemaakt, in plaats van het vervangen van het
25 gehele reactievat, de werkzaamheid van het reactievat herstelt. Het onderhavige reactievat maakt het combineren mogelijk van de eenvoud van de werkwijzen van het onbeweeglijk maken van het enzym op een oppervlak, hetgeen op een stabiele wijze tot stand kan worden gebracht door middel van covalente bindingen of nog eenvoudiger door
30 absorptie, met het bereiken van een laminaire stroming op het oppervlak, waarop het enzym onbeweeglijk is gemaakt, welke laminaire stroming plat is en een minimum dikte vertoont, zodat de mogelijkheid van opnieuw mengen, hetgeen kenmerkend is voor membraanreactievaten, niet optreedt. Een maximum aanrakingsdoelmatigheid tussen de twee fysische fasen wordt bereikt, en derhalve wordt een optimale



katalytische werking verkregen ondanks een kortere aanrakingstijd. Deze resultaten worden bereikt door het door de oplossing laten volgen van een beweging, die volgens een raaklijn moet zijn met betrekking tot het oppervlak, welke beweging regelmatig is en volgens een willekeurige baan ten behoeve van het tot stand brengen van aanraking tussen het fluïdum met de maximum hoeveelheid van het draagoppervlak van dezelfde enzymatische activiteit.

In het onderhavige reactievat wordt deze beweging bereikt door middel van een dun kanaal met een willekeurige gedaante in een van de eindvlakken van een half blok van een stromingscel, voorzien van twee tegenover elkaar liggende eindvlakken, gebouwd van een chemisch inert materiaal, b.v. tetrafluoropolyetheen, polyvinylchloride, polyetheen, polyamide, roestvrij staal, enz., waarbij het andere halve blok het onbeweeglijk gemaakte enzym draagt.

Ook kan het hiervoor vermelde dunne kanaal worden gebouwd in beide halve blokken. Dit kanaal kan direct worden verkregen door middel van een insnijding in het oppervlak van een van de of beide blokken van het reactievat of indirect door b.v. een dunne laag of een draad toe te passen, die van roestvrij staal kan zijn of van tetrafluoropolyetheen of een ander inert materiaal, waarop of door middel waarvan de stromingsbaan wordt verkregen, welk kanaal wordt aangebracht tussen de twee halve blokken van de cel, voorzien van een vlak oppervlak.

Een essentiële voorwaarde is, dat de wanden tussen de twee kanalen dun moeten zijn en kleiner dan de maximum afmetingen van het stromingskanaal. Afgezien van deze voorwaarde is in hoofdzaak de totale hoeveelheid van het enzym, gedragen door de vaste matrix, voorzien van een vlak oppervlak, in aanraking met de oplossing van het substraat, zodat het dus in een toestand is, geschikt voor het uitvoeren van katalytische activiteit.

De invoer en de afvoer van de circulerende oplossing kunnen op twee willekeurige plaatsen van elk der twee halve blokken worden aangebracht, onafhankelijk van de richting van de circulatie van de oplossing. Op deze wijze is een reactievat het gevolg, dat in hoofdzaak wordt gevormd door een dun kanaal met veranderlijke ge-

daante.

Vooropgesteld dat de laminaire stroming zo dun mogelijk is, is de enzymatische activiteit voldoende voor het bereiken van een goede omzettingssnelheid van het substraat in het produkt met een
5 daaruit voortvloeiende mogelijkheid van het verminderen van de aan-
rakingsoppervlakken, alsmede als gevolg daarvan de volumes, die moeten worden gebruikt.

Indien het voordelig blijkt hetzelfde substraat te onderwer-
pen aan een reeks van twee of meer opeenvolgende reacties, is het
10 mogelijk het onderhavige reactievat te bouwen in de gedaante van
een modulair reactievat, dat twee of meer onderhavige reactiekamers
bevat, zoals hiervoor beschreven, van elkaar gescheiden door middel
van halve blokken met een passende gedaante en onderling verbonden
door middel van doorstroomopeningen met een zodanige gedaante, dat
15 de oplossing, die het substraat bevat, opeenvolgend door dezelfde
kamers kan gaan.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van de teke-
ning, waarin:

Fig.1 schematisch in dwarsdoorsnede een microstromingsreactie-
20 vat toont;

Fig.2 een bovenaanzicht is van het halve blok A van fig.1;

Fig.3 een bovenaanzicht is van het halve blok B;

Fig.4 schematisch het microstromingsreactievat toont, gemon-
teerd in lijn met een inrichting;

25 Fig.5 grafisch de signalen weergeeft, die worden geregi-
streerd bij toepassing van kleine hoeveelheden substraat; en

Fig.6 grafisch de signalen weergeeft, die worden geregi-
streerd bij toepassing van grotere hoeveelheden substraat.

Voorbeeld I

30 Onder verwijzing naar fig.1 duidt de letter A een van de hal-
ve blokken aan, die b.v. is gemaakt van kunststofmateriaal. In dit
halve blok is een dun ononderbroken kanaal verkregen door insnijden,
welk kanaal in dit bepaalde geval de gedaante heeft van een spiraal.
In dit geval heeft het kanaal een driehoekige dwarsdoorsnede, een
35 maximum diepte van 0,5 mm met een onderkant van 1 mm, een lengte van

8002658

180 mm en een volume van 45 ydm³.

Het enzym wordt onbeweeglijk gemaakt op een vaste matrix M, voorzien van een vlak oppervlak en in de gedaante van een vel of foelie, bij dit voorbeeld een filterpapier. Opgemerkt moet echter
5 worden, dat een willekeurig ander materiaal, zowel hydrofoob als hydrofiel, in de gedaante van een vel of een foelie of een membraan, kan worden gebruikt. Het vel of de foelie wordt tot hechten gebracht aan het halve blok B, dat zodanig is geconstrueerd, dat de cellulose matrix wordt samengedrukt tegen de spiralen van het halve blok A.
10 Bij het in de figuur weergegeven voorbeeld zijn de twee halve blokken hermetisch afgesloten door middel van bevestigingsschroeven S.

De middelen voor de inlaat en de uitlaat van de oplossing zijn aangebracht in hetzelfde halve blok A, door middel van doorstroomopeningen met passende afmetingen, b.v. een diameter van
15 0,2 mm, welke openingen zijn aangeduid door de letters C en D in fig.1 ten behoeve van het voorkomen van het optreden van het op-nieuw mengen. Pijpfittingen van een passend materiaal, b.v. een polyamide of tetrafluoropolyetheen of staal, zijn gemonteerd aan deze doorstroomopeningen, die een soortgelijke diameter van 0,2 mm
20 hebben. De pijpfittingen zijn resp. verbonden met een stelsel voor het invoeren van het fluïdum en ook een stelsel voor het waarnemen van het signaal van de enzymatische reactie. Bij dit voorbeeld wordt een spectroscopische detector gebruikt, waarbij het echter mogelijk is elektrochemische of spectrofluorimetrische detectoren of andere
25 te gebruiken.

Zoals weergegeven in fig.2 is het halve blok A van fig.1 voorzien van de openingen C en D voor resp. de inlaat en de uitlaat.

In het reactievat, dat bij dit voorbeeld is weergegeven,
30 is het percentage actief oppervlak van het enzym, welk oppervlak in aanraking komt met de oplossing, met betrekking tot de totale hoeveelheid oplossing, gelijk aan 90%.

Met deze inrichting wordt het enzym onbeweeglijk gemaakt, waarbij het echter gemakkelijk is een enzym te vervangen door een
35 ander enzym omdat het eerste enzym is uitgeput of omdat het gewenst

is met een enzym te werken, dat een andere activiteit heeft. De vervanging wordt eenvoudig uitgevoerd door het vervangen van de matrix waarbij het gehele reactievat opnieuw wordt gebruikt. Dit vormt een groot verschil tussen het onderhavige reactievat en andere stromingsreactievaten, voorzien van een enzymatische activiteit, die een volledige vervanging vereisen wanneer de enzymatische activiteit aanzienlijk is afgenomen.

Voorbeeld II

Het in voorbeeld I beschreven microstromingsreactievat is gemonteerd in lijn met de gehele inrichting, schematisch weergegeven in fig.4. De letter A duidt een pomp aan, voorzien van een regelbare afgifte. De letter B duidt de voorraadhouder aan van de bufferoplossing. De letter C is een injecteur met een tussenschot, waarbij de letter R het stromingsreactievat aanduidt. De detector van de spectrofotometrische soort is aangeduid door de letter D, waarbij de letter E een stelsel aanduidt voor het registreren van het signaal, uitgezonden door de detector D.

Bij het in de praktijk in werking zijn wordt een passende bufferoplossing gedwongen met b.v. een stromingssnelheid van 0,25 cm³/min te stromen door het reactievat, waarin een foelie of een vel of een membraan is gemonteerd, voorzien van enzymatische activiteit, b.v. peroxydase. Het enzym wordt onbeweeglijk gemaakt door middel van covalente bindingen of kan op de matrix worden geadsorbeerd.

Zodra omstandigheden van een gelijkblijvende stroming zijn bereikt, wordt een passende hoeveelheid van de substraatoplossing in de stroming geïnjecteerd door middel van de injecteur met een tussenschot, aangeduid door de letter C. Tijdens het met een laminaire stroming bewegen door het dunne kanaal, dat in het reactievat is gevormd, wordt de onderlaag onder de werking van het enzym omgezet. Deze omzetting produceert in het waarneemstelsel D een verandering van het signaal, hetgeen wordt geregistreerd in E.

Zoals weergegeven in fig.5 zijn de signalen, die worden geregistreerd, evenredig aan de hoeveelheid van het substraat, dat wordt ingevoerd.

800 26 58

Voorbeeld III

Het hiervoor beschreven voorbeeld II heeft betrekking op een toepassing van het stromingsreactievat in het geval, dat het gaat om kleine hoeveelheden substraat. Wanneer het nodig is oplossingen te analyseren met een lage substraatconcentratie, is het mogelijk dezelfde inrichting voor het substraat op een ononderbroken wijze toe te passen doormiddel van een passende zeswegklep, b.v. van de lussoort, welke klep wordt geladen met de substraatoplossing, die moet worden onderworpen aan de enzymatische reactie.

Hetzelfde samenstel als weergegeven in fig.4 wordt gebruikt met als enige verandering, dat het injectiestelsel, voorzien van een tussenschot, aangeduid door de letter C, wordt vervangen door een injectiestelsel, voorzien van een klep. Onder de omstandigheden van een gelijkblijvende stroming wordt een passende hoeveelheid van de oplossing van het substraat ingevoerd door middel van een klep, welk substraat de enzymatische reactie ondergaat onder omstandigheden van een stationaire toestand. De enzymatische reactie produceert in het waarneemstelsel D een verandering van het signaal, hetgeen wordt geregistreerd in E. Zoals weergegeven in fig.6 is het geregistreerde signaal evenredig aan de hoeveelheid substraat, aanwezig in de stromen oplossing.



800 2658

C o n c l u s i e s :

=====

1. Reactievat met laminaire stroming voor reacties met een enzym of cofactoren, waarbij het enzym of de cofactor onbeweeglijk wordt gemaakt op een matrix met een vlak oppervlak, gekenmerkt door een cel, die twee halve blokken omvat met een vlak oppervlak, waarbij een van de halve blokken is voorzien van een kanaal, dat de reactiekamer vormt met een laminaire stroming, welke twee halve blokken hermetisch zijn bevestigd.
2. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de reactiekamer is gevormd door het insnijden van een dun kanaal in het eindvlak van een van de halve blokken, waarbij het tweede halve blok dient voor het afsluiten van de reactiekamer.
3. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de reactiekamer wordt gevormd door een ononderbroken kanaal, verkregen door het aanbrengen van een dunne laag of een draad van een chemisch inert materiaal met een dikte tussen 0,1 en 2 mm voor het bouwen van de wanden van het kanaal, waarbij de afsluiting van de reactiekamer onder druk is en wordt verschaft door de twee halve blokken met een vlak oppervlak, die drukken tegen de dunne laag, die het dunne kanaal vormt.
4. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de baan die de laminaire stroming verschaft, een verscheidenheid van gedaanten heeft en het gebruik mogelijk maakt van een maximum aanrakingsoppervlak.
5. Reactievat volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat de substraatoplossing beweegt volgens de genoemde baan, die een spiraalvormige gedaante heeft.
6. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat doorstroomopeningen zijn aangebracht in althans één van de halve blokken, welke doorstroomopeningen de inlaat- en uitlaatmiddelen vormen van de reactieoplossing.
7. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het enzym of de cofactor onbeweeglijk wordt gemaakt op een vaste ma-

800 26 58

trix met een vlak oppervlak, waarbij middelen zijn aangebracht voor het door een andere matrix vervangen van deze matrix.

5 8. Reactievat volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de draagmatrix van het enzym of de cofactor in de vorm is van een foelie of een vel of een membraan.

9. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de matrix, die het enzym of substraat draagt, is gemaakt van papier.

10. Reactievat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het kanaal is aangebracht in beide halve blokken.



800 26 58

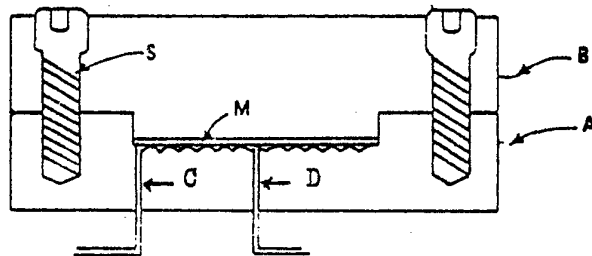


FIG. 1

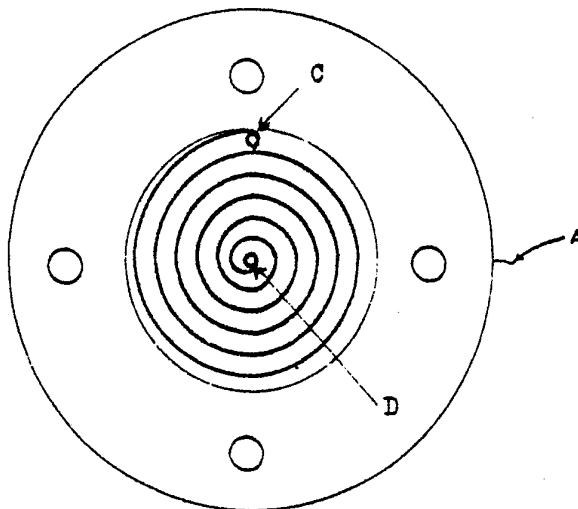


FIG. 2

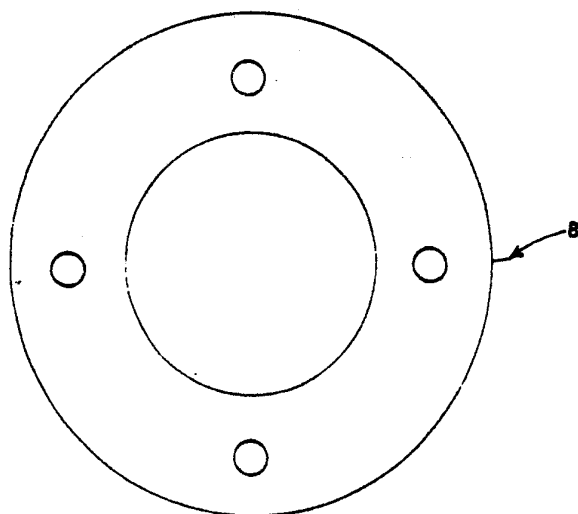


FIG. 3

8002658

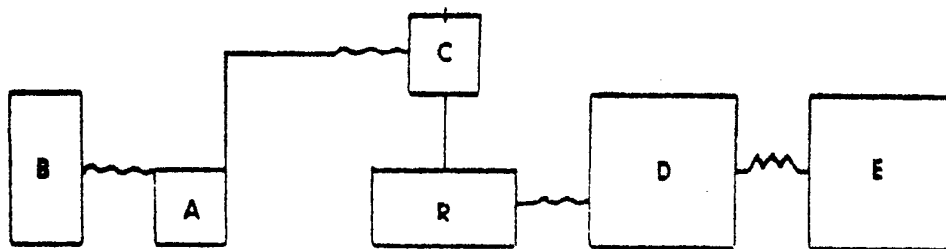


FIG. 4

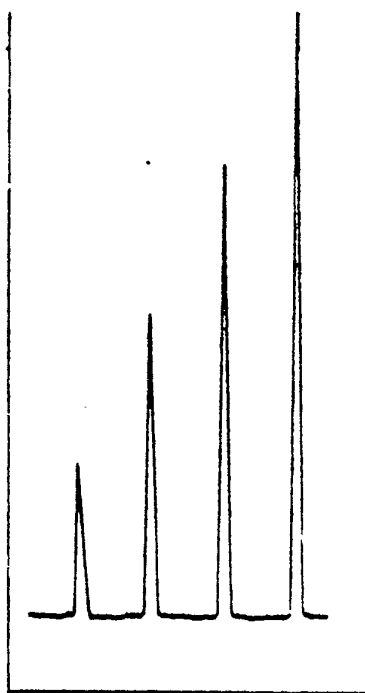


FIG. 5

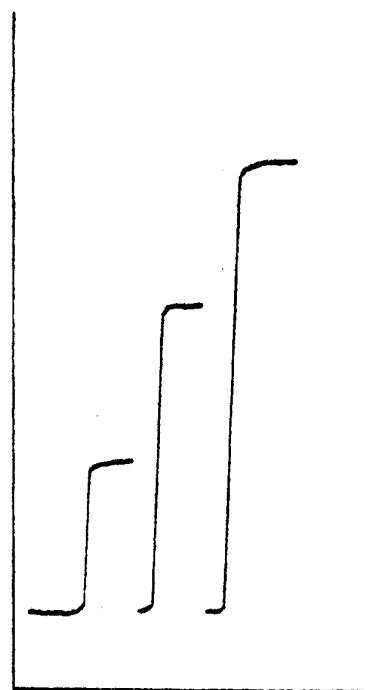


FIG. 6

8002658