

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 153762 B

(21) Patentansøgning nr.: 0878/85

(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 11/00

C 12 P 7/64

(22) Indleveringsdag: 27 feb 1985

(41) Alm. tilgængelig: 28 aug 1986

(44) Fremlagt: 29 aug 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *NOVO INDUSTRI A/S; Patent- og Varemærkeafdelingen; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Peter *Eigtved; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat**

(56) Fremdragne publikationer

EP pat. nr. 35883 B1

Andre publikationer. Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol, 17
(1983), s. 107-112.

(57) Sammendrag:

878-85

Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipase-
præparat og anvendelse deraf.

Fremgangsmåden til fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat består i, at man bringer en vandig opløsning af en mikrobiel lipase i kontakt med en partikelformet adsorbende harpiks af phenol-formaldehyd-typen under overholdelse af særlige værdier for pH og kontakttid, hvorefter præparatet isoleres og tørres. Præparatet kan anvendes til kontinuerlig omesterificering af fedtstoffer uden anvendelse af opløsningsmidler eller andre dyre hjælpestoffer, samt til hydrolyse og syntese af fedtstoffer.

DK 153762 B

Immobiliserede lipasepræparater, som er egnede til omestring af fedtstoffer, er kendt. Således beskrives i US patentskrift nr. 4.275.081 immobiliserede lipasepræparater, hvor lipasen fremstilles ved gæring af arter hørende til slægterne 5 Rhizopus, Geotrichum eller Aspergillus, og hvor lipasen er fikseret på en indifferent, partikelformet bærer, som kan være diatomjord eller alumina. Disse bærere udviser et meget højt specifikt overfladeareal. Man har antaget, at det var nødvendigt at anvende et immobiliseret lipasepræparat med meget højt specifikt 10 overfladeareal (d.v.s. små og porøse bærerpartikler) for at opnå høj enzymatisk aktivitet.

Skønt man kan gennemføre omestring diskontinuerligt uden noget opløsningsmiddel med sådanne immobiliserede lipasepræparater, kan man ikke gennemføre kontinuerlig omestring i en 15 søjle og i industriel målestok uden tilstedeværelse af opløsningsmiddel (som må fjernes senere), fordi præparatet består af små partikler, som under søjledrift frembringer et uacceptabelt højt trykfald. Det er bemærkelsesværdigt, at alle eksempler i europæisk patentansøgning med publikationsnummeret 069599, hvori 20 en enzymatisk omlejring af fedtstoffer beskrives med lipase fra Aspergillus-arter, Rhizopus-arter, Mucor javanicus eller Mucor miehei, understøttet på en bærer, f.eks. Celite®, i forbindelse med kontinuerlig omestring i en søjle, gør brug af et opløsningsmiddel. Der foreligger et behov for en immobiliseret lipase, der 25 er velegnet til omestring ved søjledrift af opløsningsmiddelfrie fedtstoffer.

Man har på dette tekniske område naturligvis undersøgt immobilisering af talrige enzymer ved ionbinding, kovalent binding og indeslutning. I US patentskrift nr. 4.170.696 er 30 f.eks. bemærket, at den kontrollerede partikelstørrelsesfordeling og de fysiske egenskaber hos makroporøse ionbyttere frembyder fordele i forbindelse med anvendelsen som enzyrbærere. Der fremsættes dog en indvending mod den ringe mængde enzym, som kan bæres på en vægtenhed af ionbytterbæreren, og foreslås, at man 35 anvender et derivat af diethylaminoethyl (DEAE) af ionbytterne som enzyrbærere. Angivelser af den art, der er fremsat i US patentskrift nr. 4.170.696, og som omfatter, at en bestemt enzymimmobiliseringsteknik udviser bred anvendelighed hvad angår

mange forskellige enzymsystemer, kan kritiseres for at være misvisende. De forskelle, der foreligger mellem forskellige enzymer og forskellige substrater, gør praktisk talt hvert system omfattende enzym/substrat/reaktionsbetingelser til en undtagelse, 5 i forbindelse med hvilken en teknik, som påstås at kunne anvendes over et bredt område, kun kan anvendes med ringe resultat, hvis overhovedet.

Især er lipaser exceptionelle enzymer i den forstand, at deres enzymatiske aktivitet fungerer på mellemladen mellem to 10 væskefaser (vand og olie), idet alene dette forhold er en indikation for, at immobiliseringsteknikker, som er velegnet i forbindelse med andre enzymer, ikke kan forventes at kunne anvendes med et godt resultat i forbindelse med lipase, hvis de overhovedet kan anvendes. Det er kendt, at immobilisering af lipaser fremby- 15 der særlige vanskeligheder. Der kan f.eks. henvises til J. Lavayre et al., "Preparation and Properties of Immobilized Lipases", Biotechnology and Bioengineering, bind XXIV, side 1007 - 1013 (1982), John Wiley & Sons. Nogle forskere på området har specifikt undersøgt immobilisering af lipase ved adsorption eller 20 ionbinding, ved kovalent binding og ved indeslutning, og de har konkluderet, at adsorption (på Celite®) efterfulgt af indeslutning af Celite®-partiklerne frembragte langt de bedste resultater; der kan henvises til en publikation, der blev præsenteret ved Enz.Eng. 6, Kashikojima, Japan, 20 - 25. Sept. 25 1981 og den tilsvarende artikel i European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, nr. 14, side 1 - 5 (1982), samt en efterfølgende artikel i det samme tidsskrift, nemlig i nr. 17, side 107 - 112 (1983).

Det har nu overraskende ifølge opfindelsen vist sig, at 30 man på en meget simpel måde kan fremstille et immobiliseret lipasepræparat ved simpel blanding af en vandig opløsning af lipase og en partikelformet, makroporøs, adsorberende harpiks af phenol-formaldehyd-typen, hvorefter man udvinder harpiksen, som derpå tørres. Et specificeret vandindhold i det sluttelige, 35 immobiliserede præparat muliggør herefter den kontinuerlige omestring af fedtstoffer på en i økonomisk henseende attraktiv måde og uden noget opløsningsmiddel. Vaskning med vand af harpiksen efter fjernelse af opløsningen med restlipase er

fordelagtig. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden 5 ifølge opfindelsen anvendes en thermostabil, mikrobiel lipase, med fordel en lipase fra en thermophil Mucor-art, især Mucor miehei. Mucor miehei er en god producent af 1,3-specifik lipase, og man kan således opnå et billigt produkt.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden 10 ifølge opfindelsen har over 90% af partiklerne af den makroporøse, adsorberende harpiks af phenol-formaldehyd-typen en partikelstørrelse på mellem 400 og 800 μm . I dette partikelstørrelsesinterval opnås et godt kompromis mellem høj specifik aktivitet for omestring og lavt trykfald i søjlen.

15 Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen svarer forholdet mellem mængden af vandig opløsning af den mikrobielle lipase og vægten af den adsorberende harpiks til 5000 - 20.000 LU/g harpiks (tørvægt). I dette interval foreligger der tilstrækkelig lipase til harpikser, som 20 kan købes på markedet.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvor den mikrobielle lipase er afledet af en thermophil Mucor-art, især Mucor miehei, ligger pH under kontakten mellem den adsorberende harpiks og den vandige lipaseopløsning 25 mellem 5 og 7. Herved sikres en stærk binding mellem lipasen og den adsorberende harpiks.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er kontakttiden mellem 0,5 og 4 timer. I løbet af dette tidsinterval nærmer harpiksen sig mætning med lipase. 30 Mindst 75% af lipaseaktiviteten fjernes fra lipaseopløsningen.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres separationen ved filtrering, hvilket er en simpel metode, som let kan udføres industrielt.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden 35 ifølge opfindelsen tørres den separerede immobiliserede lipase til et vandindhold mellem 5 og 20% vand. Herved opnås et slutteligt lipasepræparat med en høj omestningsaktivitet.

Tørreoperationen kan udføres ved hjælp af vacuum, som tørring med fluidiseret masse eller i form af en hvilken som helst anden tørreproces, som er velegnet til stordrift, og som ikke udsætter den immobiliserede lipase for temperaturniveauer, 5 ved hvilke lipasen bliver inaktiveret.

Fra beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 4167/84 må en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat til omestring af fedtstoffer anses for kendt, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man bringer en 10 vandig opløsning af en mikrobiel lipase i kontakt med en partikelformet, makroporøs, svag anionbytter, der indeholder primære og/eller sekundære og/eller tertiære aminogrupeer, og hvis partikler for mere end 90% af partiklernes vedkommende har en partikelstørrelse på mellem 100 og 1000 μm , fortrinsvis 15 mellem ca. 200 og 400 μm , under betingelser, ved hvilke lipasen bindes til anionbytteren, i et tidsrum, der er tilstrækkeligt langt til at binde den ønskede lipasemængde til anionbytteren, hvorefter den således dannede immobiliserede lipase separeres fra den vandige fase og den separerede 20 immobiliserede lipase tørres til et vandindhold på mellem ca. 2 og 40%. Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse anvendes en adsorberende harpiks og ikke en svag anionbytterharpiks. Det her anvendte udtryk "adsorberende harpiks" er taget fra det tekniske område, der omfatter 25 ionbytterharpikser. Fabrikkerne af ionbytterharpikser har fundet, at de harpiksprodukter i partikelform, i hvilke de ved reaktion har indført de aktive grupper, der frembringer anion- eller kationbytteraktivitet, har kommerciel anvendelighed uden de aktive grupper. Sådanne harpiksformer tilbydes på markedet under 30 betegnelsen "adsorberende harpikser". De funktionelle egenskaber af adsorberende harpikser skyldes hovedsageligt andre bindingskræfter end ioniske bindingskræfter.

De adsorberende harpikser, som opfinderer er bekendt med, består enten af en polystyren-matrix eller en phenol- 35 formaldehyd-matrix. Kun adsorberende harpikser, som omfatter en phenol-formaldehyd-matrix kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge

opfindelsen, idet den klasse af adsorberende harpikser, som omfatter en polystyren-matrix, er mindre velegnet som bærer for lipase.

For ikke at inaktivere enzymet gennemføres kendte omeststringsreaktioner ved de relativt lave temperaturniveauer, som muliggøres ved tilstedeværelsen af et opløsningsmiddel, der er i stand til at opløse højtsmeltende fedtstoffer. De immobiliserede lipasepræparater, som fremstilles ved udøvelsen af opfindelsen, udviser tilstrækkelig stabilitet i smeltet fedt til at katalysere omestringen ved relativt høje temperaturer. Desuden er trykfaldet gennem en omestringssøjle, som er ladet med de immobiliserede lipasepræparater, som fremstilles ved udøvelsen af opfindelsen, tilstrækkeligt lavt til at muliggøre problemfri søjledrift af omeststringsreaktioner. Det har også overraskende vist sig, at den enestående kombination af kontaktbetingelser, adsorberende harpiks med en phenol-formaldehyd-matrix og kontrolleret slutteligt vandindhold i det immobiliserede lipasepræparat frembringer en høj specifik lipaseaktivitet i den smeltede fedtblanding.

De immobiliserede lipasepræparater, som fremstilles ved udøvelsen af opfindelsen, kan fremstilles med et højt enzymudbytte, og dette resultat er vigtigt med henblik på opnåelsen af en billig (kontinuerlig) omeststringsproces.

Mere end 75% af den lipaseaktivitet, som initialt er tilstede i lipaseopløsningen, kan og bør fjernes fra opløsningen af den adsorberende harpiks. I en vis udstrækning er lipaseoptagelsen af harpiksen tidsafhængig, sandsynligvis fordi der kræves et betydeligt tidsrum for at muliggøre, at enzymmolekylerne diffunderer gennem de makroporøse harpikspartikler. En blandede tid (reaktionstid) på 8 timer vil i det mindste approksimere ligevægtsmætningen af den adsorberende harpiks. Et mindre tidsrum, der kan være så kort som 0,5 timer, frembringer acceptable resultater. Et rimeligt mål for udvælgelse af en optimal kontakttid er fjernelse af lipaseaktivitet fra lipaseopløsningen. Den kontakttid, som kræves for at fjerne mere end 75% af lipaseaktiviteten fra lipaseopløsningen, er reaktionstiden i forbindelse med udøvelsen af opfindelsen i industriel målestok.

Det kan anføres, at de foreliggende eksperimentelle data viser, at den optimale kontakttid vil være næsten uafhængig af kontakttemperaturen inden for intervallet 5 - 35°C, og det tilstræbes, at opfindelsen udøves inden for dette temperatur-
5 interval.

De sluttelige, immobiliserede lipaseprodukter, som er fremstillet ved udøvelsen af opfindelsen, skal udvise en lipaseaktivitet på mindst 5000 LU/g, og et foretrukket interval ligger mellem 5000 og 50.000 LU/g (på tør basis). Man skal opnå
10 en aktivitet på mere end 10 BIU/g.

Det træk, der omfatter vandvaskning af de endnu våde harpikspartikler, der er separeret fra den efter kontaktperioden foreliggende lipaseopløsning, er særligt fordelagtig, når den foreliggende lipase omfatter en relativt rå lipase.

15 Kendte processer af den art, der er beskrevet i US patentskrift nr. 4 275 081, har krævet en rensset lipase for at tilvejebringe brugbare immobiliserede lipasepræparater. Det har overraskende vist sig, at de immobiliserede lipasepræparater, som fremstilles ifølge opfindelsen, kan fremstilles direkte fra et
20 temmeligt rå lipaseprodukt. Tilsyneladende bindes sådanne urenheder, som man i forbindelse med kendt teknik ønskede at fjerne fra lipasen, ikke til den adsorberende harpiks, og derpå fjernes de med den efter kontaktperioden foreliggende lipaseopløsning og/eller med vaskevandet.

25 Der opnås således i høj grad fordelagtige resultater ved hjælp af en fremgangsmåde, som kun kræver, at man blander partikelformet, adsorberende harpiks med en relativt rå lipaseopløsning med pH 5 - 7 ved stuetemperatur, hvorved man endog undgår anvendelsen af et organisk opløsningsmiddel (hvilket
30 undertiden har været foreslået), at man derpå kasserer den efter kontaktperioden foreliggende opløsning, og at man derpå om ønsket vandvasker harpiksen, hvorpå man tørrer harpiksen til et kontrolleret vandindhold. Det skal her gentages, at vandvaskning af det separerede, immobiliserede enzym før tørringen i betydeligt
35 omfang forbedrer produktet.

Det har vist sig, at lipasen i de immobiliserede lipasepræparater, som er fremstillet ifølge opfindelsen, ikke let inaktiveres eller fjernes fra præparaterne, når værdien af pH og/eller temperaturen er passende. Der foreligger f.eks. næsten 5 ikke nogen lipaseaktivitet i vaskevandet.

Det har været anført, at foretrukne udførelsesformer for opfindelsen er rettet mod immobilisering af thermostabile lipaser, især lipasen hidrørende fra *Mucor miehei*. Thermisk stabilitet af lipasen er naturligvis af afgørende betydning for omestring af højere smeltende fedtstoffer, når der ikke foreligger noget opløsningsmiddel. Der fremkommer også andre fordele, når man omestrer ved den højest mulige temperatur, f.eks. formindsket sandsynlighed af bakteriel kontaminering og lavere viskositet af fedtstoffet.

Forsøgsresultaterne vist nedenfor hidrørende fra immobilisering på tre typiske, kommercielt rekvirerbare materialer viser immobilisering på en svag anionbytter (ES 562), en adsorberende harpiks ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og en adsorberende harpiks med polystyren-matrix.

20

Tabel 1

Harpiks	Type	Matrix	Funktionel- le grup- per	Parti- kel- størr. (μm)	Total kapa- citet (ækv./l)	Immobiliseret lipase		
						Udbytte (%)	Ladning (IU/mg)	Aktivitet BIU/g
25 Duolite® ES562	Svag base	Phenol- formal- dehyd	Tert. amin	200 - 400	1,1	97	25	30
Duolite® S761	Næsten ikke- ionisk	Phenol- formal- dehyd	Pheno- lisk	400 - 800	-	76	20	20
30 Duolite® S861	Ikke- ionisk	Poly- styren	Ingen	500	-	52	15	4

Ved et lignende forsøg med en stærkt basisk anionbytterharpiks på polystyren-basis (Dowex® XY-40008-03) opnåede man et produkt med 12 BIU/g, men kun 50% udbytte.

35

Forsøg med anionbyttere og adsorberende harpikser med store porestørrelser resulterede i produkter med mindre specifik aktivitet end hvad der kunne forudsiges på basis af udbytteresultaterne. Det antages, at lipasen træder dybt ind i 5 porerne af anionbyttere og adsorberende harpikser med meget stor porestørrelse, hvorved den faktisk går tabt deri.

Specifik fysisk interaktion og anionbinding synes at være uafhængige kilder for harpiksens bindingskapacitet. De produkter, der er identificeret i den før angivne tabel 1, blev 10 ekstraheret med A: 1% Triton® X-100 og C: 1 M natriumacetat, pH 6. Forsøgsomstændighed A har tendens til at fjerne udelukkende ikkeionisk bundet lipase, og forsøgsomstændighed C har tendens til udelukkende at fjerne ionisk bundet lipase. Resultaterne er opstillet i den følgende tabel.

15

Tabel 2

Harpiks	Udbytte (%)	Ladning (LU/mg)	Aktivitet (BIU/g)	Ekstraktion (% i 1 h, 25°C)		
				Cyclus	A	C
Duolite® ES562				1.	0	24
svag base,	96	25	30	2.	0	8
20 phenol-formaldehyd						
Duolite® S761,				1.	39	0
phenolisk	76	20	20	2.	10	0
Duolite® S861,				1.	29	0
25 ikke-ionisk,	52	15	4	2.	7	0
polystyren						

I udpræget modsætning til de partielle ekstraktionsresultater, der er rapporteret i den før angivne tabel 2, blev lipase, der var adsorberet på Celite®, praktisk taget ekstraheret 30 100% med rent vand i løbet af få minutter.

Man kan opnå produkter med en akseptabel høj specifik aktivitet i et godt udbytte med makroporøse, adsorberende harpikser med en phenolformaldehyd-matrix ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Et lipaseprodukt, der kan tjene som eksempel 35 på den bedste udførelsesform, og som foreligger på en sådan adsorberende harpiks, udviste en halveringstid på over 3000 timer (den Duolite® S761 harpiks, hvortil der allerede har været henvist i de før angivne tabeller).

Temperaturintervallet for gennemførelsen af omestringene ved anvendelse af de ifølge opfindelsen fremstillede lipasepræparater er 25 - 85°C, fortrinsvis 50 - 80°C, især 55 - 75°C. Der skal nu henvises til den medfølgende tegning, der er en 5 grafisk afbildning af vigtige egenskaber ved en i det følgende eksemplificeret foretrukket udførelsesform for kontinuerlig omestring med immobiliseret lipase i en pakket masse (søjle), hvorved

Figuren viser logaritmen til strømningshastigheden i 10 g/time mod tiden i timer ved et forsøg gennemført ved 60°C.

Den lipaseaktivitetsenhed (LU), som er angivet i de følgende eksempler, som yderligere illustrerer opfindelsen, blev bestemt som beskrevet i publikationen AF 95.1/2-GB af 83-01-03, rekvirerbar fra NOVO INDUSTRI A/S, Novo Alle, 2880 Bagsværd, 15 Danmark.

Eksempel 1

Dette eksempel illustrerer immobilisering af lipase ifølge opfindelsen og karakterisering af det immobiliserede enzym.

20 Immobilisering

1 g Mucor miehei lipase med 124.000 LU/g blev opløst i 10 ml vand og blandet med 4,25 g Duolite® S761 harpiks (tørstof), hvis pH tidligere var blev indstillet på 6,0 i vandig suspension (85% af partiklerne 425 - 825 µm). pH blev derpå genindstillet på 25 6,0, og den flaske, hvori blandingen forelå, blev roteret i to timer ved stuetemperatur, i hvilket tidsrum pH blev genindstillet efter 1 times rotation.

Harpiksen blev filtreret, vasket to gange med 10 ml vand og derpå tørret i vacuum natten over ved stuetemperatur.

30 Det kombinerede filtrat omfattende 31 ml og med pH 6,3 indeholdt 700 LU/ml, hvilket svarer til ca. 17,5% af den initiale, totale enzymmængde.

Udbyttet af immobiliseret lipase var 4,91 g (94,3% tørstof). Den beregnede ladning var 22.000 LU/g tørstof.

Diskontinuerlig omestringsaktivitet

Denne analyse blev udført i overensstemmelse med den interne NOVO metode AF 206, som er beskrevet i det følgende. Aktiviteten var 20,3 BIU/g.

5 Forsøg i søjleForsøjle

30 g Duolite® A561, 86% tørstof hydratiseret med 21 g vand, pakkes i en 2,5 x 25 cm søjle med petrolether.

Lipasesøjle

10 3,5 g af den før beskrevne, immobiliserede lipase pakkes i en 1,5 x 25 cm søjle med petrolether.

Substrat

Der anvendes olivenolie (Sigma® O-1500)/decansyre (Merck) i et vægtforhold på 2,5 til 1, stabiliseret med 0,1% BHT.
15 Substratet omrøres i et reservoir ved 60°C og mættes med vand. Inkorporeringen af decansyre (D) i triolein (det hovedsagelige triglycerid i olivenolie) til DOO-triglycerid følges. Substratet pumpes nedad gennem søjlerne og fortrænger petroletheren.

Analyse

20 Strømningshastigheden indstilles for at opnå ca. 23% DOO i produktstrømmen, svarende til 65% konvertering af OOO + P til DOO + P. Der afvejes en 7 - 8 ml prøve, og strømmen beregnes i g/time.

For at analysere sammensætningen af triglycerider (TG)
25 opløses 7 dråber fra prøven i 4 ml heptan og indføres på en søjle med 12 g aktiveret Al_2O_3 i heptan. Elueringen foretages med 15 ml ether, som fordampes, og remanensen genopløses i 1,5 ml heptan. Med den HPLC-analyse, som udføres som beskrevet i det følgende i AF 206, forekommer der toppe af DOO og DOD ved henholdsvis 5,6 og
30 3,9 minutter.

Vandindholdet i produktstrømmen kontrolleres ved Karl Fischer titrering.

Søjledrift

Man udtog prøver med intervaller på 2 og 3 dage. Strømningshastighed i g substrat/time blev omregnet til g TG/h g enzym (F) som mål for aktiviteten. Man beregnede også produktiviteten i 5 g TG/g enzym (P). Temperaturen var gennemsnitligt 60,3°C med en standardafvigelse på 0,4°C.

Vandindholdet i produktet faldt fra 0,36% til 0,28% efter 400 timer. Forsøjlen blev derpå erstattet, og vandindholdet faldt fra 0,50 til 0,31% over de følgende 400 timer.

10 Man anvendte data med en konvertering på $23 \pm 1\%$ DOO til en semilogaritmisk afbildning af strømning mod tid. På basis af denne afbildning bedømmes den initiale aktivitet til at være $F_{\text{init}} = 1,94$ g TG/h g enzymproduktkatalysator med en halveringstid på 3100 timer ved 60°C. Figuren er afbildningen svarende til

15 dette forsøgsstudium.

Produktiviteten under antagelse af en forsøgstid på 2 halveringstider skulle være 6,5 tons TG/kg enzymproduktkatalysator.

Eksempel 2

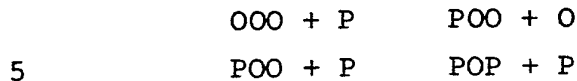
20 Dette eksempel illustrerer immobiliseringen af lipase ifølge opfindelsen på to phenoliske adsorberende harpikser af lignende art med eller uden høj ionstyrke under immobiliseringen:

Tabel 3

	Makroporøs phenolisk adsorberende harpiks	Partikelstørrelse 85% (μm)	Immobilisering			Med 2M natriumacetat		
			Uden salt Udbytte (%)	Ladning (LU/mg)	Aktivitet (BIU/g)	Udbytte (%)	Ladning (LU/mg)	Aktivitet (BIU/g)
25	Duolite®							
30	S761	400 - 800	77	21	20	82	21	15
	Duolite® ES762	200 - 400	63	17	6,0	95	25	17

Bestemmelse af den diskontinuerlige lipaseomestingsaktivitet (BIU) i henhold til NOVO metode AF 206

Princippet er inkorporering af fri palmitinsyre (P) i rent triolein (OOO), hvor den initiale hastighed beregnes for denne ligevægtsfraktion:



PPP dannes ikke, hvis lipasen (som f.eks. Mucor miehei lipase) er 1,3-specifik.

Værdien P_{inc} beregnes ved en given reaktionstid som mængden af palmitinsyre i 1- og 3-stillingerne af triglycerid:

$$10 \quad \% P_{inc} = \frac{\% \text{POO} + 2\% \text{POP}}{3}$$

Der anvendes en ækvimolær blanding af P og OOO, og P_{inc} vil følge en konverteringskurve fra 0 til ca. 21% ved ligevægt.

Denne kurve indpasses i en eksponentiel model, og den 15 initiale aktivitet beregnes som 1 μmol P inkorporeret i OOO per minut ved 40°C 1 BIU.

678 μmol OOO og 678 μmol P i 12 ml petrolether blandes med 250 mg immobiliseret lipase (tørstof), hydratiseret til 10% vand. Denne blanding rystes ved 40°C i 15 og/eller 30 minutter, 20 og den relative sammensætning af OOO, POO og POP måles ved hjælp af HPLC.

$$\text{BIU/g} = \frac{P_{inc,eq.} \cdot \ln(P_{inc,eq.}/(P_{inc,eq.} - P_{inc}))}{t \cdot w} \cdot M$$

25 $P_{inc,eq.}$ er ligevægtsværdien for P_{inc} (molfraktion) $\approx 0,222$

P_{inc} beregnes som beskrevet i molfraktion

M er den molære mængde af OOO og P $\approx 678 \mu\text{mol}$

t er tiden i minutter

w er tørvægten af katalysator (0,250 g)

30 Beregning af konvertering, aktivitet, halveringstid og produktivitet ved søjleforsøg

Konverteringsgrad: $x = \frac{A - A_0}{A_{eq} - A_0}$

A er % inkorporeret fedtsyre i triglycerid (f.eks. decansyre eller palmitinsyre i triolein).

5 Søjle eller strømningsaktivitet

$$F = F_0 \cdot \exp(-\ln 2 - t / t_{1/2}) \quad \text{g TG/h g kat.}$$

F_0 : initial aktivitet; $t_{1/2}$ = halveringstid

Enheder af g triglycerid/time g katalysator afledes af strømmingen af substrat i g/time, når man kender mængden af 10 triglycerid i substratet og mængden af katalysator i søjlen.

Produktivitet $P = \int_0^t F dt$

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat til omestring af fedtstoffer, **kendetegnet** ved, at man bringer kontakt mellem en vandig opløsning af mikrobiel lipase og en partikelformet, makroporøs, adsorberende harpiks af phenol-formaldehyd-typen, hvorved mere end 90% af harpikspartiklerne ligger mellem 100 og 1000 μm , ved et pH mellem 5 og 7 i et tidsrum, der er tilstrækkeligt til at fjerne mindst 75% af lipaseaktiviteten fra opløsningen, hvorefter det således dannede immobiliserede lipasepræparat separeres fra den vandige fase omfattende lipaseopløsning efter kontaktprocessen, hvorefter det separerede, immobiliserede lipasepræparat tørres til et vandindhold på mellem ca. 2 og 40%, idet det resulterende præparat har en værdi af BIU/g på mindst 10 (tør basis), og 15 mindst 5000 LU/g (tør basis).

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at det immobiliserede lipasepræparat vaskes med vand efter separation fra lipaseopløsningen efter kontaktprocessen.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, **kendetegnet** ved, at lipasen er en thermostabil Mucor-lipase.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, **kendetegnet** ved, at lipasen er Mucor miehei lipasen.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at over 90% af partiklerne af den makroporøse adsorberende harpiks har en partikelstørrelse mellem ca. 400 og ca. 800 μm .

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at den vandige opløsning af den mikrobielle lipase indeholder mellem 5000 og 20.000 LU/g tør, adsorberende harpiks.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at 5 kontakttiden ligger mellem 0,5 og 4 timer.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at tørringen gennemføres til et vandindhold mellem 5 og 20%.

Substratstrømning (g/time)

