



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146481 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 3112/79

(51) Int.Cl.³: C 12 N 11/00

(22) Indleveringsdag: 24 jul 1979

(41) Alm. tilgængelig: 15 feb 1980

(44) Fremlagt: 17 okt 1983

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 aug 1978 GB 7833295

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

(72) Opfinder: Sven *Branner-Jørgensen; DK.

(74) Fuldmægtig: -

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt

(57) Sammendrag:

3112-79

Immobiliseret enzymprodukt fremstilles ved, at man overtrækker et partikelformet materiale med høj massefylde, f.eks. sand med gelatine og derpå behandler det overtrukne materiale med høj massefylde med glutaraldehyd. Man fremstiller en pasta omfattende et enzymprodukt og en vandig opløsning af polyethylenimin, og blander det med gelatine overtrukne og med glutaraldehyd behandlede, partikelformede materiale med pastaen til dannelse af en pastaagtig blanding, som behandles med glutaraldehyd til dannelse af en masse, som granuleres og tørres.

Enzymproduktet er slidresistent og er velegnet til anvendelse i ekspanderede eller fluidiserede lejer.

LJK 146481 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt, der er velegnet til anvendelse i et ekspanderet eller fluidiseret leje.

Det er kendt, at man kan tilskrive anvendelsen af immobiliserede enzymer i et ekspanderet eller fluidiseret leje mange fordele i sammenligning med anvendelsen af immobiliserede enzymer i en fast masse. Sådanne fordele er anført i U.S.A. patent nr. 3.928.143. De vigtigste fordele ved driften i et fast leje er, at man totalt undgår forstop-
10 pelse i et ekspanderet eller fluidiseret leje, og at det er muligt at anvende substrater med partikelformede materialer i et ekspanderet eller fluidiseret leje.

På trods af disse fordele gennemføres næsten alle industrielle kontinuerlige processer, hvori man anvender
15 immobiliserede enzymer, i fast leje, blandt andet fordi partiklerne med den enzymatiske aktivitet i et ekspanderet eller fluidiseret leje slides ned under drift som resultat af kollisioner mellem de individuelle partikler.

Der foreligger således et behov for immobilisering
20 af enzymholdige partikler, der er velegnet til anvendelse i et ekspanderet eller fluidiseret leje, som har bedre slidresistens end de tidligere kendte, immobiliserede enzymholdige partikler, der er velegnet til anvendelse i et ekspanderet eller fluidiseret leje.

25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

Det har overraskende ifølge opfindelsen vist sig, at overtrækningen af det partikelformede materiale med høj massefylde med gelatine og behandlingen af det således over-
30 trukne, partikelformede materiale med høj massefylde med glutaraldehyd i kombination med anvendelsen af polyethylenimin og den senere behandling af den pastaagtige blanding med glutaraldehyd frembringer et immobiliseret enzymprodukt, hvori enzymerne binder yderst stærkt til det partikelformede
35 materiale med høj massefylde, og som udviser en exceptionelt høj slidresistens.

Man kender ganske vist fra U.S.A. patent nr. 3.796.634 en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt, hvor et enzym adsorberes på et partikkelformet materiale, såsom silica, overtrukket med en tværbundet polyamin, hvorpå enzymet tværbindes, fortrinsvis med glutaraldehyd, men ved denne kendte fremgangsmåde foreligger der en række begrænsninger, der ikke foreligger ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, jævnfør de følgende forskelle 1), 2) og 3). 1) I henhold til U.S.A. patentet krydsbindes det til bæreren adsorberede enzym ved indvirkning af et krydsbindingsreagens, fortrinsvis glutaraldehyd. Det er således en forudsætning for bevarelse af enzymets biologiske aktivitet, at krydsbindingsreagenset ikke inaktiverer enzymet. Glutaraldehyd vil i almindelighed inaktivere enzymer, hvor SH- eller NH₂-grupper er essentielle i det katalytisk aktive center. I henhold til opfindelsen blandes enzym og polyethylenimin til en pasta. Således kan selv enzymer, hvis aktivitet er meget følsom overfor glutaraldehyd, immobiliseres uden væsentligt tab af aktivitet, idet reaktionen i disse tilfælde fortrinsvis kan bringes til at foregå mellem glutaraldehyd og polyethylenimin. 2) U.S.A. patentet angår en adsorption af enzymet til en passende ladet partikeloverflade, og aktiviteten af det kendte immobiliserede enzym er derfor begrænset af bæreparklernes adsorptionskapacitet. Ifølge opfindelsen foreligger der ikke en sådan begrænsning, idet den overtrukne bæreparkel blandes med en pasta indeholdende enzymet og polyethylenimin, og herved kan man frit vælge mængdeforholdene mellem bærer og enzym. 3) Ifølge U.S.A. patentet er valget af krydsbindingsreagens afhængigt af det protein, der ønskes immobiliseret. Således må man vælge andre krydsbindingsreagenser end det foretrukne glutaraldehyd, hvis proteinet har en utilstrækkelig aminfunktionalitet. Ifølge opfindelsen kan glutaraldehyd anvendes som krydsbindingsreagens uanset hvilket protein, der ønskes immobiliseret, idet den nødvendige aminfunktionalitet opnås ved passende tilsætning af polyethylenimin til proteinet.

Man kender ganske vist også fra Developments in Industrial Microbiology, vol. 17 (4) 1976, side 241 - 246 en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt, men denne består udelukkende i fiksering af levende 5 mikroorganismer på en bærer, mens fremgangsmåden ifølge opfindelsen ikke kan anvendes til dette formål.

Ved udøvelsen af opfindelsen gennemfører man sædvanligvis overtrækningen med gelatine ved at udbløde gelatinen i vand, kassere overskud af vand, smelte gelatinen og 10 blande den således smeltede gelatine med det varme, partikelformede materiale med høj massefylde. Herved dannes der et pastaagtigt materiale. Dette pastaagtige materiale behandles med glutaraldehyd, hvorved gelatineovertrukket hærdes og de enkelte partikler falder fra hinanden. Pastaen 15 af enzym- og polyethyleniminopløsning dannes ved at blande enzymproduktet og polyethyleniminopløsningen. Når denne pasta blandes med det med gelatine overtrukne, med glutaraldehyd hærdede, partikelformede materiale med høj massefylde, dannes der en anden pasta, men efter behandling af denne 20 pasta med glutaraldehyd falder pastaen fra hinanden i enkelte granulære partikler, hvorved tilsyneladende hver granulær partikel fortrinsvis indeholder to eller flere partikler af materiale med høj massefylde. De individuelle partikler af materiale med høj massefylde synes at være sammenbundet ved 25 hjælp af polyethylenimin og glutaraldehyd. Det sluttelige immobiliserede produkt består således af en enhed, i hvilken styrken og slidresistensen hidrører fra de partikelformede partikler med høj massefylde, hvilke danner de ydre grænse- linier for den granulære partikel, og hvori enzymaktiviteten 30 hidrører fra den tværbundne masse af enzymholdigt materiale, som er beskyttet af det partikelformede materiale med høj massefylde, der fungerer som et skjold for den (mindre slidresistente) masse af enzymholdigt materiale.

Ved en foretrukken udførelsesform for opfindelsen 35 er det partikelformede materiale med høj massefylde sand. Herved tilvejebringes der et billigt, partikelformet materiale med høj massefylde.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen har det partikelformede materiale med høj massefylde en partikelstørrelse på mellem 0,1 og 1 mm. Dette partikelstørrelsesinterval er passende for de fleste ekspanderede eller fluidiserede lejer.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen har det partikelformede materiale med høj massefylde en massefylde over 4 g/cm^3 , og fortrinsvis er det partikelformede materiale med høj massefylde titandioxid. Ved at anvende partikelformede materialer med høj massefylde med en sådan massefylde kan den enzymatiske proces i det ekspanderede eller fluidiserede leje bedre kontrolleres, og man kan behandle væsker med højere massefylde uden vanskelighed. Det partikelformede materiale med høj massefylde bør udvælges på en sådan måde, at massefylden deraf er desto højere, jo højere massefylden er af den væske, der skal behandles i det ekspanderede eller fluidiserede leje. Man foretrækker titandioxid, fordi det er billigt og i høj grad indifferent.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen andrager vægten af gelatinen i det med gelatine overtrukne, partikelformede materiale med høj massefylde mellem 0,2 og 5 vægt-% af det partikelformede materiale med høj massefylde, fortrinsvis mellem 0,5 og 2% deraf. Denne gelatinemængde er optimal hvad angår opnåelsen af en stærk adhæsion af enzymet til partikler på det partikelformede materiale med høj massefylde.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen andrager vægten af det glutaraldehyd, hvormed det med gelatine overtrukne, partikelformede materiale med høj massefylde behandles, mellem 2 og 25 vægt-% af gelatinen, fortrinsvis mellem 10 og 20 vægt-% af gelatinen. Denne mængde af glutaraldehyd er optimal hvad angår opnåelsen af stærk adhæsion mellem enzymet og partiklerne af det partikelformede materiale med høj massefylde.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen er enzymet urease. Ved tilvejebringelse af et immobiliseret ureaseprodukt kan man dekomponere urinstofholdigt

spildevand, før det kloakeres, hvorved man på en simpel og billig måde kan opfylde de miljømæssige renhedskrav.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen er enzymet urease, der er fremstillet ad mikrobiel
5 vej ved hjælp af *Bacillus pasteurii*. Denne urease er velegnet til det formål, der er angivet i det foregående afsnit, fordi den har god temperaturstabilitet og god aktivitet ved de pH-værdier, som findes i det urinstofholdige spildevand.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen er enzymet lactase. Herved er det muligt kontinuerligt
10 delsen er enzymet lactase. Herved er det muligt kontinuerligt at konvertere lactosen i valle til glucose og galactose ved drift i ekspanderet eller fluidiseret leje.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen er enzymet inulinase. Herved er det muligt at kon-
15 vertere inulin til fructose på en simpel og billig måde.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen består enzymproduktet af tørre, enzymholdige, hele bakterieceller blandet med de ledsage- og fyldstoffer, der er normale bestanddele af industrielle enzymprodukter. Dette
20 er en meget billig metode, fordi det ikke er nødvendigt at behandle bakteriecellerne, der er isoleret fra enzymgæringsvæsken. Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen består enzymproduktet af tørre, enzymholdige bakterieceller, der er delvist eller totalt homogeniseret og
25 blandet med de ledsage- og fyldstoffer, der er normale bestanddele af industrielle enzymprodukter. Hvis det ønskes at homogenisere bakteriecellerne, kan denne metode hensigtsmæssigt anvendes, og dette medfører den fordel, at det ikke er nødvendigt at anvende det betydeligt dyrere, rensede
30 enzym.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen forstøvningstørres enzymproduktet. Det er simpelt og hensigtsmæssigt at anvende et tørt enzymprodukt, og et forstøvningstørret produkt er billigt og velegnet til frem-
35 gangsmåden ifølge opfindelsen.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen andrager vægten af polyethyleniminet mellem 2 og 50%

af enzymproduktet; fortrinsvis mellem 5 og 15% af enzymproduktet. Med mindre polyethylenimin end 2% af enzymproduktet dannes der ikke noget immobiliseret produkt med tilstrækkelig kohærens, og mere polyethylenimin end 50% af enzymproduktet vil ikke give anledning til dannelsen af nogen gavnlige effekt.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen har polyethylenimin en molekylvægt mellem 300 og 100.000. Disse polyethyleniminer er i stand til at danne et immobiliseret produkt med den bedste kohærens.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen andrager vægten af det glutaraldehyd, hvormed den pastaagtige blanding behandles, mellem 10 og 1000% af vægten af polyethylenimin, fortrinsvis mellem 50 og 200% af vægten af polyethylenimin. Med en mindre glutaraldehydmængde end 10% af vægten af polyethylenimin vil der ikke dannes noget immobiliseret produkt med tilstrækkelig slidstyrke, og mere glutaraldehyd end 1000% af vægten af polyethylenimin vil ikke have nogen gavnlige effekt.

Ved en anden foretrukken udførelsesform for opfindelsen gennemføres tørringen i fluidiseret leje. Denne tørringsmetode er billig, effektiv og fuldt ud tilfredsstillende.

Opfindelsen skal nu illustreres under henvisning til de følgende eksempler.

Eksempel 1

1,8 g gelatine blev udblødt i demineraliseret vand i 10 - 15 minutter, overskuddet af vand blev holdt fra, og gelatinen blev smeltet i et vandbad.

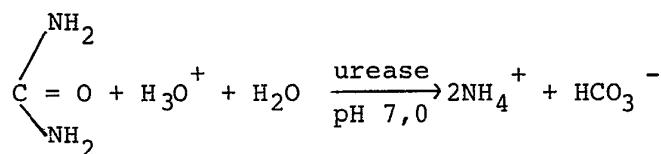
180 g strandsand blev opvarmet til 60°C på vandbad.

Derpå blev strandsandet holdt i gelatinen under omrøring for at danne en homogen pasta. Det med gelatine på denne måde behandlede sand blev delt i to dele og behandlet med henholdsvis 0,2 og 0,1% glutaraldehyd (20 og 10% i forhold til gelatinemængden).

Efter tilsætningen af glutaraldehyd omrørtes, indtil massen gelerede, og der dannedes et partikelformet materiale med partikler af ensartet størrelse. Geleringsstiden var ca. 1 minut.

5 2 g forstøvningstørret urease med en aktivitet på 6250 ureaseenheder/g og fremstillet ved hjælp af *Bacillus pasteurii* NCIB 8841 blev blandet med (1) 2 ml 5% PEI 600 (polyethylenimin med molekylvægt 40.000 - 60.000, købt fra Dow Chemical Co.), (2) 2 ml 10% PEI 600 og (3) 3 ml 10% PEI
10 600, alle ved pH 7; når der dannedes en pasta, tilsattes 10 g af det strandsand, der var behandlet som ovenfor angivet, blandeprocessen fortsattes, og immobiliseringsprocessen blev gennemført ved tilsætning af 1,25, 1,75 eller 2,25 ml 25% glutaraldehyd og ved at blande grundigt. Det dannede produkt
15 blev sammenpresset forsigtigt, hvorved det faldt fra hinanden som et granulat.

Ureaseaktiviteten (både for opløselige og immobiliserede præparater) måles på følgende måde. Analysen gennemføres i en pH-stat ved pH 7,0 og 30°C med 3% (0,5 M)
20 urinstof i 0,2 M fosfat som substrat. Reaktionen kan repræsenteres ved reaktionsskemaet



1 urease-aktivitetsenhed spalter pr. definition 1 μmol urinstof pr. minut under de ovenfor angivne reaktions-
25 betingelser.

Den følgende tabel viser immobiliseringsbetingelserne og aktivitetsparametrene af de dannede produkter.

Den fysiske styrke af alle immobiliserede produkter blev bedømt som god, da man ikke kunne iagttage nogen

fysisk nedbrydning efter 60 timer på et rystebord. En grovere manuel behandling af produktet viste, at produkterne nr. 3 og 5 var lidt svagere end de andre produkter. Produkt nr. 6 er noget stærkere end de øvrige.

Tabel

	Sand		Glu- taral- dehyd %	Sprøj- te- tør- ret urea- se, g	Immobilisering		Udbytte af tørt produkt, g	Aktivitet, batch, pH 7			
	An- vendt mængde g	Gela- tine %			10% PEI 600, ml	25% glu- tar- alde- hyd, ml		300 - 700 μ enhe- der/g	700 - 1000 μ enhe- der/g	akti- vite- ts- udbytte, %	
1	10	1	0,1	2	2	1,75	11,5	287	26	336	31
2	10	1	0,2	2	2	1,75	11,5	276	25	326	30
3	10	1	0,1	2	1+1mlH O	1,75	10,9	96	8,4	209	18
4	10	1	0,1	2	3	1,75	12,1	280	27	376	36
5	10	1	0,2	2	2	1,25	11,5	315	29	361	33
6	10	1	0,2	2	2	2,25	11,7	169	16	243	23

Produkterne blev undersøgt som den aktive masse i et fluidiseret leje med en vandig opløsning indeholdende 1% urinstof som substrat. Urinstoffet blev nedbrudt på tilfredsstillende måde.

5 Eksempel 2

2 g lyophiliseret lactase med en aktivitet på 973 lactaseenheder/g og fremstillet ved hjælp af Bacillus sp:NRRL B-11, 299 blev blandet med 3 ml 10% PEI 15 T (polyethylenimin med molvægt 700, købt fra Taihei Sangyo Kaisha) ved pH 7,0. Da der var dannet en pasta, tilsattes 10 g gelatinebehandlet sand, fremstillet som beskrevet i eksempel 1. Blandeprocessen fortsattes, og immobiliseringen gennemførtes ved tilsætning af 1,75 ml 25% glutaraldehyd. Produktet blev sammenpresset forsigtigt, hvorved det faldt fra hinanden som et granulat. Efter tørring var aktiviteten 25,5 lactaseenheder/g, og aktivitetsudbyttet var 16,3%.

Lactaseaktiviteten blev målt på følgende måde. Analysen gennemføres i et rystevandbad ved 60°C og pH 6,5 med 10% lactose i mælkestødpude som substrat. Reaktionen afsluttes ved kogning i 10 minutter i tilfælde af, at man ønsker at bestemme aktiviteten af den opløselige lactase, og ved filtrering af enzympartiklerne i tilfælde af, at man ønsker at bestemme aktiviteten af den immobiliserede lactase. Den mængde glucose, der frigøres i supernatanten, bestemmes ved hjælp af glucoseoxidase-peroxidase-metoden (Tech. Bull. no. 510, Sigma Chemical Co.). 1 lactase-aktivitetseenhed frigør pr. definition 1 μmol glucose pr. minut under de ovenfor angivne reaktionsbetingelser.

Man kunne ikke konstatere nogen nedbrydning af partiklerne af immobiliseret lactase ved visuel inspektion efter kontinuerlig rystning i 20% lactoseopløsning i en uge.

Eksempel 3

2 g sprøjtetørret inulinase med en aktivitet på 105 inulinaseenheder/g og fremstillet ved hjælp af Kluyveromyces fragilis (NRRL Y 1156) blev blandet med 3 ml neutraliseret 10% polyethyleniminopløsning (PEI 15 T, Taihei Sangyo Kaisha). Da der dannedes en pasta, tilsattes 10 g gelatine- og glutaraldehydbehandlet sand, fremstillet som angivet i eksempel 1. Blandeprocessen blev fortsat, og immobiliseringsreaktionen blev gennemført ved tilsætning af 1,75 ml 10 25%-opløsning af glutaraldehyd og grundig blanding. Produktet blev forsigtigt sammenpresset, hvorved det faldt fra hinanden som et granulat, og lufttørredes.

Aktiviteten af produktet var 13,5 inulinaseenheder/g, svarende til et aktivitetsudbytte på 77%.

15 Aktiviteten af det opløselige enzym blev målt som μmol reducerende sukker dannet pr. minut ved pH 4,7 og 50°C med en 2,5% opløsning af inulin som substrat.

20 Aktiviteten af det immobiliserede enzym blev målt som μmol reducerende sukker dannet pr. minut ved pH 4,7 og 50°C på basis af 5%-opløsning af inulin ved reaktion i et rystebad.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzymprodukt, k e n d e t e g n e t ved, at man overtrækker et partikelformet materiale med høj massefylde med gelatine, 5 at man derpå behandler det således overtrukne materiale med høj massefylde med glutaraldehyd, at man fremstiller en pasta omfattende et enzymprodukt og en vandig opløsning af polyethylenimin, at man blander det med gelatine overtrukne, glutaraldehydbehandlede, partikelformede materiale med pas- 10 taen til dannelse af en pastaagtig blanding, at man derpå behandler den således dannede, pastaagtige blanding med glutaraldehyd til dannelse af en masse, og at man granulerer og tørrer massen.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det partikelformede materiale med høj massefylde er sand. 15
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at det partikelformede materiale med høj massefylde har en massefylde på over 4 g/cm^3 .
- 20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at vægten af gelatinen i det med gelatine overtrukne, partikelformede materiale med høj massefylde andrager mellem 0,2 og 5 vægt-% af det partikelformede materiale med høj massefylde.
- 25 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 4, k e n d e t e g n e t ved, at vægten af det glutaraldehyd, hvormed det med gelatine overtrukne, partikelformede materiale med høj massefylde er behandlet, andrager mellem 2 og 25 vægt-% af gelatinen.
- 30 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 5, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er urease.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 6, k e n d e t e g n e t ved, at enzymproduktet består af enzymholdige bakterieceller, der er blandet med de ledsage- og fyldstoffer, 35 der er normale bestanddele af industrielle enzymprodukter.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 7, k e n d e t e g -
n e t v e d, at enzymproduktet består af enzymholdige bakte-
rieceller, der er delvist eller totalt homogeniserede, blandet
med de ledsage- og fyldstoffer, der er normale bestanddele af
5 industrielle enzymprodukter.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 8, k e n d e t e g -
n e t v e d, at vægten af polyethylenimin andrager mellem 2 og
50% af enzymproduktet.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 9, k e n d e t e g -
10 n e t v e d, at vægten af det glutaraldehyd, hvormed den pasta-
agtige blanding behandles, andrager mellem 10 og 1000% af
vægten af polyethylenimin.

Fremdragne publikationer:

US patent nr. 3796634
Developments in Industrial Microbiology, bind 17 (4), 1976,
side 241-246.