



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4459/81

(51) Int.Cl.5

C 12 N 9/12

(22) Indleveringsdag: 08 okt 1981

C 12 N 11/02

(41) Alm. tilgængelig: 10 apr 1982

//C 12 N 9/12,

C 12 R 1:07)

(44) Fremlagt: 04 jan 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 09 okt 1980 JP 141405/80 09 okt 1980 JP 141406/80

(71) Ansøger: *UNITIKA LTD.; No. 50, Higashi Honmachi 1-chome; Amagasaki-shi; Hyogo, JP, RIKAGAKU *KENKYUSHO; No. 2-1, Hirose-cho; Wako-shi; Saitama, JP, KAZUTOMO *IMAHORI; 2-25-23, Kakinokisaka; Meguro-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Kazutomo *Imahori; JP, Kazuhiko *Nagata; JP, Hiroshi *Nakajima; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Varmeresistent adenylatkinase og fremgangsmåde til fremstilling heraf, samt stabilt, immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt og fremgangsmåde til fremstilling heraf

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: SER. BIOKIM., 203 (1-6), s 121-122 (1972).

(57) Sammendrag:

4459-81

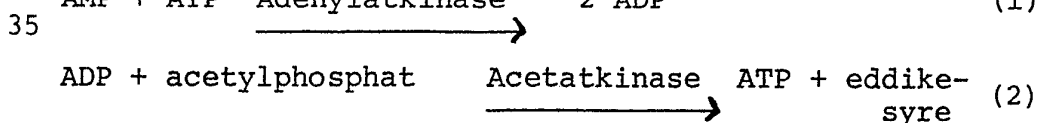
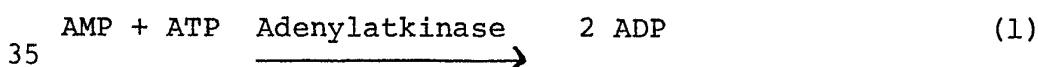
En varmeresistent adenylatkinase har en aktivitet efter inkubering i en bufferopløsning ved ca. 50°C i ca. 15 minutter på mindst ca. 80% af den oprindelige aktivitet forud for inkuberingen. Denne adenylatkinase kan opnås ved dyrkning af en bakterie tilhørende slægten Bacillus og opsamling af adenylatkinasen fra den fremkomne dyrkningsblanding. Dette varmeresistente enzym er meget stabilt imod varme og kan derfor, efter isolering, lagres i et langt tidsrum sammenlignet med sædvanlig adenylatkinase. Et stabilt, immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt opnås ved binding, navnlig covalent binding, adsorbering eller indeslutning af den varmeresistente adenylatkinase til eller i en vandopløselig bærer.

Opfindelsen angår en hidtil ukendt varmeresistent adenylatkinase og en fremgangsmåde til fremstilling heraf. Opfindelsen angår desuden et stabilt, immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt og en fremgangsmåde til fremstilling heraf.

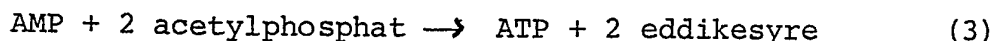
I den seneste tid er enzymer i udbredt grad blevet anvendt som industrielle katalysatorer på grund af deres substratspecificitet, reaktionsspecificitet og stereokemiske specificitet samt milde reaktionsbetingelser. Sådanne enzymatiske katalysatorer er imidlertid begrænset til hydrolaser, som ikke kræver nogen energikilde, såsom amylase, der hydrolyserer stivelse til saccharider, og L-aminosyreacylase, der omdanner N-acyl-L-aminosyrer til L-aminosyrer.

Biosynteser in vivo udføres ved hjælp af syntetase, der hovedsageligt udnytter adenosin-5'-triphosphat (ATP) som energikilde, dvs. en kemisk energi, der frigøres, når ATP hydrolyseres til adenosin-5'-diphosphat (ADP) og orthophosphorsyre eller adenosin-5'-monophosphat (AMP) og pyrophosphorsyre. Med henblik på at udbrede den industrielle anvendelse af enzymer er det derfor blevet forsøgt at udvikle et nyt fremstillingssystem, i almindelighed kaldet en "bioreaktor", i hvilken de samme biosynteser som in vivo udføres in vitro, ved at man binder en sådan syntetase eller oxidoreduktase og tilsætter ATP og lignende. I bioreaktorsystemet kræves der en stor mængde ATP som energikilde, og det er endvidere nødvendigt at gendanne ATP'et fra ADP'et eller AMP'et.

Til gendannelsen af ATP fra ADP eller AMP kendes en fremgangsmåde, som udnytter et enzym, nemlig adenylatkinase, der katalyserer den følgende reaktion, som beskrevet i f.eks. Enzyme Engineering, vol. 2, side 209 og 217 (1974).



Fra (1) + (2) x 2 bliver den følgende ligning mulig.



Det vil sige, at selv om ATP omdannes til ADP eller AMP i bioreaktorsystemet, bliver gendannelsen af ATP mulig ved kombinationen (ligning (2) eller (3)) af disse enzymer.

Ved den praktiske udnyttelse af sådanne reaktioner kræves det, at disse enzymer er stabile og tilstrækkeligt holdbare til industrielle anvendelser. Den hidtil kendte adenylatkinase er imidlertid et meget ustabilt enzym, som opnås fra gær og fra dyremuskler. Som det eneste eksempel er det beskrevet i "Computer Abstract of English Translation from Doklady Akademii Nauk SSSR Ser Biokhim", Vol. 203 (1-6), 1204-6 (1972), at adenylatkinase opnået fra frømuskel fra frøen Rana ridibunda har fortrinlig varmeresistens. Der er imidlertid ikke hidtil blevet opnået adenylatkinase med god varmeresistens fra mikroorganismer, der er til rådighed til industriel anvendelse som følge af høj produktionseffektivitet. Acetatkinasen, som kan opnås fra Escherichia coli, er også meget ustabil, hvilket længe har været kendt.

Imidlertid er det for nylig blevet offentliggjort i japansk patentansøgning (OPI) nr. 25088/77 (den heri anvendte betegnelse "OPI" henviser til en "offentliggjort ikke-forundersøgt japansk patentansøgning"), at der kan opsamles varmeresistent acetatkinase fra en termofil Bacillus stearothermophilus. Det har således været ønsket at opnå adenylatkinase med høj stabilitet, såsom den der forefindes hos den i japansk patentansøgning (OPI) nr. 25088/77 beskrevne acetatkinase.

Ved den kommercielle syntetisering af forbindelser under anvendelse af disse enzymer er det i praksis meget vanskeligt at genvinde enzymet efter reaktionen til genanvendelse deraf og til at bevirke en kontinuerlig enzymatisk reaktion. Med henblik på at overvinde sådanne ulemper er der udført forskellige undersøgelser, og der

er blevet fremsat flere forslag. Et sådant forslag er at binde et enzym til en vandopløselig bærer ved en passende fremgangsmåde for at gøre enzymet vandopløseligt, således at det kan anvendes gentagne gange. F.eks. giver 5 "Immobilized Enzyme" af Oskar Zaborsky, CRC Press (1973) og "Koteika Koso" ("Immobilized Enzyme") af Ichiro Chibata, Kodansha (1975) eksempler på immobilisering af aminoacylase med ionbytterharpiks ved adsorption, immobilisering af dextranase med cellulose ved covalent binding og 10 immobilisering af aspartase med polyacrylamidgel ved indeslutning. En sådan immobilisering af enzymer er en typisk fremgangsmåde, som muliggør en gentagen og kontinuerlig anvendelse af enzymer.

Det er f.eks. blevet foreslået at foretage immobilisering til den kommercielle udnyttelse af acetatkinase (se "Hakko to Kogyo" ("Fermentation and Industry"), 15 vol. 35, nr. 1, side 3-10 (1977)). Det har imidlertid vist sig, at når et coliformt enzym immobiliseres med cyanobromid ifølge Whitesides et al., "Enzyme Engineering", vol. 2, side 217 (1974), redigeret af E. Kendall 20 et al., Plenum Press, er restaktiviteten (udtrykt som %) kun adskillige % i fraværelse af en stabilisator, langtidsstabiliteten er meget ringe, og det immobiliserede enzym er overhovedet ikke egnet til den kommercielle ud- 25 nyttelse deraf.

Blandt de faktorer, der hæmmer den kommercielle udnyttelse af enzymer, kan nævnes det forhold, at næsten alle enzymer er meget ustabile, samt problemet med vandopløselighed. Selv om der kendes eksempler, i hvilke immobiliseringen forøger stabiliteten af den katalytiske 30 funktion, kendes der også eksempler, i hvilke stabiliteten af den katalytiske funktion nedsættes. F.eks. konkluderede I. Chibata, som et resultat af sammenlignende undersøgelser af enzymstabiliteten før og efter immobiliseringen, at der ikke kunne findes nogen regelbundethed 35 mellem en immobiliseringsfremgangsmåde og stabiliteten af det immobiliserede enzym, og at det derfor er meget vanskeligt at forudsige, hvilken fremgangsmåde der kan for-

øge enzymstabiliteten (se I. Chibata, "Koteika Koso" ("Immobilized Enzyme"), side 107, Kodansha, Tokyo (1975)). Det vides også, at de egenskaber, som et enzym oprindeligt har før immobiliseringen, i visse tilfælde går tabt 5 ved immobiliseringen, og specificiteten ændres ved immobiliseringen (se "Hakko to Kogyo" ("Fermentation and Industry"), vol. 35, side 7 (1977)).

Et enzyms egenskaber hidrører fra dets komplicerede og højere ordens struktur. Enzymets højere ordens 10 struktur påvirkes naturligvis af immobiliseringen. Med henblik på at vide, om der kan opnås et stabilt immobiliseret enzym ved immobiliseringen, er det derfor nødvendigt at bestemme dette ved at prøve sig frem med hvert enzym.

15 Enzymets molekylære struktur varierer afhængigt af den type mikroorganisme, der danner enzymet, og endvidere ændres denne komplicerede molekylære struktur let afhængigt af de betingelser, under hvilke det enzymatiske protein anbringes. Det er derfor vanskeligt for fag- 20 manden at forudsige de egenskaber, såsom specificitet, katalytisk aktivitet og langtidsstabilitet, som enzymet har efter immobilisering ud fra de egenskaber, som enzymet har inden immobilisering. Når immobilisering udføres under anvendelse af et enzym af en anden art, har 25 det derfor ikke været muligt at anvende immobiliseringsfremgangsmåden og -betingelserne på enzymet af den anden art, selv om enzymet falder ind under den samme kategori. Med henblik på at opnå et immobiliseret enzym med en høj restaktivitet og langtidsstabilitet, har det derfor 30 været nødvendigt at udføre undersøgelser ved at prøve sig frem med hvert enzym. På denne baggrund har det længe været ønsket at udvikle en fremgangsmåde, der muliggør bestemmelsen af en passende immobiliseringsfremgangsmåde og passende immobiliseringsbetingelser uden at være 35 re afhængig af at skulle prøve sig frem.

I tilfælde af adenylatkinase har det desuden vist sig, at når det skal immobiliseres til den kommercielle udnyttelse deraf, må immobiliseringsfremgangsmåden og

immobiliseringsbetingelserne også bestemmes ved, at man prøver sig frem. Dette har hæmmet immobiliseringen af adenylatkinase og den kommercielle udnyttelse deraf alvorligt. Der er faktisk kun udført få undersøgelser af immobiliseringen af adenylatkinase. Som en af det begrænsede antal fremgangsmåder, der hidtil er blevet beskrevet, kendes der f.eks. en fremgangsmåde, ved hvilken man immobiliserer adenylatkinase fra svinemuskel i en polyacrylamidgel, der indeholder en N- hydroxysuccinimidogruppe deri (se "Methods in Enzymology", vol. 44, side 887 (1976), redigeret af K. Mosbach, Academic Press). Ifølge denne kendte fremgangsmåde kræves der en kompliceret og vanskelig procedure, således at enzymets aktivitet ikke forringes, dvs. at der i løbet af immobiliseringen sættes adenylatkinase til en ikke-oxiderende atmosfære i flere sekunder, indtil acrylamidet er størknet. Immobiliseringen af adenylatkinasen og anvendelsen deraf har været underkastet tydelige begrænsninger. Tillige mister adenylatkinase fra svinemuskel, som ikke kan immobiliseres på en bærer, sædvanligvis dets aktivitet ved immobiliseringsfremgangsmåden i en sådan grad, at det praktisk talt er umuligt at genvinde og genanvende. I overensstemmelse med disse sædvanlige fremgangsmåder har immobiliseringen af adenylatkinase og dannelsen af adenin-cofaktorer under udnyttelse af det immobiliserede adenylatkinase derfor ikke været praktisk mulig. Selv hvis adenylatkinase immobiliseres uden hensyn til sådanne operationelle og økonomiske ulemper, går aktiviteten i det væsentlige tabt, når immobiliseringen udføres ved stuetemperatur (20° til 30°C), og derfor må immobiliseringen udføres ved lav temperatur, f.eks. nær 0°C . I denne henseende har fremstillingen af et immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt været uigennemførlig set fra et operationelt og økonomisk synspunkt.

Et af opfindelsens formål er at tilvejebringe adenylatkinase, som er stabiliseret imod varme og bevarer dens aktivitet over et langt tidsrum, samt en fremgangsmåde til fremstilling heraf.

Et andet af opfindelsens formål er at overvinde de ovenfor beskrevne ulemper, som man møder ved immobiliseringen af adenylatkinase ved den sædvanlige fremgangsmåde, og at tilvejebringe en immobiliseringsfremgangsmåde, der har fortræffelige økonomiske og operationelle egenskaber, samt en hidtil ukendt immobiliseret adenylatkinase, som forbliver stabil over et langt tidsrum.

Som et resultat af omfattende undersøgelser til opnåelse af de ovennævnte formål har det vist sig, at adenylatkinase med de ovenfor beskrevne egenskaber findes i cellen af en mikroorganisme tilhørende slægten *Bacillus*, og endvidere at adenylatkinasen er et hidtil ukendt enzym, som let kan oprenses og har overraskende høj stabilitet sammenlignet med den adenylatkinase, der findes i gær og lignende.

Som et resultat af undersøgelser af immobiliseringen af en sådan varmeresistent adenylatkinase ved, at man prøver sig frem, har det endvidere overraskende vist sig, at uden hensyn til arten af den anvendte immobiliseringsfremgangsmåde har det immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt altid en katalytisk evne og bevarer denne stabil over et længere tidsrum i modsætning til den sædvanlige adenylatkinase. Som et resultat af yderligere undersøgelser har det i tilfælde af adenylatkinase vist sig, at hvis immobiliseringen udføres under anvendelse af et enzym, som tåler en bestemt varmeresistensprøve, bevarer den immobiliserede adenylatkinase stabilt dens aktivitet over et langt tidsrum.

Den varmeresistente adenylatkinase ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at dens aktivitet efter inkubering i en bufferopløsning ved ca. 50°C i ca. 15 minutter er mindst ca. 80% af den oprindelige aktivitet forud for inkuberingen, at den har en molekylvægt på ca. 22.000 (målt ved gelchromatografi), antager en optimal pH-værdi på ca. 7,5 ved 30°C og fungerer ved en temperatur på fra ca. 25°C til 65°C ved ca. pH 7,5, idet nævnte adenylatkinase er identisk med den adenylatkinase, der

fremkommer ved dyrkning af en stamme af *Bacillus stearothermophilus*.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af den omhandlede varmeresistente adenylatkinase 5 er ejendommelig ved, at man dyrker en bakterie tilhørende arten *Bacillus stearothermophilus* og derfra opsamler den varmeresistente adenylatkinase. En hensigtsmæssig udførelsesform for denne fremgangsmåde er angivet i krav 3.

Det stabile, immobiliserede adenylatkinase-kom- 10 binationsprodukt ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at det er fremstillet ved covalent binding af varmeresistent adenylatkinase ifølge opfindelsen til en vanduopløselig bærer. En hensigtsmæssig form for dette kombinationsprodukt er angivet i krav 5.

15 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det omhandlede stabile, immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt er ejendommelig ved, at man covalent binder en varmeresistent adenylatkinase ifølge opfindelsen til en vanduopløselig bærer. Hensigtsmæssige 20 udførelsesformer for denne fremgangsmåde er angivet i krav 7, 8 og 9.

Den omhandlede adenylatkinase er meget stabil over for varme og kan derfor efter isolering af enzymet lagres i et langt tidsrum, sammenlignet med de kendte adenylatkinaser. 25

Det ifølge opfindelsen fremstillede stabile, immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt kan bevare dets aktivitet over et langt tidsrum, og det er derfor muligt at tilvejebringe en fremgangsmåde til 30 omdannelsen af adenin-cofaktorer.

Derfor er det muligt at udføre det såkaldte bioreaktorsystem, således at in-vivo-biosyntesen udføres in vitro i kommerciel målestok.

Opfindelsen beskrives nærmere under henvisning 35 til tegningen, hvorpå

fig. 1 er en grafisk afbildning, der viser restaktiviteten af den omhandlede adenylatkinase (kurve A) og adenylatkinase opnået fra gær (kurve B) efter opvarm-

ning i 15 minutter til forskellige temperaturer, og

fig. 2 er en grafisk afbildning, der viser rest-aktiviteten af den omhandlede adenylatkinase (kurve C) og adenylatkinase opnået fra gær (kurve D) efter hen-
5 stand ved 30°C.

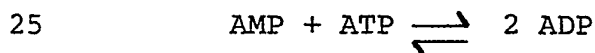
Når den behandles i ca. 15 minutter i en bufferopløsning, der holdes ved. ca. 50°C, bevarer den omhandlede adenylatkinase en restaktivitet, som er mindst ca. 80%, fortrinsvis mindst ca. 90%, og mest foretrukket
10 ca. 100%, af den oprindelige aktivitet. Navnlig er aktiviteten efter en behandling i ca. 15 minutter i en bufferopløsning, der holdes ved ca. 57°C, mindst ca. 80% af den oprindelige aktivitet. I det følgende betegnes alle disse egenskaber som "varmeresistente egenskaber".

15 Bufferopløsningens koncentration og pH-værdi er ikke kritisk. I almindelighed er koncentrationen imidlertid fra 5 mM (millimolær) til 500 mM, og pH-værdien er fra 7 til 10,5. Det er navnlig foretrukket at anvende en 50 mM phosphatbufferopløsning med en pH-værdi på
20 ca. 7,5.

Den omhandlede adenylatkinases foretrukne fysiske og kemiske egenskaber beskrives nedenfor:

(1) Enzymfunktion:

Den katalyserer den følgende reaktion:



(2) Substratspecificitet:

Michaelis-konstanterne (k_m værdier) til AMP, ATP og ADP er henholdsvis 0,017 mM, 0,04 mM og 0,05 mM.

30 (3) Optimal pH:

Ca. 7,5 (temperatur: 30°C)

(4) Stabilt pH-område:

Der sker næsten ingen inaktivering ved
behandling inden for et pH-område fra 7,0 til 10,5
35 ved 4°C i 24 timer.

(5) Optimalt temperaturområde:

Aktiviteten forøges ved en forøgelse i temperatur fra 25°C til 65°C ved pH 7,5. Reaktionen udføres typisk ved 30°C.

(6) Varmeresistens:

Den bevarer en aktivitet på 99% imod opvarmning ved 57°C i 15 minutter og forbliver stabil.

(7) Molekylvægt:

5 Ca. 22.000, som bestemt ved gelchromatografi under anvendelse af Sephadex® G-100.

(8) Bestemmelse af aktivitet:

Til en imidazol-saltsyrebuffersopløsning (75 mM; pH på 7,2) sættes 1,5 mM AMP, 1,2 mM ATP, 1 mM magnesiumsulfat, 135 mM kaliumchlorid, 0,4 mM phosphoenolpyruvdruesyre, 0,2 mM reduktions-type nicotinamidadenindinucleotid (NADH), 5 enheder (E)/ml pyrovatkinase og 10 enheder (E)/ml lactatdehydrogenase til fremstilling af en blandet opløsning. Der sættes en passende mængde (0,1
15 til 0,002 enheder pr. 1 ml af den blandede opløsning) adenylkinase til den blandede opløsning, hvorpå absorbansen af NADH ved 340 nm nedsættes med tiden. En enzymatisk aktivitet til nedsætning af absorbansen ved 340 nm i et forhold svarende til 2 micromol NADH pr. minut
20 betegnes som "én enhed".

(9) Ensartethed:

En oprenset prøve bevæger sig mod anoden ved acrylamidskiveelektroforese og giver et ensartet bånd. Selv ved natriumdodecylsulfat(SDS)gelelektroforese giver den
25 et ensartet bånd.

(10) Analyse:

Aminosyreindholdet er anført nedenfor (mol%).

Asparaginsyre 10,24%, threonin 3,65%, serin 1,87%, glutaminsyre 12,05%, prolin 6,06%, glycin 9,74%, alanin
30 7,64%, cystin (cystein) 0,80%, valin 7,37%, methionin 2,94%, isoleucin 10,55%, tyrosin 3,28%, phenylalanin 2,98%, lysin 5,86%, histidin 2,52%, arginin 7,17%, tryptophan 0,65%.

(11) Krystalstruktur:

35 Ikke bestemt, idet den endnu ikke er blevet krystalliseret.

Den omhandlede adenylatkinase kan fremstilles ved dyrkning af en mikroorganisme tilhørende arten Bacillus

stearothermophilus og ved opsamling af adenylatkinasen fra det resulterende dyrkningsprodukt.

Enhver bakterie tilhørende arten *Bacillus stearothermophilus*, som kan danne den omhandlede adenylatkinase, kan anvendes ved opfindelsen. Typiske eksempler på sådanne *stearothermophilus* omfatter ATCC nr. 7953, 7954, 8005, 10149, 12980, NCA 1503 og UK-788 (FERM-P 5141).

Eksempler på carbonkilder, som kan anvendes ved dyrkningen af sådanne bakterier, omfatter saccharider, såsom glucose, saccharose, fructose, hydrolyserede stivelsesprodukter, melasse og spildvæsker fra sulfitpulp; organiske syrer, såsom eddikesyre og mælkesyre; samt alkoholer, lipider, alifatiske syrer, glycerol og lignende, som kan assimileres af de anvendte bakterier. Eksempler på nitrogenkilder, som kan anvendes, omfatter organiske og uorganiske forbindelser, såsom ammoniumsulfat, ammoniumchlorid, ammoniumphosphat, ammoniak, aminosyrer, pepton, kødekstrakt og gærekstrakt. Tillige kan man som uorganiske salte anvende salte af kalium, natrium, phosphorsyre, zink, jern, magnesium, mangan, kobber, calcium, cobalt og lignende, og om nødvendigt kan man anvende små mængder metalsalte, majsstøbevand, vitaminer, nucleinsyrer og lignende. Sædvanligt næringsmedium kan anvendes til udførelse af den omhandlede fremgangsmåde.

Under anvendelse af det således fremstillede dyrkningsmedium dyrkes bakterien tilhørende arten *Bacillus stearothermophilus* almindeligvis ved fra 20°C til 80°C, fortrinsvis fra 40°C til 70°C, og mest foretrukket ved ca. 60°C, i fra ca. 2 til 6 timer under beluftede betingelser. Når den omhandlede fremgangsmåde udføres i kommerciel målestok, foretrækkes det at udføre dyrkningen kontinuerligt ved indstilling af fortyndingsforholdet (i det følgende simpelt hen betegnet som "D"), som defineret i det følgende, på 0,9 eller mere gange $\mu_{\max}$ for den ved fremgangsmåden anvendte bakterie. Når dyrkningen udføres kontinuerligt, medens D holdes på 0,9 eller mere gange $\mu_{\max}$ for den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendte bakterie, overskrider adenylatkinaseindholdet i de dannede celler den mak-

simale værdi af adenylatkinase pr. celleenhed, opnået ved en portionsvis fremgangsmåde. Endvidere forøges cellernes produktivitet. Især forøges cellernes adenylatkinaseindhold, når D holdes nær $\mu_{\max}$, til så meget som 1,3 gange det, der opnås ved en portionsvis fremgangsmåde. På den anden side er cellernes adenylatkinaseindhold, når der udføres kontinuerlig dyrkning, medens D holdes under 0,9 gange $\mu_{\max}$, mindre end det, der opnås ved en portionsvis fremgangsmåde.

- 10 Det omhandlede fortyndingsforhold, D, udtrykkes ved den følgende ligning:

$$D = \frac{F}{V} \quad (1)$$

hvor

D: fortyndingsforhold (1/time)

- 15 F: den hastighed, hvormed en fødevæske tilføres til en gæringstank, hvilket er den samme hastighed, hvormed et dyrkningsprodukt udtages fra gæringstanken (l/time)

V: væskemængde i gæringstanken (l).

- 20 Symbolet " $\mu_{\max}$ ", som benyttet heri, betegner en bakteries maksimale specifikke væksthastighed (1/time) under kontinuerlige dyrkningsbetingelser; dvs. en specifik propageringshastighed, som bestemt, når D forøges ved hjælp af en kemostat (se Herbert, Elsworth og Telling, "Journal of General Microbiology", vol. 14, nr. 8, side 601-622 (1956)), og cellekoncentrationen ikke kan holdes på et konstant niveau, dvs. det såkaldte "udvasknings-fænomen".

- Bestemmelsen af $\mu_{\max}$ under anvendelse af en stamme af *Bacillus stearothermophilus* udføres som følger:

- En 2 til 30 liters gæringstank påfyldes 1,5 til 20 liter af et næringsmedium, som derpå podes med bakterien, idet temperaturen holdes på 40 til 75°C, og fortrinsvis på 48 til 61°C, og pH-værdien på 4,5 til 9,0, 35 fortrinsvis på 6,0 til 8,0. Den således podede bakterie dyrkedes portionsvis. Når bakteriens vækst begynder, og mængden af carbonkilden i dyrkningsvæsken nedsættes til

0,01 vægt% eller mindre, påbegyndes den kontinuerlige dyrkning, ved hvilken carbonkilden alene er en væksthæmmende faktor, under anvendelse af et næringsmedium, der har den samme sammensætning som det, der fyldtes i gæringstanken. Ved at gå således frem kan man etablere en kemostat. Efter at den kontinuerlige dyrkning har nået en ligevægt, medens D forøges trinvis, er der en tidsforskkel mellem cellekoncentrationen i kulturen og restmængden af carbonkilden. D forøges yderligere gradvis.

10 Når D overskrider bakteriens specifikke propageringshastighed, begynder cellekoncentrationen, som har et stabilt niveau, at mindske, og koncentrationen af carbonkilden begynder omvendt at forøges. Den hastighed, ved hvilken den kontinuerlige dyrkning ikke kan holdes ved en ligevægt, hvis D forøges yderligere, kaldes udvaskning ("wash-out"). Denne specifikke propageringshastighed betegnes " $\mu_{\max}$ ".

Selv om man anvender den samme stamme, varierer værdien af $\mu_{\max}$ meget, afhængigt af typen af det anvendte næringsmedium og dyrkningsbetingelserne. Hvis imidlertid kombinationen er den samme, har $\mu_{\max}$ en vis konstant værdi. Hvis derfor $\mu_{\max}$ én gang er bestemt, er den pålidelig over et langt tidsrum.

Indstillingen af D kan opnås ved en fremgangsmåde, ved hvilken dyrkningen udføres ved den sædvanlige for-dyrkning og portionsvise dyrkning, indtil den ønskede cellekoncentration er nået, og derefter udføres den kontinuerlige dyrkning. Den kontinuerlige dyrkning kan påbegyndes til enhver tid i løbet af dyrkningsperioden. Det er imidlertid gunstigt, at den kontinuerlige dyrkning påbegyndes på et senere trin i den logaritmiske vækstfase under den portionsvise dyrkning og omgående fastlægges ved den forudbestemte værdi af D.

En udførelsesform af opfindelsen, ved hvilken der benyttes *Bacillus stearothermophilus* NCA 1503, beskrives i det følgende.

Under anvendelse af et næringsmedium med glucose som carbonkilde etableredes kemostaten i en 30 liters gæ-

ringstank (påfyldt 20 liter) ved den optimale temperatur (57°C) og pH-værdi (6,8), og $\mu_{\max}$ målttes og fandtes at være 1,1 (1/time). Således kan den kontinuerlige dyrkning ved $D = \mu_{\max}$ udføres ved en fremgangsmåde, ved hvilken man kontinuerligt fører nyt næringsmedium med den samme sammensætning, til en gæringstank, under anvendelse af en pumpe, i en mængde på 1,1 gange den påfyldte mængde pr. time, dvs. med en hastighed på 22 l/time ifølge ligningen (1), samtidig med at man fjerner dyrkningsblandingen med den samme hastighed.

Den omhandlede adenylatkinase isoleres fra dyrkningsblandingen. F.eks. kan adenylatkinasen isoleres fra ethvert produkt, såsom en dyrkningsblanding, isolerede celler, forarbejdede produkter af isolerede celler, råenzym, oprenset enzym og lignende, som dannes ved dyrknings- og oprensningstrinnene. Til oprensningen kan en sædvanlig enzymoprensnings-fremgangsmåde anvendes (se Alan Wiseman et al., "Handbook of Enzyme Biotechnology", Ellis Horwood Ltd., (1975)). F.eks. kan celler opsamles ved centrifugalseparation eller lignende fremgangsmåder og sønderdeles ved hjælp af en Manton Gaulin, en Dyno-mølle, en fransk presse eller en ultralydsbehandling. Derpå fjernes cellebrudstykkerne ved centrifugalseparation for således at opnå en celleekstrakt. Den således opnåede celleekstrakt underkastes streptomycinsulfat- eller protaminsulfatbehandling til udfældning af nucleinsyrer. Endvidere anvendes ammoniumsulfatfældning, acetonefældning, varmebehandling og lignende. Til oprensningen kan man anvende ionbytningsschromatografi under anvendelse af en DEAE-cellulosesøjle osv., absorptionschromatografi under anvendelse af en hydroxyapatitsøjle osv., gelfiltreringschromatografi, såsom Sephadex[®]-chromatografi, og lignende i kombination med hverandre. På denne måde kan den omhandlede adenylatkinase isoleres og oprenses.

Da den omhandlede adenylatkinase er meget stabil over for varme, kan den efter isoleringen oplagres i et langt tidsrum sammenlignet med de kendte adenylatkinaser.

Det omhandlede, hidtil ukendte, immobiliserede adenylation-kombinationsprodukt er fremstillet ved covalent binding af den ovenfor beskrevne adenylation til en vandopløselig bærer. Til covalent binding af adenylation til den vandopløselige bærer kan der anvendes den kendte covalent-bindingsfremgangsmåde eller ionbindingsfremgangsmåde som beskrevet i f.eks. I. Chibata, "Koteika Koso" ("Immobilized Enzyme"), Kodansha, Tokyo (1975). Tillige kan der anvendes en særlig covalent-bindingsfremgangsmåde, ved hvilken man anvender et 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsalt.

Eksempler på sådanne covalent-bindingsfremgangsmåder omfatter: en fremgangsmåde, ved hvilken man behandler en vandopløselig bærer, som f.eks. indeholder en carboxylgruppe, med et 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsalt, således at det kan omsættes med en aminogruppe, en hydroxylgruppe og en carboxylgruppe, og adenylation bindes derpå dertil; en fremgangsmåde, ved hvilken man omdanner en vandopløselig bærer, der indeholder en aromatisk aminogruppe, til et diazoniumsalt, og adenylation nasen diazo-kobles dertil; en fremgangsmåde, ved hvilken man omdanner en bærer, der indeholder en carboxylgruppe, til et derivat, såsom et azid, chlorid, carbodiimid eller isocyanat, og adenylation bindes dertil gennem en peptidbinding; en fremgangsmåde, ved hvilken adenylation bindes til en vandopløselig bærer, der indeholder en aktiv fraspaltelig gruppe, såsom halogen; en fremgangsmåde, ved hvilken man behandler en vandopløselig bærer, der indeholder en hydroxylgruppe, med cyanohalogenid, og adenylation bindes til en vandopløselig bærer ved anvendelse af et mindst to-funktionelt reagens, f.eks. et 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsalt, toluendiisocyanat, epichlorhydrin, glutaraldehyd og 2-amino-4,6-dichlor-S-tolylazin.

Denne immobilisering kan udføres ved en sædvanlig fremgangsmåde, ved hvilken man blander en vandig opløsning af den varmeresistente adenylation og en vandopløselig bærer eller dens precursor, om nødvendigt under

tilstedeværelse af en polymeriseringsinitiator. Ved opfindelsen er det imidlertid ikke nødvendigt at styre udførelsestemperaturen, således at udførelsen sker ved lave temperaturer, hvilket er nødvendigt ved den sædvanlige fremgangsmåde. Således kan den omhandlede immobilisering udføres ved normale temperaturer (f.eks. 20°C-30°C). Dette er en af opfindelsens hovedfordele.

Det omhandlede, stabile, immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt er fremstillet ved en covalent-bindingsfremgangsmåde, hvilket er særlig ønsket, da bindingskraften mellem adenylatkinasen og den vandopløselige bærer er stor, og aktiviteten derfor er meget vedvarende, f.eks. kan adenin-cofaktorer omdannes stabilt over et langt tidsrum. Især foretrækkes en covalent-bindingsfremgangsmåde, ved hvilken der anvendes et reagens, som indeholder en mindst to-funktionel gruppe, navnlig et 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsalt, da der kan anvendes milde immobiliseringsbetingelser, under hvilke der sjældent sker inaktivering af adenylatkinasen, og restaktiviteten er høj. Navnlig foretrækkes især en fremgangsmåde, ved hvilken man omsætter en vandopløselig bærer, som i forvejen indeholder en carboxylgruppe, med et 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsalt under tilstedeværelsen af et syrefjernende middel, og den varmeresistente adenylatkinase bindes covalent dertil.

Fremstillingen af et immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt under anvendelse af 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsaltet kan udføres som følger:

En vandopløselig bærer, indeholdende en carboxylgruppe og fra 1 til 1000, fortrinsvis fra 2 til 200, mest foretrukket fra 2 til 20 mol, pr. mol af carboxylgruppen af et syrefjernende middel, blandes med et vandfrit organisk opløsningsmiddel. Derpå omsættes 1-alkyl-2-halogenpyridiniumioner hermed i et forhold på 1,2 til 1200, fortrinsvis på 2,4 til 480 mol, og mest foretrukket på 2,4 til 24 mol, pr. mol af carboxylgruppen. Omsætningen kan udføres inden for et område fra normal temperatur til den temperatur, ved hvilken opløsningsmidlet koger. Efter opretholdelse af reaktionen i mere end 10 minutter,

og fortrinsvis mere end 1 time, vaskes reaktionsproduktet gentagne gange med et vandfjernende opløsningsmiddel, der kan opløse det syrefjernende middel. Således kan man opnå en vandopløselig bærer med en enzybindende evne.

Den således opnåede bærer blandes med en vandig opløsning af den varmeresistente adenylatkinase under betingelser, hvor temperaturen er fra 0°C til 50°C, fortrinsvis fra 0°C til 30°C, og mest foretrukket fra 0°C til 20°C, og ved en pH-værdi fra 6 til 10, fortrinsvis fra 7 til 9, og mest foretrukket fra 7 til 8, til fremstilling af et immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt. Den ovennævnte blandingsbehandling udføres i et tidsrum på 2 minutter eller mere, fortrinsvis fra 5 minutter til 10 timer, og mest foretrukket fra 10 minutter til 2 timer.

Alternativt kan et immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt, under anvendelse af 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsaltet, fremstilles ved en fremgangsmåde, ved hvilken man direkte blander en vandopløselig bærer indeholdende en carboxylgruppe, fra 1,2 til 240, fortrinsvis fra 2,4 til 120, og mest foretrukket fra 2,4 til 48 mol pr. mol af carboxylgruppen, af 1-alkyl-2-halogenpyridiniumioner, fra 2,4 til 480, fortrinsvis fra 4,8 til 240, og mest foretrukket fra 4,8 til 98 mol pr. mol af carboxylgruppen, af et syrefjernende middel, samt adenylatkinase med en blanding af vand og organisk opløsningsmiddel. Den heri anvendte mængde adenylatkinase er fra 10^6 til 10^{10} enheder, fortrinsvis 10^7 til 10^9 enheder, og mest foretrukket fra 10^7 til 10^8 enheder, pr. mol af carboxylgruppen på den vandopløselige bærer. pH-Værdien i blandingen af vand og organisk opløsningsmiddel er fra 6 til 9, fortrinsvis fra 6 til 8, og mest foretrukket fra 6,5 til 7,5. Temperaturen er almindeligvis fra 0°C til 50°C, fortrinsvis fra 0°C til 30°C, og mest foretrukket fra 0°C til 20°C. Behandlingstiden er fra 2 minutter til 5 timer, fortrinsvis fra 2 minutter til 2 timer, og mest foretrukket fra 5 minutter til 2 timer. Med hensyn til

forholdet mellem vand og organisk opløsningsmiddel til-sættes det organiske opløsningsmiddel i en mængde på fra 0,6 til 6 volumendele, og fortrinsvis fra 0,8 til 1,2

volumendele pr. volumendel vand.

- 5 Ved fremstillingen af et immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt kan forskellige 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsalte anvendes.

Eksempler på alkylgrupper, som kan anvendes, omfatter ligekædede alkylgrupper, såsom methyl, ethyl, n-
10 propyl, n-butyl og n-dodecyl; alkylgrupper, der indeholder sidekæder, såsom isopropyl, tert-butyl og neopentyl; 1-alkyl-gruppen i ovennævnte salt kan erstattes af cycliske alkylgrupper, såsom cyclopentyl og cyclohexyl, og aromatiske ringe, der indeholder de ovennævnte alkylgrupper, f.eks. phenyl
15 og naphthyl, og/eller umættede alkylgrupper, f.eks. vinylbutynyl og isobutynyl. Halogenatomet i 2-positionen i 1-alkyl-2-halogenpyridiniumsaltet kan være fluor, brom, chlor og iod.

Eksempler på modioner, der indgår i pyridiniumsaltet, omfatter halogenioner, nemlig fluor, brom, chlor og
20 iod, organiske anioner, såsom tosylat og prosylat, samt koordinations-type-anioner, såsom fluorsulfat og tetrafluorborat.

Eksempler på syrefjernende midler, som kan anvendes, omfatter baser, som ikke indeholder noget aktivt
25 hydrogen, f.eks. triethylamin, trimethylamin, methyldiethylamin, pyridin og lutidin, samt superbaser, f.eks. 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undecen og 1,5-diazabicyclo[4,3,0]-5-nonen.

Organiske opløsningsmidler, som kan anvendes,
30 omfatter carbonhydrider, såsom benzen, toluen, xylen og cyclohexan, alkoholer, såsom methanol, ethanol, amylalkohol, cyclohexanol, ethylenglycol, glycerol, ethylenglycolmonomethylether og diethylenglycol, ethere, såsom diethylether, diamylether, benzylether, dioxan, tetrahydrofuran og ethylenglycoldimethylether, ketoner, såsom
35 acetone, methylethylketon og cyclohexan, estere, såsom ethylacetat, propylpropionat, butylformiat og butylacetat, halogenerede carbonhydrider, såsom chloroform, methylenchlorid, carbontetrachlorid og triethylenbromid,

nitroforbindelser, såsom nitrobenzen og nitromethan, nitriler, såsom acetonitril og benzonitril, og amider, såsom diethylformamid, dimethylacetamid og N-methylpyrrolidon.

- 5 Den vanduopløselige bærer, som anvendt heri, betegner en forbindelse, som i al væsentlighed er uopløselig i vand. Eksempler på sådanne vanduopløselige bærere omfatter derivater af polysaccharider, såsom cellulose, dextran, agarose og stivelse; cellulosepolyacetat; visse
- 10 derivater af polyvinylalkohol (f.eks. tværbundne, vanduopløselige derivater); polymere fremstillet ud fra monomere, som indeholder umættede carbonatomer, såsom polystyren, polypropylen, polyethylen, polyvinylchlorid, polymethylmethacrylat, polybuten, polypenten, polyvinylidenchlorid, polyacrylsyre, polyaminostyren, polybutadien,
- 15 polyisopren, poly(maleinsyremonoester), tværbundet polyacrylamid, polyvinylamin, poly(dialkylaminoethylmethacrylat), poly(dialkylaminomethylstyren), poly(vinylpyridin), poly(vinylpyrrolidon), poly(acrylsyreanhydrid),
- 20 poly(methacrylsyreanhydrid), poly(maleinsyreanhydrid), polymethacrylonitril, poly(trifluorethylen), poly(tetrafluorethylen), poly(divinylbenzen), poly(α -methylstyren), poly(N-vinylamin), poly(tetramethylenglycoldivinylether), polyvinylsulfon, polyvinylsulfoxid, polyacrolein og poly
- 25 ly(methylvinylketon); polyethere, såsom polyphenylenoxid, polymethylenoxid, polyethylenoxid og polytetramethylenoxid; polypeptider, såsom polyalanin og polyphenylalanin; polyamider, såsom nylon-3, nylon-4, nylon-5, nylon-6, nylon-7, nylon-11, nylon-12, nylon-6,6, nylon-6,10, poly
- 30 (m-phenylenisophthalamid) og poly(p-phenylenterephthalamid); polyestere fremstillet ud fra polycarboxylsyrer, f.eks. terephthalsyre, isophthalsyre, adipinsyre, maleinsyre, fumarsyre og trimellitsyre samt polyoler, f.eks. ethylenglycol, propylenglycol, butylenglycol, pentaerythritol og bisphenol A; polyestere fremstillet ud fra glycerinsyre, mælkesyre og hydroxypivalinsyre; silicongummier, såsom dimethylpolysiloxan, methylphenylpolysiloxan, methylvinylpolysiloxan, cyanoalkylmethylpolysiloxan

og fluoralkylmethyldopolysiloxan; polyurethaner fremstillet ud fra polyisocyanater, f.eks. toluendiisocyanat, phenylendiisocyanat, ethylendiisocyanat, diphenylmethandiisocyanat og toluentriisocyanat, samt polyoler, f.eks. 5 polyethylenglycol, polypropylenglycol og polyestere indeholdende OH-ende-grupper; formaldehydharpikser, såsom en phenol-formaldehydharpiks, en xylen-formaldehydharpiks, en urinstof-formaldehydharpiks og en melamin-formaldehydharpiks; polyimider; polymere indeholdende 4-leddede 10 ringe, såsom polybenzimidazol og polythiazol; polycarbonater; polysulfoner; uorganiske derivater, såsom glas, asbest, ler, glimmer, hydroxylapatit, aktivt kul, silicagel og aluminiumoxid; samt syntetiske uorganiske polymere, såsom polyphosphergen.

15 Nogle af den omhandlede fremgangsmådes hovedfordele er opremset nedenfor:

(1) Man kan undgå den ulempe, at man skal bestemme en passende immobiliseringsfremgangsmåde for hver adenylatkinase ved at prøve sig frem, som det er nødvendigt 20 ved sædvanlige fremgangsmåder,

(2) Der kræves ingen komplicerede særlige fremgangsmåder til immobiliseringen.

(3) Adenylatkinase, som ikke er immobiliseret på en bærer, kan genvindes og anvendes til det næste immobiliseringsstrin. 25

Det ved den omhandlede fremgangsmåde fremstillede stabile, immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt kan anvendes i forskellige former, f.eks. i form af granulater, fibre, et hulmateriale, en film, en belagt 30 film eller lignende, dvs. i en omrøringstank, en påfyldningstank, en væsketank, en reaktor af rør- eller film-typen eller lignende til omdannelse af adenin-cofaktorer.

Da det ved den omhandlede fremgangsmåde fremstillede 35 lede stabile immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt bevarer dets aktivitet over et langt tidsrum, er det muligt at tilvejebringe en fremgangsmåde til omdannelse af adenin-cofaktorer under anvendelse af

en reaktor som beskrevet ovenfor. Det bliver således muligt at etablere det såkaldte bioreaktorsystem, således at de samme biosynteser som in vivo udføres in vitro i kommerciel målestok. Det omhandlede stabile immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt bidrager væsentligt til oprettelsen af et sådant system i kommerciel målestok.

Opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

10 Eksempel 1 og sammenligningseksempel 1

Der fremstilledes et dyrkningsmedium, der omfattede 0,5 g/dl (deciliter) polypepton, 0,5 g/dl gærekstrakt, 1,0 g/dl saccharose, 0,13 g/dl kaliumsulfat, 0,644 g/dl dinatriumphosphat, 0,027 g/dl magnesiumsulfat, 0,032 g/dl citronsyre, 0,0007 g/dl ferrosulfat og 0,015 g/dl mangan-sulfat, og pH-værdien indstilledes på 7,00. Derpå steriliseredes 250 liter af det således fremstillede dyrkningsmedium ved 115°C i 10 minutter og podedes med *Bacillus stearothermophilus* stamme NCA 1503. Dyrkningen udførtes under aerobe betingelser ved 60°C og ved et tryk på 0,5 kg/m²G i 3 timer.

Efter dyrkningen opsamledes cellerne straks ved hjælp af en centrifugalseparator af De-Laval-typen under afkøling med vand, og således opnåedes 700 g celler. De således opnåede celler oplagredes i frossen tilstand. 300 g af de frosne celler suspenderedes i en 0,1 M phosphatbufferopløsning (pH 7,5), hvis volumen var ca. 2 gange de frosne cellers volumen, og cellerne sønderdeltes fuldstændigt under anvendelse af en fransk presse. Efter fjernelse af cellerester ved centrifugalseparation opnåedes en rækstrakt, som indeholdt adenylatkinase.

En 1% 's protaminsulfatopløsning sættes til rækstrakten i en mængde på 300 ml pr. 600 ml af rækstrakten, og det blandedes derpå fuldstændigt. Efter tilstrækkelig omrøring fjernedes udfældninger ved centrifugalseparation, og der opnåedes en protaminsuperna-

tantvæske. Til den således opnåede supernatantvæske sættes gradvis fast ammoniumsulfat indtil 60% 's mætning (4°C). Dannede udfældninger opsamledes ved centrifugal-separation og opløstes igen i 20 ml af en 0,1 M phosphat-
5 bufferopløsning (pH 7,5) og dialyseredes og afsaltedes mod 4 liter af en 0,1 M phosphatbufferopløsning (pH 7,5).

Den ovenfor fremstillede råenzymopløsning passer-
redes gennem en DEAE-cellulosesøjle, som var blevet ek-
vilibreret med en 20 mM phosphatbufferopløsning (pH 7,5)
10 indeholdende 2 mM mercaptoethanol og 2 mM natriumethy-
lendiamintetraacetat og elueredes derfra med en buffer-
opløsning fremstillet ved tilsætning af kaliumchlorid
til den ovennævnte bufferopløsning. Når en kaliumchlo-
ridkoncentration på 0,14 M elueredes den ønskede adeny-
15 latkinase. Denne fraktion opsamledes, koncentreredes,
afsaltedes, passeredes gennem en hydroxyapatitsøjle, som
var blevet ekvilibreret med en 10 mM phosphatbufferop-
løsning (pH 7,5), og elueredes med en phosphatbufferop-
løsning med en lineær gradient fra 10 mM til 250 mM.
20 Når en koncentration på 120 mM elueredes den ønskede
adenylatkinase. Denne aktive fraktion koncentreredes,
afsaltedes og underkastedes Ultrogel ACA-34 chromatogra-
fi under anvendelse af en 50 mM Tris-saltsyrebufferop-
løsning indeholdende 0,1 M kaliumchlorid som eluerings-
25 middel. Den således eluerede aktive fraktion passeredes
gennem en DEAE-Sephadex[®] A-50 søjle, som var blevet ekvi-
libreret med en 30 mM phosphatbufferopløsning (pH 7,7)
indeholdende 2 mM mercaptoethanol og 2 mM natriumethylen-
diamintetraacetat og elueredes med en opløsning fremstil-
30 let ved tilsætning af kaliumchlorid til den ovennævnte
bufferopløsning. Som resultat elueredes der rensede ade-
nylatkinase nær en kaliumchloridkoncentration på 0,2 M.

Den således opnåede adenylatkinase bevægede sig
mod anoden under anvendelse af acrylamidskiveelektrofo-
35 rese og gav et enkelt bånd. Endvidere gav den en enkelt
top med en molekylvægt på ca. 22.000 ved Sephadex[®] G-100
chromatografi.

Udbyttet var ca. 6 mg og der opnåedes en aktivitet på

ca. 500 enheder pr. milligram af enzymet.

Derefter udførtes en sammenlignende undersøgelse med hensyn til stabilitet af den således opnåede adenylatkinase med adenylatkinase opnået fra gær (sammenligningseksempel 1).

Resultaterne er vist i fig. 1 og 2 på tegningen. Fig. 1 er en grafisk afbildning, der viser adenylatkinasens restaktivitet, når den opvarmes i en 50 mM phosphatbufferopløsning med en pH-værdi på 7,5 i 15 minutter ved forskellige temperaturer. I fig. 1 angiver kurverne A og B henholdsvis adenylatkinase fra eksempel 1 og sammenligningseksempel 1. Fig. 2 er en grafisk afbildning, der viser ændringen i adenylatkinasens restaktivitet med tiden, når den oplagres i en 50 mM phosphatbufferopløsning med en pH-værdi på 7,5 ved 30°C. I fig. 2 betegner kurverne C og D henholdsvis adenylatkinase fra eksempel 1 og sammenligningseksempel 1.

Som det tydeligt fremgår af disse resultater, mistede den fra gær opnåede adenylatkinase næsten fuldstændigt dens aktivitet irreversibelt, når den inkuberedes ved 50°C i 15 minutter, hvorimod den omhandlede adenylatkinase ikke mistede aktiviteten overhovedet ved inkubering ved 50°C. Ved en temperatur på 30°C mistede den fra gær opnåede adenylatkinase i al væsentlighed aktiviteten efter 10 til 20 dage, hvorimod der overhovedet ikke observeredes nogen nedsættelse af aktiviteten for den omhandlede adenylatkinase selv efter 50 dage.

Det kan således ses, at den omhandlede adenylatkinase er overraskende stabil over for varme og kan oplagres i et langt tidsrum. Der findes ingen mikrobielle adenylatkinaser med sådanne egenskaber.

Eksempel 2-5

Anvendt stamme:

Bacillus stearothermophilus NCA 1503.

Sammensætning af næringsmedium:

Fremstillet under anvendelse af glucose som carbonkilde og ved opløsning af de følgende bestanddele i 1000 ml ledningsvand: 1,3 g glucose, 1,0 g gærekstrakt

(fremstillet af Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,5 g pepton (fremstillet af Difco Co., Ltd.), 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ og 0,01 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

5 Første dyrkning

Næringsmediet med den ovennævnte sammensætning deltes i to portioner. En portion på 20 ml af næringsmediet fyldtes i en 100 ml Erlenmeyerkolbe, og en anden 100 ml portion af næringsmediet fyldtes i en 500 ml Erlenmeyerkolbe. Efter tilpropning af kolberne med vat dampsteriliseredes disse næringsmedier under tryk ved 121°C og 1 kg/cm^2 i 10 minutter. Efter afkøling podedes 100 ml Erlenmeyerkolben sterilt med ca. 5 ml frysetørrede celler opnået fra American Type Culture Collection (ATCC). Under anvendelse af en rotationsomryster (fremstillet af Takasaki Seisakusho Co., Ltd.) udførtes dyrkning under rotationsomrystning (160 o/m) ved 55°C i et døgn. Cellernes vækst iagttoges, og turbiditeten forøgedes. Absorbansen ved 660 nm (bestemt ved anvendelse af et Model 101 Spektrofotometer fremstillet af Hitachi Corp., herefter betegnet som "OD 660 nm") nåede op på fra 0,8 til 1,0. Således podedes 500 ml Erlenmeyerkolben med ca. 5 ml af udsædskulturen fra 100 ml Erlenmeyerkolben. Med den således podede 500 ml Erlenmeyerkolbe udførtes 25 dyrkning under rotationsomrystning under de samme betingelser som anvendt i tilfældet for 100 ml Erlenmeyerkolben i flere timer. Da OD 660 nm nåede op på ca. 1,0, blev dyrkningen med rotationsomrystning afbrudt, og den således fremstillede kultur anvendtes som udsædskultur til den følgende 30 hoveddyrkning.

Hoveddyrkning

20 liter af det ovenfor fremstillede næringsmedium fyldtes i en 30 liters gæringstank og steriliseredes ved 121°C og 1 kg/cm^2 i 15 minutter. Dyrkningsbetingelserne blev fastlagt til en temperatur på $55 \pm 1^\circ\text{C}$, en pH-værdi på 6,5 til 7,0 (indstillet med 4 N NaOH), en beluftningsmængde på 20 liter luft/minut (luft), med en

omrøringshastighed på 900 o/m. Derpå podedes gæringstanken med ca. 1 liter af udsædskulturen som fremstillet ovenfor, og portionsvis dyrkning påbegyndtes. Efterhånden som dyrkningen skred frem, dannedes der skum, og derfor
5 sattes en lille mængde skumdæpningsmiddel (KM-70 fremstillet af Shin-etsu Chemical Co., Ltd.) dertil. Efter ca. 2,5 timer fra dyrkningens påbegyndelse nåede OD 660 nm op på en værdi på 1,2 (0,56 g tørcellemasse/liter), og næsten al glucosen i dyrkningsmediet var opbrugt, og glu-
10 coseindholdet var formindsket til 0,01 vægt% eller mindre. Således påbegyndtes den kontinuerlige dyrkning straks. Den foreliggende stammes $\mu_{\max}$, som i forvejen var blevet bestemt, var 1,4 (l/time). Ved kontinuerlig tilførsel af det i forvejen steriliserede næringsmedium
15 med en hastighed på 28,0 l/time og udtagelse af dyrkningsblandingen fra gæringstanken med den samme hastighed som ovenfor, reguleredes $\mu_{\max}$ derfor til 1,00 (eksempel 2). Under anvendelse af fem gange så meget næringsmedium som væske i gæringstanken, udførtes kontinuerlig
20 dyrkning til opnåelse af celler.

Derpå ændredes D trinvis til 0,9 (eksempel 3; tilførsels- eller udtagelseshastighed: 25,2 l/time) og til 0,75 gange $\mu_{\max}$ (eksempel 4; tilførsels- eller udtagelseshastighed: 21,0 l/time), og der udførtes konti-
25 nuerlig dyrkning til opnåelse af celler.

Med de således opnåede celler målttes adenylatkinaseindholdet. Resultaterne er angivet i tabel 1. Tabel 1 angiver også det ved portionsvis dyrkning opnåede adenylatkinaseindhold (eksempel 5), som er adenylatkinase-
30 indholdet i de celler, der er opnået ved den portionsvise dyrkning forud for den kontinuerlige dyrkning.

Tabel 1

Eks- empel	Fortyn- dings- hastig- hed (D)	Adenylkinase- indhold (enheder/g tørrelle- masse)	Produktivitet af celler (g tør celle- masse/l/time)	Produktivitet af adenylatkinase (enheder/l/time)
5	$\mu_{\max}$			
2	1,0	590	0,65	384
3	0,9	430	0,59	254
4	0,75	390	0,54	211
10	5 (batch- vis)	410	0,23	94

Som det tydeligt fremgår af tabel 1, er adenylatkinaseindholdet i de celler, der er dannet under betingelser, hvor D er 0,9 eller mere gange $\mu_{\max}$, større end det, der opnås ved den portionsvise fremgangsmåde.

15

Eksempel 6

Et dyrkningsmedium, fremstillet ved opløsning af 1,3 g glucose, 1,0 g ammoniumsulfat, 0,5 g gærekstrakt, 0,5 g kaliumphosphat, 0,5 g dikaliumphosphat og 0,1 g magnesiumsulfat i 1 liter ledningsvand fyldtes i en 30 liters gæringstank i en mængde på 20 liter og dampsteriliseredes ved 121°C og et tryk på 1 kg/cm² i 15 minutter. Dyrkningsbetingelserne fastlagdes til en temperatur på 57°C, en pH-værdi på 6,5 til 7,0 (indstillet ved til-

25 sætning af 4 N NaOH), en beluftningsmængde på 20 liter luft/minut og en omrøringshastighed. Derefter podedes dyrkningsmediet med 1 liter udsædskultur, som var blevet fremstillet ved for-dyrkning af *Bacillus staerothermophilus* stamme ATCC 12980 i det samme dyrkningsmedium

30 som ovenfor, og hvis absorbans ved 660 nm nåede op på ca. 1,0. Til at begynde med udførtes der portionsvis dyrkning i ca. 2,5 timer. Når absorbansen ved 660 nm nåede op på 1,0, tilførtes der kontinuerligt det steriliserede næringsmedium med den samme sammensætning som

35 ovenfor til gæringstanken med en hastighed på 24,0 l/time under anvendelse af en kvantitativ pumpe, og dyrkningsblandingen blev udtaget fra gæringstanken med den samme hastighed som ovenfor. Således udførtes der kontinuerlig dyrkning under anvendelse af 100 liter af næ-

ringsmediet til opnåelse af en dyrkningsblanding. Den således opnåede dyrkningsblanding skiltes straks fra under anvendelse af en centrifugalseparator af De-Laval-typen under køling med vand til opnåelse af 400 g celler.

- 5 De således opnåede celler suspenderedes i 600 ml af en 0,1 M phosphatbufferopløsning og sønderdeltes under anvendelse af en Dyno-mølle. Efter fjernelse af uopløseligt materiale ved centrifugalseparation opnåedes en rækstrakt indeholdende adenylatkinase. Derpå sættes
- 10 200 ml af en 10%'s streptomycinsulfatopløsning til 400 ml af rækstrakten. Dannede udfældninger fjernedes ved centrifugalseparation til opnåelse af en streptomycin-supernatantvæske. Denne supernatantvæske underkastedes ammoniumsulfatfraktionering, og der opnåedes en fraktion
- 15 fra 30% (4°C) til 60%'s (4°C) mætning. Denne fraktion opløstes i en 50 mM Tris- saltsyrebufferopløsning (pH 8,0) og passeredes gennem en DEAE-Sephadex[®]-søjle, som var blevet ekvibreret med den samme bufferopløsning som ovenfor, og derefter elueredes den med en opløsning
- 20 fremstillet ved tilsætning af natriumchlorid til den ovennævnte bufferopløsning. Når en natriumchloridkoncentration på 0,2 M elueredes den ønskede adenylatkinase. Den således eluerede fraktion underkastedes hydroxyapatitchromatografi under de samme betingelser som i eksempel 1,
- 25 passeredes gennem en Sephadex[®] G-75 søjle og elueredes med en 30 mM Tris-saltsyrebufferopløsning (pH 8,0) indeholdende 0,1 M natriumchlorid til opnåelse af en adenylatkinaseprøve, som gav et enkelt bånd ved acrylamidskiveelektroforese, som i tilfældet i eksempel 1.
- 30 Som i eksempel 1 gav adenylatkinaseprøven endvidere en enkelt top med en molekylvægt på ca. 22.000, som bestemt ved Sephadex[®] G-100 chromatografi.

Udbyttet var ca. 10 mg, og aktiviteten var ca. 500 enheder pr. milligram af enzymet.

Eksempel 7 og sammenligningseksempel 2

5 g CNBr-aktiveret Sepharose[®] 4B (fremstillet af Pharmacia Co.) vaskedes og kvældedes til det tredobbelte volumen på et glasfilter med 1000 ml 1 mM saltsyre og 5 opslemmedes i en 50 mM fosfatbufferopløsning (pH 8,3, 100 ml). Den i eksempel 2 opnåede adenylatkinase opløstes i 1 ml af den ovennævnte bufferopløsning (5000 enheder) og omsattes i 30 minutter under langsom omrøring ved 40°C. Reaktionsblandingen filtreredes på et glas-
 10 filter. Det således opnåede immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt vaskedes tre gange med 200 ml portioner af en 50 mM Tris-saltsyrebufferopløsning (pH 8,0) indeholdende 0,5 M KCl. Filtrater opnået på alle trin samledes, og aktiviteten af filtratet og den immobilise-
 15 rede adenylatkinase målt.

Uafhængigt gentoges den samme prøve som ovenfor under anvendelse af adenylatkinase opnået fra svinemuskel (fremstillet af Boehringer Mannheim GmbH). Resultaterne er anført i tabel 2.

20

Tabel 2

Enzymkilde		Begyndel- sesakti- vitet	Immobiliseret aktivitet	Aktivitet genvun- det i filtrat
		(enheder)	(enheder)	(enheder)
25	Eksempel 7 Bacillus stearo- thermo- philus	5000	2000	2800
30	Sammen- lignings- eksempel 2 Svine- muskel	5000	50	200

Det således fremstillede immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt opslemmedes i en 500 mM fosfatbufferopløsning (pH 7,3) og henstod ved 30°C. Ændrin-
 35 gen i aktivitet med tiden fulgtes. Resultaterne er anført i tabel 3.

Det kan af tabel 3 ses, at kombinationsproduktet, som er fremstillet af den fra Bacillus stearothermophilus opnåede adenylatkinase, er overraskende stabilt. Den
 40 i filtratet genvundne adenylatkinase kan genanvendes.

Tabel 3

	Enzymkilde	Lige efter immobili- sering	Efter 1 måned	Efter 3 måned	Efter 6 måned
		(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)
5	Eksempel 7 Bacillus stearo- thermo- philus	2000	1900	2100	2000
10	Sammenlig- ningseksem- pel 2	50	0,2	0,05	--

Eksempel 8

500 enheder af den i eksempel 1 opnåede adenylat-
 15 kinase vaskedes og kvældedes (til tre gange det oprinde-
 lige volumen) på et glasfilter med 300 ml 1 mM saltsyre,
 og derpå sættes det til 20 g aktiveret CH-Sepharose[®] 4B
 (fremstillet af Pharmacia Co.), som var blevet opslemmet
 i 50 ml af en 50 mM boratbufferopløsning. Den resulterende
 20 blanding omsattes i 1 time under langsom omrøring
 ved 30°C. Reaktionsblandingen vaskedes på samme måde
 som i eksempel 7. Derpå målttes aktiviteten af det immo-
 biliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt og filtra-
 tet og fandtes at være henholdsvis 280 enheder og 210
 25 enheder.

Det immobiliserede adenylatkinase-kombinations-
 produkt opslemmedes i en 50 mM phosphatbufferopløsning
 (pH 7,3) og henstod ved 30°C. Ændringen i aktivitet med
 tiden målttes. Resultaterne er anført i tabel 4. Af tabel
 30 4 kan det ses, at det immobiliserede adenylatkinase-kom-
 binationsprodukt har fortræffelig stabilitet som i til-
 fældet i eksempel 7.

Tabel 4

Total aktivitet 35 lige efter immo- bilisering	Efter 1 måned	Efter 3 måneder	Efter 6 måneder	Efter 12 måneder
(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)
280	290	275	280	280

Eksempel 9

En 10%'s opløsning af tetrafluorborsyretetriethyl-oxoniumsalt i dichlormethan, holdt ved en temperatur på 30°C, cirkuleredes gennem en nylonslange med en indre diameter på 0,2 mm med en strømningshastighed på 0,1 ml/mm i 2 timer. Slangen vaskedes derpå, ved at man lod dichlormethan cirkulere med en strømningshastighed på 0,2 ml/mm i 5 minutter. Derpå cirkuleredes en 20%'s vandig hexamethyldiaminopløsning gennem slangen med en strømningshastighed på 0,1 ml/mm og en temperatur på 30°C i 1 time. Derpå vaskedes slangen med en 50 mM boratbufferopløsning (pH 8,3), og en 5%'s (w/v) dimethylsuberimidatopløsning, opløst i samme bufferopløsning som ovenfor, cirkuleredes gennem slangen med en strømningshastighed på 0,1 ml/mm og en temperatur på 30°C i 15 minutter. Efter vask af slangen med methanol i 5 minutter cirkuleredes en 50 mM boratbufferopløsning (pH 8,3), indeholdende 1000 enheder af den i eksempel 2 opnåede adenylatkinase, gennem slangen ved 30°C. Efter 2 timers cirkulering vaskedes slangen med den ovennævnte bufferopløsning. Den således genvundne aktivitet var 300 enheder, og den samlede aktivitet, som var immobiliseret på slangen, var 630 enheder.

Med det immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt fulgtes ændringen i aktivitet med tiden på samme måde som i eksempel 7. Resultaterne er anført i tabel 5. Af tabel 5 kan det ses, at adenylatkinasen har fortræffelig stabilitet.

Tabel 5

30 Total aktivitet lige efter immo- bilisering	Efter 1 måned	Efter 3 måneder	Efter 6 måneder
(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)
630	640	600	640

35

Eksempel 10

Til 5 ml af en 20 mM fosfatbufferopløsning (pH 7,5), indeholdende 0,29 g/ml acrylamid, 6 mg/ml N,N'-metylenbisacrylamid og 0,1 mg/ml riboflavin, sættes 10

enheder af en phosphatbufferopløsning (pH 7,5) af den i eksempel 6 opnåede adenylatkinase, og det blandedes fuldstændigt ved 0°C. Derpå sættes 50 µl af en 50 mg/ml kaliumsulfatopløsning dertil. Den resulterende blanding
 5 henstod i 2 timer under en 20 W fluorescenslampe. Den således opnåede gel, indeholdende immobiliseret adenylatkinase, pulveriseredes med en mølle og vaskedes derpå tre gange med 10 ml portioner af en 20 mM phosphatbufferopløsning. Som resultat var aktiviteten af den im-
 10 mobiliserede adenylatkinase 8,3 enheder, og aktiviteten af vaskevæsken var ca. 1,5 enheder.

Stabiliteten af det således fremstillede immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt målt på samme måde som i eksempel 8. Resultaterne er anført i tabel
 15 6. Af tabel 6 kan det ses, at det immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt har fortræffelig stabilitet.

Tabel 6

20	Lige efter immobilisering (enheder)	Efter 1 måned (enheder)	Efter 3 måneder (enheder)	Efter 6 måneder (enheder)
	8,3	8,5	8,0	8,3

Eksempel 11

20 g carboxymethylcellulose (0,5 mmol COOH) vaskedes tre gange med 1000 ml tetrahydrofuran, hvorfra
 25 vandet var blevet fjernet med molekylarsigter 4A, og det blandedes derpå med 1000 ml tetrahydrofuran. Derpå omsattes 10 mmol triethylamin og 12 mmol 1-methyl-2-chlorpyridiniumiodid hermed under omrøring. Reaktionsblandingen filtreredes derpå. Dannede krystaller vaskedes ti gange
 30 med 1000 ml vandfrit chloroform og ti gange med 1000 ml vandfrit tetrahydrofuran. Til det således fremstillede aktiverede carboxymethylcellulose sættes under omrøring 5000 enheder af den i eksempel 2 opnåede adenylatkinase, som var blevet opløst i en 50 mM boratbufferopløsning (pH
 35 8,0), og det omsattes ved 30°C i 1 time. Reaktionsblandingen adskiltes ved filtrering. Det således opnåede immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt vaskedes

med 1000 ml vand og 1000 ml af en boratbufferopløsning (pH 8,0). Kombinationsproduktet gennemvædedes i 100 ml af en 500 mM ethanolamin-saltsyrebufferopløsning (pH 8,0) i 4 timer og vaskedes derefter med 1000 ml af en 50 mM fosfatbufferopløsning (pH 7,3) tre gange. Ændringen med tiden af den immobiliserede aktivitet og af aktiviteten som bestemt ved den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåde målt, og resultaterne er anført i tabel 7.

Tabel 7

10	Lige efter <u>immobilisering</u>	Efter <u>1 måned</u>	Efter <u>6 måneder</u>	Efter <u>12 måneder</u>
	(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)
	3000	3000	2950	3100

Eksempel 12

15 30.000 enheder af den i eksempel 1 opnåede adeny-
latkinase og 10 g CH-Sepharose[®] (fremstillet af Pharmacia
Co.), som var blevet vasket og kvældet med 500 ml 1 mM
saltsyre og derpå med 1000 ml destilleret vand til det
tredobbelte volumen, opslemmedes i en blandet opløsning
20 af 250 ml af en 50 mM boratbufferopløsning og 250 ml ace-
tonitril. Derpå sættes 2,5 mmol tri-tert-butylamin og
1,2 mmol 1-chlor-2-ethylpyridiniumbromid dertil, og den re-
sulterende blanding omsættes ved 20°C i 30 minutter un-
der omrøring. Reaktionsblandingen passerendes gennem et
25 glasfilter. Det således opnåede immobiliserede adenylat-
kinase-kombinationsprodukt vaskedes med 1000 ml af en
500 mM ethanolamin-saltsyrebufferopløsning og derpå fem
gange med 500 ml portioner af en 50 mM Tris-saltsyrebuf-
feropløsning, indeholdende 0,5 M KCl (pH 8,0). Slutteligt
30 vaskedes kombinationsproduktet tre gange med 500 ml por-
tioner af en 50 mM fosfatbufferopløsning. Filtrater
fra alle trin samledes, og aktiviteten af filtratet og
af det immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt
målt. Den således fremstillede immobiliserede adenylat-
35 kinase opslemmedes i en 50 mM α -glycerophosphatbufferop-
løsning (pH 7,0) og henstod ved stuetemperatur. Efter 6
måneder målt aktiviteten. Resultaterne er anført i ta-

bel 8. Det kan ses, at det omhandlede adenylatkinase-kombinationsprodukt er overraskende stabilt. Den i filtratet genvundne adenylatkinase kan genanvendes.

Tabel 8

5	Begyndelses- aktivitet	Immobilise- ret aktivitet	Aktivitet genvundet i filtrat	Aktivitet af kombinations- produkt efter 6 måneder
	(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)
10	30.000	18.000	10.000	17,500

Eksempel 13

10.000 enheder af den i eksempel 6 opnåede adenylatkinase opløstes i 500 ml af en 5 mM phosphatbufferopløsning (pH 7,1) under omrøring i 1 time, og 1 g DEAE-
 15 Sephadex[®] A-25 (fremstillet af Pharmacia Co.) sættes dertil. Den resulterende blanding omrørtes ved stuetemperatur i 2 timer. Den således fremstillede opslemning hældtes på et sinterglasfilter og filtreredes. Det således opnåede uopløselige materiale vaskedes fem gange med 500
 20 ml portioner destilleret vand. Filtrater fra alle trin samledes, og aktiviteten af filtratet og af det immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt målt. Det således fremstillede immobiliserede adenylatkinase-kombinationsprodukt opslemmedes i en 50 mM phosphatbuffer-
 25 opløsning (pH 7,1) og henstod ved stuetemperatur. Efter 6 måneder og efter ét år målt aktiviteten. Resultaterne er anført i tabel 9. Af tabel 9 kan det ses, at det omhandlede adenylatkinase-kombinationsprodukt bevarer dets aktivitet stabilt selv efter ét år.

Tabel 9

30	Begyndelses- aktivitet	Immobiliseret aktivitet	Aktivitet genvundet i filtra- tet	Aktivitet af kombi- nations- produkt efter 6 måneder	Aktivitet af kombi- nations- produkt efter ét år
	(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)	(enheder)
35	10.000	7.000	2.800	6.500	6.300

Under anvendelse af den i filtratet genvundne

adenylatkinase (2800 enheder) anvendtes fremgangsmåden ifølge det foreliggende eksempel på 0,5 g frisk DEAE-Sephadex® A-25. Som resultat opnåedes et adenylatkinase-kombinationsprodukt, i hvilket der var immobiliseret 5 2000 enheder aktivitet, og det kunne genanvendes med stor effektivitet.

P A T E N T K R A V

1. Varmeresistent adenylatkinase, k e n d e -
 10 t e g n e t ved, at dens aktivitet efter en inkubering i en bufferopløsning ved ca 50°C i ca. 15 minutter er mindst ca. 80% af den oprindelige aktivitet forud for inkuberingen, at den har en molekylvægt på ca. 22.000 (målt ved gelchromatografi), antager en optimal pH-værdi
 15 på ca. 7,5 ved 30°C og fungerer ved en temperatur på fra ca. 25°C til 65°C ved ca. pH 7,5, idet nævnte adenylatkinase er identisk med den adenylatkinase, der fremkommer ved dyrkning af en stamme af *Bacillus stearothermophilus*.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af en varmeresistent adenylatkinase ifølge krav 1, k e n d e t e g -
 20 n e t ved, at man dyrker en bakterie tilhørende arten *Bacillus stearothermophilus* og derfra opsamler den varmeresistente adenylatkinase.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g -
 25 n e t ved, at dyrkningen foretages kontinuerligt under sådanne betingelser, at fortyndingshastigheden (D) tilfredsstiller det matematiske udtryk (a):

$$D \geq 0,9 \mu_{\max} \quad (a)$$

30

hvor D betegner et fortyndingsforhold, og $\mu_{\max}$ betegner det maksimale specifikke vækstforhold (1/time) for bakterien under kontinuerlige dyrkningsbetingelser.

4. Stabilt, immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt
 35 k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ved covalent binding af varmeresistent adenylatkinase ifølge krav 1 til en vanduoopløselig bærer.

5. Kombinationsprodukt ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at den varmeresistente adenylatkinase er en varmeresistent adenylatkinase dannet af *Bacillus stearothermophilus*.
- 5 6. Fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt, immobiliseret adenylatkinase-kombinationsprodukt ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at man covalent binder en varmeresistent adenylatkinase ifølge krav 1 til en vanduopløselig bærer.
- 10 7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den covalente binding udføres under anvendelse af et multifunktionelt reagens.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det multifunktionelle reagens er et 1-
15 alkyl-2-halogenpyridiniumsalt.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at man covalent binder en bærer, som er fremstillet ved omsætning af en vanduopløselig bærer, der indeholder en carboxylgruppe, med 1-alkyl-2-halogenpyri-
20 diniumsaltet under tilstedeværelse af et syrefjernende middel, til den varmeresistente adenylatkinase.

FIG. 1

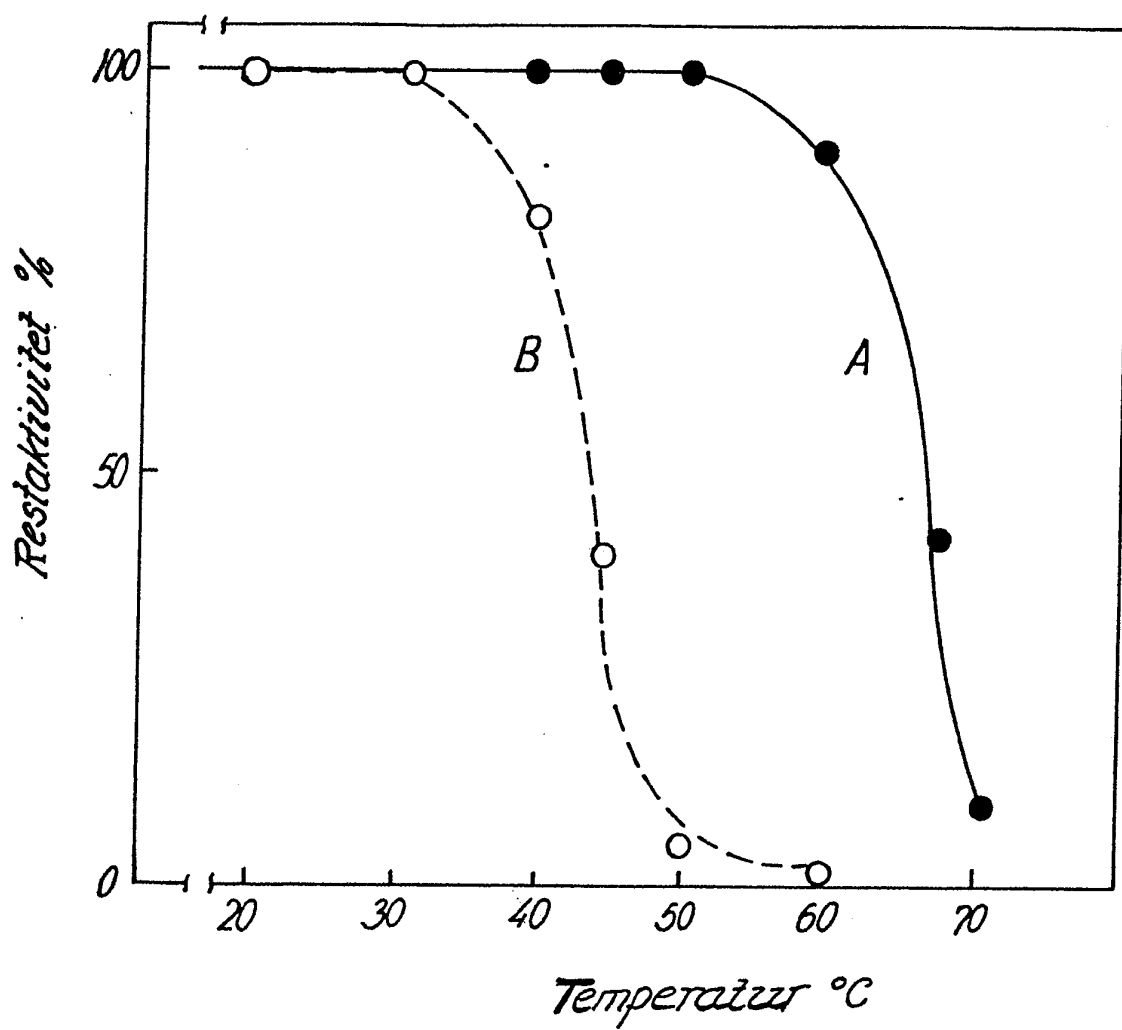


FIG. 2

