

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146446 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 3576/77

(51) Int.Cl.³: C 12 N 11/06

(22) Indleveringsdag: 11 aug 1977

(41) Alm. tilgængelig: 13 feb 1978

(44) Fremlagt: 10 okt 1983

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 12 aug 1976 DE 2636206

(71) Ansøger: C.H. *BOEHRINGER SOHN; 6507 Ingelheim am Rhein, DE.

(72) Opfinder: Winfried *Hartmeier; DE.

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Vanduopløseligt enzympræparat samt fremgangsmåde til dets fremstilling

Opfindelsen angår et vanduopløseligt enzympræparat på basis af til et bærerprotein ved hjælp af glutardialdehyd covalent fikseret enzym. Yderligere angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af et sådant vanduopløseligt enzympræparat.

I fag- og patentlitteraturen er der i de senere år blevet omtalt adskillige fremgangsmåder til fiksering af enzymer på vanduopløselige bærerstoffer. En sammenfattende oversigt giver f.eks. R.A. Messing (udgiver): Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Academic Press, New York, 1975. Fundamentalt kommer der, efter hvad der er kendt, nu fire bindingsmetoder i betragtning til at gøre et enzym uopløseligt: 1. Adsorption, 2. den ioniske binding, 3. indkapsling og 4. den kovalente binding til et bærerstof eller af enzymer til hin-

DK 146446 B

anden. Også kombinationer af disse immobiliseringsgrundtyper er velkendte:

Enzymer, der er bundet til en enzymfri bærer ved adsorption, som f.eks. aktivt kul eller polysaccharid, har især den ulempe, at det på grund af den forholdsvis svage adsorptive binding let kommer til desorption. Dersom der indtræder ændringer af ionkoncentrationen og temperaturen, kan der frem for alt let ske en løsning af adsorptionsbindingen og forekomme såkaldt "udblomstring" af enzymet.

Når det drejer sig om en ionisk binding af enzymet til et polyanionisk eller polykationisk bærerstof (som f.eks. ionbytterharpikser), forekommer der ligeledes ulemper i form af relativ svag binding mellem det polyioniske bærerstof og enzymet, da enzymet som regel kun frembyder svagt ioniske grupper. En fremherskende ulempe er også de ved mange reaktioner forstyrrende ionbyttervirkninger af de således fikserede enzymer, som i løbet af anvendelsen ved f.eks. behandling af drikkevarer fører til, at der utilsigtet fjernes visse ioner fra drikkevaren.

Enzymer, som er indesluttet (indkapslet) i polymere stoffer (f.eks. tværbundet polyacrylamid), har som hovedulempe den relativ dårlige diffusion gennem indkapslingsmaterialets molekyllars. Den tilsyneladende Michaelis-konstant af det således indesluttede enzym bliver herved også forøget allerede over for lavmolekylære substrater. Yderligere består den fare, at de indkapslede enzymer på grund af deres elasticitet kan trænge gennem indkapslingsmaterialets porer og således "udblomstre".

Ved den fjerde nævnte fikseringstype er enzymet bundet covalent og dermed meget fast til en reaktionsdygtig gruppe af et vandopløseligt bærerstof. Langt de fleste publikationer om enzymfiksering og ligeledes den foreliggende opfindelse drejer sig om denne form for immobilisering. En hel række af således fremstillede kendte præparater er dog allerede på grund af økonomisk-tekniske forhold ikke anvendelige, fordi der må anvendes for dyre koblingsreagenser eller bærersubstanser eller for kostbare fremstillingsmåder. Ved kobling efter de hidtil kendte fremgangsmåder må der nemlig som regel arbejdes med et betydeligt enzymoverskud, fordi den overvejende del af enzymet inaktiveres ved koblingsproceduren. De fleste fremgangsmåder muliggør også kun en ringe mængde enzym pr. bærerstof, fordi bærerstofferne kun kan besættes på deres overflader med enzymprotein. Dette kan ganske vist delvis afhjælpes ved en fin formaling (mikronisering) af de færdige produkter, men disse præparater

kan kun vanskeligt passeres af en væskestrøm på grund af deres finhed ved anvendelse i pakkede søjler (packed bed-reaktorer). En yderligere ulempe ved de fleste fremgangsmåder til enzymfiksering er, at bærerstofferne (f.eks. glas, diatoméjord) er bundet til visse forudgivne former, og det er ikke muligt at fremstille dem i kugle-, splint- eller membranform eller som overtræk over andre materialer (f.eks. sigter). Mange bærerstoffer og koblingsreagenser er også betænkelige på grund af deres toksisitet.

Nogle af de fremherskende ulemper ved kendte fikserede enzymer overvindes, hvor det drejer sig om ikke-proteolytiske enzymer, ved den hidtil kendte teknik ved, at man kobler disse enzymer, f.eks. ved hjælp af glutardialdehyd, til kollagen. De således fremstillede præparater er imidlertid mikrobielt meget lidt modstandsdygtige, og deres specifikke aktivitet er ringe. På samme måde forholder det sig med præparater, der er opnået ved tværbinding af enzymer med geldannende protein (sammenlign DT-OS 22 46 002). Herved opstår en homogen blanding, da enzymet og det geldannende protein tværbindnes tilfældigt med hinanden. Disse præparater er ganske vist mikrobielt stabilere, men deres virkning er dog mangelfuld, da enzymet ligger fordelt ensartet over hele det samlede partikeltværsnit. Til opnåelse af en høj aktivitet kan der kun foretages en forholdsvis svag tværbinding. Dette fører til så svage præparater, at det ved anvendelsen, f.eks. i en søjle, fører til tilstoppeelse og til udblomstring af enzymet. Dersom der foregår en stærkere tværbinding, sker der inaktivering på grund af stærkere binding og på grund af indeslutning af i det indre liggende enzymmolekyler. En betydelig ulempe ved den sidstnævnte fikseringsfremgangsmåde er også, at den ikke kan anvendes til proteolytiske enzymer.

Den foreliggende opfindelse har derfor til hensigt at tilvejebringe vandopløselige ikke-proteolytiske og proteolytiske enzymer, der samtidig i størst mulig grad indebærer følgende fordele:

- billig fremstillingsmetode,
- høj aktivitet både ved fikseringsproceduren, men også ved længere eller gentagne anvendelser,
- stor resistens over for mikroorganismer,
- stor formvariabilitet af bærer materialet,
- gode gennemstrømningssegenskaber ved anvendelse i pakket form,
- høj specifik aktivitet,
- lav tilsyneladende Michaelis-konstant,
- ingen uønskede ionbytter- eller adsorptionsegenskaber,
- acceptable, toksisk uskadelige bærerstoffer.

Det har vist sig, at alle de foranstående kriterier opfyldes af det vandopløselige enzympræparat ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved, at enzymet eller en enzymblanding er bundet til med formaldehyd hærde gelatine eller æggehvide, der har en vandoptagelsesevne på to til otte gange dens tørvægt.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det vandopløselige enzympræparat er ejendommelig ved, at med formaldehyd hærde gelatine eller æggehvide, som eventuelt har været underkastet en efterfølgende tørrende varmebehandling, og som udviser en vandoptagelsesevne på to til otte gange dens tørvægt, tilsættes en sådan mængde enzymholdig væske, at væsken opsuges fuldstændig af den hærde gelatine eller æggehvide under kvældning, og at der derefter tilsættes en opløsning af glutardialdehyd i en enzymfældende væske.

Herved fås præparater i hvilke enzymet "fastgøres" ensartet på bestemte steder på ydersiden og indersiden af det højmolekylæreporøse bærerprotein med forudgiven struktur.

De anvendte proteiner kan eventuelt modificeres sådan ved yderligere behandling (f.eks. denaturerende temperaturindvirkning), at de opnår en i det væsentlige uforandret vandoptagelsesevne mellem 0 og 100°C på to til otte gange deres tørvægt. Kvældningsegenskaberne af de ubehandlede udgangsproteiner kan derimod være forskellige. Tørret gelatine optager f.eks. i koldt vand kun 10% (= 1/10 af dets tørvægt) vand, medens flydende æggehvide er fuldstændig uopløselig i koldt vand. Det er dog muligt ud fra disse proteiner på simpel måde at fremstille et hærde protein med de ønskede egenskaber, idet man opløser udgangsproteinet i vand ved en passende temperatur, tværbinder med formalin og derefter underkaster det en tørrende varmebehandling. På denne måde er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ikke henvist til anvendelsen af relativt dyre, geldannende proteiner, men der kan anvendes også mindreværdige proteiner, f.eks. gelatine med lavt bloomtal eller også flydende affaldsgelatine helt uden gelleringsevne samt andre ikke-gelerende gelatine- eller æggehvideprodukter.

Fremgangsmåden til fremstilling af den hærde gelatine eller æggehvide, på hvilken enzymet skal fikseres, kan variere inden for vide grænser, afhængig af det anvendte udgangsprotein, den givne apparative indretning, den ønskede bærerstofform (f.eks. spåner, kugler, membraner, sier osv.). Eksemplerne angiver nogle almindelige muligheder, hvis ændringer i øvrigt ligger inden for fagmandens håndværksmæssige kunnen.

Ved anvendelse af formaldehyd som proteinhærdningsmiddel kan der på det hærdede protein bindes en større enzymaktivitet end f.eks. på et ved hjælp af glutardialdehyd hærdet protein. Yderligere har f.eks. et med glutardialdehyd tværbundet bærerstof en yderligere ofte uønsket garvestofadsorberende virkning, som formaldehydhærdet protein ikke har. Også af økonomiske grunde er formaldehydhærdning af proteinerne at foretrække.

Ifølge en særlig foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen opløses den vandopløselige gelatine eller æggehvide til fremstilling af bærerstoffet først i den tre- til ti-foldige vandmængde (udregnet på proteinmængden), hvorefter blandingen opvarmes til 40 til 80°C. Denne proteinopløsning tilsættes derefter en formaldehydopløsning (f.eks. formalin) i en sådan mængde, at man opnår ca. 2-5% formaldehyd i opløsningen udregnet på den anvendte proteintørstoffs substans. Den omrørte opløsning størkner efter nogen tid, idet størkningstiden sædvanligvis kan forkortes ved anvendelse af så høj temperatur som mulig, ved anvendelse af en pH-værdi, der er så nær som mulig 8-10, og ved anvendelse af stor formaldehydtilsætning. Sædvanligvis ønsker man dog ikke en alt for hurtig størkning, da en homogen gennemblanding af proteinformaldehyd-vandblanding ellers besværliggøres. Desuden frembyder en forlænget størkning en god mulighed for at bringe bærerstoffet på en ønsket særlig form. F.eks. kan det ved neddypning af genstande (rørere, sigter) anvendes som overtræk på disse genstande, eller det kan bringes i form af fine kuglepartikler ved sprøjtetørring.

For at påkoble enzymet, tilsættes de hærdede bærerstoffer i tør tilstand de vandige opløste enzymer i en sådan mængde, at den samlede enzymholdige væske opsuges under det vandopløselige bærerstofs kvældning. På denne måde befugtes de ydre og indre overflader af bærerstofferne med enzymopløsning. Dernæst tilsættes en almindelig enzymfældende væske, i hvilken glutardialdehyd er opløselig, sammen med det i denne opløste glutardialdehyd som koblingsreagens. Ifølge opfindelsen anvendes som enzymfældende væske fortrinsvis en lavere alifatisk alkohol og/eller en keton, f.eks. acetone, ethanol eller isopropanol. Efter at bindingen af enzymet har fundet sted, udvaskes præparatet grundigt fortrinsvis med vand, hvorefter det enten tørres på egnet måde (f.eks. med opløsningsmidler eller ved sprøjtetørring) eller opbevares i fugtig form, eventuelt under tilsætning af stabiliserende midler, fortrinsvis en stabiliserende polyalkohol, som f.eks. glycerin, sorbit eller propylengly-

col, eller overføres til videre forarbejdning.

Fortrinsvis opretholdes følgende betingelser ved påkoblingsprocessen af enzymet: den vandige enzymopløsning tilsættes indtil otte gange mængden af bærerstoffets tørvægt. Enzymfældende væske anvendes i en sådan mængde, at det enzym, hvis fiksering er ønsket, i det væsentlige ikke mere går i opløsning fra bærerstofferne. Afhængig af enzymet og afhængig af fældningsmidlet svinger disse mængder naturligvis meget stærkt, men de kan dog på enkel måde afprøves af fagmanden for hvert ønsket enzym. Glutardialdehyd tilsættes fortrinsvis i en sådan mængde, at koncentrationen i reaktionsblandingen ligger mellem 0,5 og 5%. Hele koblingsreaktionen gennemføres fortrinsvis ved stuetemperatur i løbet af fra 5 minutter til 5 timer.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan også proteolytisk aktive enzymer bindes i modsætning til de hidtil kendte fremgangsmåder. Ved hårdningen af bærerstoffet lykkes det nemlig at gøre proteinerne så resistente over for den proteolytiske nedbrydning af de proteaser, der skal bindes, at fikseringen kan foretages uden ødelæggelse af bærerstoffet. Til dette formål anvendes som bærerstoffortrinsvis med formaldehyd hårdet gelatine eller æggehvide med en vandoptagelsesevne på to til fire gange dens tørvægt. Bærerstoffer med fire til otte gange vandoptagelsesevne egner sig dog også til visse proteolytiske enzymer, f.eks. til et løbeenzym. Fastlæggelsen af de passende grænser i hvert enkelt tilfælde kan udføres af fagmanden. Eventuelt kan bærerstoffet yderligere også beskyttes mod proteolytisk angreb af proteaserne før tilsætningen af enzymfældende virkende substans ved f.eks. lave temperaturer. Efter glutaraldehydkoblingsreaktionen er der ikke mere fare for nedbrydning af bærerstoffet.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bærerfikserede enzymer egner sig i almindelighed til gennemførelse af de samme biotekniske reaktioner, som de tilsvarende opløselige enzymer er egnede til. Derudover er de også velegnede til gentagen eller kontinuerlig anvendelse samt ved tilfælde, hvor man ønsker at fjerne enzymet fra reaktionsblandingen, f.eks. fra drikkevarer, eller hvor det er foreskrevet ved lov. Til den gentagne og langtidsanvendelsen er den høje resistens af præparaterne over for mikroorganismerne særlig gunstig, samt deres evne til let at kunne desinficeres med almindelige desinfektionsmidler, f.eks. kvaternære ammoniumforbindelser, opløsningsmidler osv.

Følgende eksempler tjener til nærmere at belyse opfindelsen.

Den i eksemplerne 1, 7 og 8 anvendte handelstilgængelige glucose-oxidase-katalaseblanding, er det under navnet "Glucox R" forhandlede produkt, medens den i eksempel 3 anvendte glucoseoxidase er det under navnet "Glucox P" forhandlede produkt.

Eksempel 1

1 kg pulvergelatine (alkalisk oplukket, 80 Bloom) anbragtes i 6 liter koldt vand og opvarmedes til 60°C. Herved opløstes gelatinen. Derefter tilsattes 150 ml formalin (= 35 vægt-% formaldehydopløsning) under omrøring. Efter 2 minutter og 30 sekunder størknede massen til en gel. Den gelerede masse kørtes gennem en kødmaskine, således at man fik grove fugtige gelspånere. I ca. 5 cm højt lag tørredes gelspånerne på metalstativer i tørreskab i 15 timer med omrøring af luft ved 115°C. De således tørrede partikler formalede på en blæsemølle med siindsats, således at man opnåede en partikelstørrelse, der i overvejende grad lå mellem 50 og 100 µm. De spånformede partikler var vandopløselige og havde en vandoptagelsesevne fra 4,8 gange deres tørvægt.

I 0,5 kg af bærerstoffpulveret rørtes 1,5 liter af en opløsning, der indeholdt 0,1 liter handelstilgængeligt flydende glucose-oxidase-katalaseblanding og 1,4 liter destilleret vand. Den handelstilgængelige glucoseoxidase-katalaseblanding havde en glucoseoxidaseaktivitet på 1780 Sarrett-enheder/ml og en katalaseaktivitet på 880 Baker-enheder/ml. Herefter tilblandes blandingen 2 liter acetone og 200 ml 25%ig glutardialdehydopløsning. Reaktionsblandingen henstod herefter 60 minutter ved 30°C. Efter dette tidsforløb filtreredes, og de faste partikler vaskedes grundigt på et filter med ca. 50 liter destilleret vand. Den tilbageblevne fugtige filterkage havde en vægt på 1,95 kg. Under tilsætning af 1,05 kg glycerol opslæmmedes massen fint, hvorefter den opbevarede til videre anvendelse i køleskab.

Før afprøvning af aktiviteten samt før yderligere undersøgelser vaskedes glycerolopløsningen hver gang med vand. Tabel 1 angiver de vigtigste analysedata for præparatet.

Tabel 1

Enzym-tørstofindhold	[g/100 g]	17,6
Glucoseoxidaseaktivitet	[SU/g TS]	178
Katalaseaktivitet	[BU/g TS]	96

For at afprøve præparatets udvaskningsstabilitet vaskedes 10 g i en søjle kontinuerligt med destilleret vand. Med 1 dags mellemrum afprøvedes aktiviteten af enzympartiklerne. Det viste sig, at der ikke fandt noget signifikant aktivitetsfald sted i løbet af 14 dage. På samme måde forholdt det sig, når man anvendte øl i stedet for vand som udvaskningsvæske.

Michaeliskonstanten af det fikserede enzympræparat samt af den opløselige glucoseoxidase målt over for glucose. Der viste sig ikke nogen signifikant forskel mellem den opløste og den fikserede enzymform. Tegningen viser den relative reaktionshastighed af det opløselige og det immobiliserede enzym i afhængighed af glucosekoncentrationen.

Eksempel 2

3 g tørret æggehvide forhandlet under navnet "Hiklar" opløstes i 10 ml vand ved 40°C og tilsattes 0,3 ml formalin. Denne blanding tørredes i vakuumtørreskab ved 100°C og 10-20 Torr. Det tørrede kunststof formalede til en kornstørrelse på 100 til 200 µm og sigtedes. Det var vandopløseligt og havde en vandoptagelsesevne på 4 gange dets tørvægt.

0,1 g af en handelstilgængelig lactase fra *Aspergillus flavus*, der havde en lactaseaktivitet på 520 LU/g, opløstes i 1,5 ml destilleret vand. I denne enzymopløsning rørtes 0,5 g af det ovenfor beskrevne kunststofpulver. Herefter tilsattes under omrøring 3 ml acetone og 0,25 ml 25%ig glutardialdehydopløsning. Denne blanding henstod i 60 minutter ved 25°C, hvorefter den filtreredes. Det som filterrest tilbageblevne bundne enzym vaskedes godt med destilleret vand. Det havde en aktivitet på 42 LU/g tørsubstans. Den samlede tørsubstansmængde af det bundne enzympræparat androg 0,61 g.

Eksempel 3

1 kg pulvergelatine (surt oplukket, 80 Bloom) udrørtes i 5 liter koldt vand og opvarmedes til 45°C. Efter at gelatinen var opløst, tilsattes 100 ml formalin. Opløsningen holdtes ved 45°C, og spraytørredes i en laboratoriespraytørrer med tostoffdyse ved 210°C luft-

indgangstemperatur og 100°C luftudgangstemperatur og en luftmængde fra 500 Nm³/time. Man fik et vandopløseligt fint pulver med en vandoptagelsesevne på 7 gange dets vægt.

0,50 ml af en katalasefri glucoseoxidaseopløsning med en aktivitet på 750 Sarrett-enheder/ml tilsattes 1 ml destilleret vand. Derefter rørte man 0,5 g af det ovenfor beskrevne pulverformige kunststof i denne blanding. Blandingen rørtes med 2 ml acetone og 0,2 ml 25%'ig glutardialdehydopløsning, hvorefter den henstod 60 minutter ved stuetemperatur. Herefter udvaskedes præparatet på et filter grundigt med destilleret vand. Man fik i alt 0,59 g fikseret enzymtørstof, der havde en glucoseoxidaseaktivitet på 290 Sarrett-enheder pr. g tørstof.

Eksempel 4

20 g pulvergelatine (surt oplukket, 80 Bloom) opløstes i 100 ml destilleret vand under omrøring ved 60°C. Den opløste gelatine tilsattes 2 ml formalin. Herefter dyppedes en godt affedt vingeomrører med en overflade på 20 cm² i gelatine-formalin-blandingen og fjernedes straks. Overskydende gelatine-formalin-blanding lod man dryppe af, og røreren anbragtes herefter i 5 timer i et tørreskab ved 105°C til tørring og tværbinding af formalin-gelatine-blandingen. Herefter lod man den nu med et tyndt kunststoflag overtrukne omrører afkøle, og dyppede den i en opløsning af 20 g løbe "original kalvelab" (Hauser) i 100 ml vand i 1 minut. Derefter lod man den nu med løbeenzym tværbundne omrører stå i en opløsning af 70 ml acetone, 30 ml vand og 10 ml 25%'ig glutardialdehyd i 60 minutter, hvorefter man vaskede den i 60 minutter i rindende vand.

For at afprøve løbe-aktiviteten anbragtes omrøreren for langsomt at omrøre i 200 ml frisk fuldmælk. Efter ca. 60 sekunders forløb indtrådte der en stærk caseinudfældning, som viste, at omrøreren udviste løbe-aktivitet. Omrøreren blev herefter vasket og atter anvendt til langsom omrøring i 200 ml frisk fuldmælk. Det viste sig ved 10 gentagne behandlinger på denne måde, at der hver gang indtrådte en stærk caseinfældning efter 50-70 sekunder.

Eksempel 5

10 kg pulvergelatine (alkalisk oplukket, 80 Bloom) tilsattes 60 liter vand på ca. 20°C og opvarmedes i løbet af 30 minutter til 50°C. Derved gik gelatinen i opløsning. Herefter tilsatte man 3,5 liter formalin under omrøring. Efter ca. 2 minutter størknede massen

til en gel, som kørtes gennem en kødmaskine, hvorefter man tørrede i ca. 5 cm høje lag på metalbakkestativer i lufttørreskab ved 108°C i 24 timer. De tørrede partikler formalede på en blæsemølle med siindsats, således at man opnåede et bærerstoffpulver med en partikelstørrelse på fra 50 til $100\text{ }\mu\text{m}$. De spånformede partikler var vandopløselige og havde en vandoptagelsesevne på 3,2 gange deres tørvægt.

Til 5 kg af bærerstoffpulveret sattes ved 0°C 13 liter af en til 0°C afkølet opløsning, der indeholdt 0,5 kg handelstilgængeligt papain med en aktivitet på 45000 NF-enheder pr. mg. Herefter iblandedes 30 liter isopropanol og 1 liter 25%ig glutardialdehyd. Denne reaktionsblanding opvarmedes i løbet af 5 minutter til 25°C , hvorefter den henstod 60 minutter ved denne temperatur. Efter dette tidsrum filtreredes, og man vaskede grundigt med ca. 200 liter afioniseret vand. Den tilbageblevne ca. 18 kg tunge filterkage resuspenderedes i 20 liter afioniseret vand og tørredes over en laboratoriespraytørrer med tostofdyse ved 180°C luftindgangstemperatur og 85°C luftudgangstemperatur og en luftgennemstrømning på $450\text{ Nm}^3/\text{time}$. Herved fik man 5,35 kg bærerfikseret tørpræparat med en aktivitet på 520 NF-enheder pr. mg.

Eksempel 6

1 kg handelstilgængeligt amyloglucosidase fra *Aspergillus niger* med 1070 glucoamylaseenheder pr. g opløstes i 14 liter afioniseret vand. Herefter iblandedes 5 kg bærerstoffpulver, der var fremstillet som beskrevet i eksempel 1. Efter enzymopløsningens opslugning gennem bærerstoffpulveret tilsattes 20 liter acetone og 1 liter glutardialdehyd under omrøring, hvorefter man lod blandingen henstå i 60 minutter ved 30°C . Efter dette tidsrum filtreredes og vaskedes med 300 liter vand. Den tilbageblevne filterkage resuspenderedes i ca. 30 liter afioniseret vand og tørredes gennem en laboratoriespraytørrer med tostofdyse med 170°C luftindgangstemperatur, 85°C luftudgangstemperatur og $400\text{ Nm}^3/\text{time}$ luftgennemstrømning. Herved fik man 5,20 kg bærerfikseret tørpræparat med en aktivitet på 162 glucoamylaseenheder pr. g.

5 liter humlet lyst ølbryg tilsattes 20 ml tykgrødet ølgær (stamme Rh fra forsøgs- og læreranstalten for bryggerier i Berlin) og 1 g af det ovenfor beskrevne fikserede amyloglucosidasepræparat. Parallelt hermed blev en anden forsøgsmængde på samme måde, dog uden amyloglucosidasepræparat sat op. Begge forsøg lod man forgære i tempereret vandbad i 7 dage ved 8°C . Herefter frasugedes øllet, og for-

gæringsgraden bestemtes på sædvanlig måde ved centrifugering. Den afsatte ølgær med eller uden alymoglucosidasepræparat blev fjernet for hver 20 ml, og hver gang anvendt til fremstilling af endnu en ølforøgning. På denne måde foretoges fire overførsler af gæren. Når det drejede sig om gær, der var tilsat amyloglucosidasepartikler viste det sig som forholdsvis simpelt at overføre disse partikler fuldstændigt til den næste gærcharge, fordi de efter vaskning af gæraflejringerne hver gang afsattes på bunden. Tabel 3 viser de opnåede forøgelsesgrader med og uden amyloglucosidasepræparat ved de fire overførsler.

Tabel 3

		uden præparat	med præparat
Forøgelsesgrad,	1. overførsel	78,2%	89,3%
"	2. "	78,5%	86,5%
"	3. "	77,9%	87,6%
"	4. "	78,0%	84,8%

Eksempel 7

25 g affaldsgelatine i flydende form uden geleringssevne med 70% tørstofindhold opløstes i 100 ml afioniseret vand ved 50°C. Den opløste gelatine tilsattes 3 ml formalin. Herefter udhældtes reaktionsblandingen på en glasplade, der var aftørret med en fedtet klud, og herefter fordelte man reaktionsblandingen i et tyndt lag. Glaspladen med reaktionsblandingen tørredes i et lufttørreskab ved 105°C. Efter tørring kunne det tværbundne bærerstoffet aftages fra glaspladen som en membran.

En 5 x 5 cm stor bærerstoffmembran af 0,1 mm tykkelse dyppedes i 2 minutter i en opløsning af 10 mm handelstilgængelig flydende glucoseoxidase-katalase (som i eksempel 1) og 50 ml destilleret vand. Herefter lagdes membranen ved stuetemperatur i 60 minutter i en blanding af 70 ml acetone, 30 ml vand og 12 ml 25%ig glutardialdehyd. Efter dette tidsrum vaskede man membranen grundigt med vand. Herefter opbevarede den under glycerol til senere anvendelse. Aktivitetsbestemmelse på en del af membranen viste en glucoseoxidaseaktivitet på 112 SU/g tørstof og en katalaseaktivitet på 96 BU/g tørstof.

Eksempel 8

20 g pulvergelatine (surt oplukket, 80 Bloom) opløstes i 100 ml destilleret vand under omrøring ved 60°C. Den opløste gelatine tilsattes 2 ml formalin. Herefter dyppedes en affedt rundsi af ædelstål med en diameter på 5 cm, en maskevidde på 1 mm og en trådstyrke på 0,1 mm i denne reaktionsopløsning, hvorefter man fjernede den. Overskydende reaktionsblanding fjernedes med en luftstrøm, således at tråden blev overtrukket ensartet af et tyndt reaktionsblandingslag. Herefter blev sien i denne tilstand tørret i 4 timer ved 105°C i et lufttørreskab. Herefter dyppedes den nu med et fint bærerstofflag overtrukne si 2 minutter i en opløsning bestående af 10 ml handelstilgængelig flydende glucoseoxidase-katalase og 50 ml destilleret vand. Herefter anbragtes sien ved stuetemperatur i 60 minutter i en blanding af 70 ml acetone, 30 ml vand og 15 ml 25%ig glutardialdehyd. Efter dette tidsrum fulgte en grundig afvaskning med vand af sien.

For at afprøve den enzymatiske virkning anbragtes sien i 100 ml 3,5%ig glucoseopløsning, som gennemventileredes kraftigt gennem en fritte. pH-værdien af denne opløsning holdtes automatisk konstant ved en titrator. Man målte det i tabel 4 anførte forbrug af 0,01 N NaOH.

Tabel 4

Tid [min.]	Forbrug 0,01 N NaOH [ml]
0	0,00
15	0,35
30	0,85
45	1,41
60	1,85
75	2,41
90	2,96
105	3,58
120	4,19

Enzymaktivitetsbestemmelser.

Bestemmelserne af enzymaktiviteten skete på de nedenfor anførte måder. Dersom det drejede sig om fikserede enzymer, blev inkubationsmængden omrørt eller omrystet, også selv om det ikke var angivet i originalforskriften.

Katalaseaktivitet: efter First Suppl. Food Chem. Codex, 2. udgave, s. 67-68, Forlag National Academy of Sciences, Washington, 1974.

Glucoseoxidaseaktivitet: efter First Suppl. Food Chem. Codex, 2. udgave, s. 78-79, Forlag National Academy of Sciences, Washington, 1974.

Lactaseaktivitet: efter First Suppl. Food Chem. Codex, 2. udgave, s. 81-83, Forlag National Academy of Sciences, Washington, 1974.

Amyloglucosidaseaktivitet: efter H.J.Pieper, Mikrobielle Amylasen bei der Alkoholgewinnung, s. 48-49, Forlag Ulmer, Stuttgart.

Papainaktivitet: efter First Suppl. Food Chem. Codex, 2. udgave, s. 86-87, Forlag National Academy of Sciences, Washington, 1974.

P A T E N T K R A V

1. Vanduopløseligt enzympræparat på basis af til et bærerprotein ved hjælp af glutardialdehyd covalent fikseret enzym, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet eller en enzymblanding er bundet til med formaldehyd hårdet gelatine eller æggehvide, der har en vandoptagelsesevne på to til otte gange dens tørvægt.

2. Enzympræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er en protease, der er bundet til med formaldehyd hårdet gelatine eller æggehvide med en vandoptagelsesevne på to til fire gange dens tørvægt.

3. Enzympræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at enzymblandingen indeholder glucoseoxidase og katalase.

4. Enzympræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er et løbeenzym.

5. Enzympræparat ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere indeholder en stabiliserende polyalkohol.

6. Fremgangsmåde til fremstilling af et enzympræparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at med formaldehyd hårdet gelatine eller æggehvide, som eventuelt har været underkastet en efterfølgende tørrende varmebehandling, og som udviser en vandoptagelsesevne på to til otte gange dens tørvægt, tilsættes en sådan mængde enzymholdig væske, at væsken opsuges fuldstændig af den hårdede gelatine eller æggehvide under kvældning, og at der derefter tilsættes en opløsning af glutardialdehyd i en enzymfældende væske.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymfældende væske er en lavere alifatisk alkohol og/eller keton.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 6 eller 7, k e n d e t e g n e t ved, at glutardialdehyd tilsættes i en sådan mængde, at koncentrationen i reaktionsblandingen ligger mellem 0,5 og 5%.

9. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 6-8, k e n d e t e g n e t ved, at koblingsreaktionen gennemføres i løbet af 5 minutter til 5 timer.

Fremdragne publikationer:

