

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148484 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **2858/75**

(51) Int.Cl.⁴: **C 12 N 11/00**

(22) Indleveringsdag: **24 jun 1975**

C 07 K 17/00

(41) Alm. tilgængelig: **26 dec 1975**

(44) Fremlagt: **15 jul 1985**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **25 jun 1974 GB 28212/74**

(71) Ansøger: ***UNITED KINGDOM ATOMIC ENERGY AUTHORITY; London SW1Y 4QP, GB.**

(72) Opfinder: **Alan *Rosevear; GB.**

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et i adskilte
partikler af et bæremateriale immobiliseret pro-
teinholdigt biologisk aktivt stof**

UK 148484 B

Den foreliggende opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et i adskilte partikler af et bæremateriale immobiliseret proteinholdigt biologisk aktivt stof, ved hvilken en opløsning af det proteinholdige biologisk aktive stof indføres i porerne i et porøst bæremateriale, og det proteinholdige biologisk aktive stof tværbindes.

Proteinholdige biologisk aktive stoffer, såsom enzymer, er nyttige som katalysatorer ved visse fremgangsmåder (f.eks. amyloglucosidase ved fremstillingen af glucose ud fra stivelse). I praksis viser det sig imidlertid ofte, at proteinholdige biologisk aktive stoffer kun kan fås i former, såsom enzympræparater, der er vandopløselige. Dette betyder, at et sådant stof ikke kan isoleres

på økonomisk måde ved afslutningen af en proces, således at stoffet enten går tabt i spildvæsken eller forurener produktet.

Det kan derfor være fordelagtigt at immobilisere et proteinholdigt biologisk aktivt stof på eller i et bæremateriale, således at det kan fraskilles fra reaktionsmediet ved fysiske metoder, såsom filtrering eller sedimentering. Desuden er proteinholdige biologisk aktive stoffer, der er immobiliserede på eller i et bæremateriale, til rådighed til "lokaliseret" anvendelse, f.eks. som et leje i en kolonne.

Et biologisk aktivt stof anses for at være immobiliseret på eller i et bæremateriale, hvis det er fikseret derpå eller deri på en sådan måde, at i det mindste størstedelen af stoffet tilbageholdes på bærematerialet under de særlige procesbetingelser, hvorunder bærematerialet og det biologisk aktive stof anvendes.

Der er tidligere blevet foreslået forskellige fremgangsmåder til "fiksering" eller "immobilisering" (ofte betegnet som "uopløseliggørelse") af biologisk aktive stoffer på eller i bærematerialer. Disse fremgangsmåder er imidlertid utilfredsstillende derved, at de opnåede produkter har forskellige ulemper. F.eks. sker der enten en "udvaskning" af det biologisk aktive stof fra bærematerialet, når det er i anvendelse, og/eller den fysiske, kemiske eller mikrobiologiske stabilitet af stof/bæremateriale-kombinationen er utilfredsstillende med det resultat, at stoffet ikke er disponibelt til forudsat genanvendelse over længere tidsrum.

Disse ulemper undgås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved, at adskilte partikler af det porøse bæremateriale først gennemvædes i en koncentreret opløsning af proteinholdigt biologisk aktivt stof, og det proteinholdige biologisk aktive stof i porerne derefter uopløseliggøres inden tværbindingen ved behandling med en opløsning i vandig acetone, ethanol eller isopropanol af et udfældningsmiddel, fortrinsvis garvesyre.

Det er ganske vist kendt at fremstille et i et bæremateriale immobiliseret biologisk aktivt protein, nemlig et lactase-præparat, ved at behandle en opløsning af lactase i nærværelse af et porøst bæremateriale, nemlig filterhjælpemidlet "Celite[®]", med garvesyre som udfældningsmiddel og glutaraldehyd som tværbindningsmiddel. Dette er offentliggjort ved et møde forud for den foreliggende opfindelses prioritetsdag og senere offentliggjort i en artikel af A.C. Olson og C.L. Cooney: "Immobilized Enzymes in Food and Microbiological Processes", Proceedings of a Symposium on Immobilized Enzymes held

at the 166th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, Illinois, 1973, Plenum Press, New York, 8/74, side 54-61, især side 55, 3.afsnit. Det ved denne kendte fremstillingsmåde opnåede produkt er imidlertid en blanding af organisk gel og filterhjælpemiddel, i hvilken blanding der mellem fine partikler af filterhjælpemiddel er områder af sammentrykkelig organisk gel, og dette produkt gav ved anvendelse i f.eks. kolonner angiveligt anledning til visse vanskeligheder med hensyn til sammenpakning, og det har da heller ikke bare tilnærmelsesvis samme karakter af et produkt bestående af adskilte partikler af et bæremateriale som det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnåede produkt, hvori størstedelen af det immobiliserede proteinholdige biologisk aktive stof er tilvejebragt i bærematerialets porer under optimal udnyttelse af porevolumenet. Hertil kommer, at man ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen alt efter det påtænkte anvendelsesområde kan benytte egnede bærematerialer som nærmere beskrevet nedenfor, således at der opnås et i praksis anvendeligt produkt bestående af robust bæremateriale med aktiv gel beskyttet i dets porer.

Udtrykket "proteinholdigt biologisk aktivt stof" som anvendt i nærværende beskrivelse omfatter som nævnt f.eks. enzymer, og omfatter både stoffer, der er biologisk aktive i sig selv, og stoffer, der ikke er det, men som kan aktiveres efter immobilisering, således at de bliver biologisk aktive.

Ved immobilisering af proteinholdigt biologisk aktivt stof ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen sker der først en uopløseliggørelse af stoffet i bærematerialets porer, således at en væsentlig koncentration af stoffet står til rådighed til at immobiliseres i bærematerialet ved tværbinding. Udtrykket "uopløseliggørelse" anvendes for at skelne mellem karakteren af den derved opnåede tilbageholdelse af stoffet i bærematerialet og den ved tværbinding opnåede mere permanente immobilisering.

Medens der under den ved uopløseliggørelsen opnåede tilbageholdelse kan ske adsorption af det proteinholdige biologisk aktive stof til bærematerialet, har det vist sig, at anvendelse af adsorption alene til opnåelse af tilbageholdelse giver et lavt udbytte af f.eks. immobiliseret enzym.

Selv om en del af det proteinholdige biologisk aktive stof kan immobiliseres på den ydre overflade af bærematerialet, tilsigtes det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen at opnå, at størstedelen af det immobiliserede proteinholdige biologisk aktive stof er til stede i det porøse bærematerialets porer, idet der herved immobiliseres en større mængde af det biologisk aktive stof. Derfor skal det porøse bæremateriales porestørrelse og porestruktur være således, at det tillader en passage af det stof, der skal immobiliseres, foruden naturligvis i sidste ende en passage af stoffet, hvormed det immobiliserede stof skal reagere.

En hensigtsmæssig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at det proteinholdige biologisk aktive stof i porerne behandles samtidig med opløsningen af udfældningsmiddel og et tværbindingsmiddel eller flere sådanne midler. Denne udførelsesform vil være hensigtsmæssig i tilfælde af enzymer (f.eks. amyloglucosidase), hvor den tid, det tager for tværbindingen at komme i stand, langt overstiger den tid, det tager at udfælde enzymet.

En anden hensigtsmæssig udførelsesform består i, at det proteinholdige biologisk aktive stof i porerne forbehandles til fremkaldelse af en vis grad af tværbinding før udfældningen. Herved kan den ved uopløseliggørelsen opnåede tilbageholdelse af det proteinholdige biologisk aktive stof i visse tilfælde lettes.

En yderligere hensigtsmæssig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at man til uopløseliggørelse af det proteinholdige biologisk aktive stof i det porøse bæremateriales porer kombinerer behandlingen med udfældningsmidlet med en forudgående frysetørring.

I forbindelse med sidstnævnte udførelsesform er det endvidere hensigtsmæssigt, at der efter frysetørring af stoffet i det porøse bæremateriales porer, men før tværbinding, indføres yderligere proteinholdigt biologisk aktivt stof i det porøse bæremateriale ved neddykning i en koncentreret opløsning af stoffet, som derefter udfældes ved behandling med opløsningen af udfældningsmiddel.

Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er amyloglucosidase blevet immobiliseret under anvendelse af garvesyre som udfældningsmiddel og glutaraldehyd som tværbindingsmiddel på følgende uorganiske materialer, der er anført som eksempler:

porøse titanoxidkugler, porøse calciumphosphatkugler, porøse aluminiumoxidkugler, porøse zirconiumoxidkugler, kontrolleret poreglas (Corning glastyper CPG10-240, 10-370, 10-1250, 30-370 og 30-2000), knust thermalitblok, brugt Laporte-katalysator og brugt Crosfield-katalysator (brugte Laporte- og Crosfield-katalysatorer indeholder porøse aluminiumsilicatpartikler). Det skal bemærkes, at andre materialer end de ovenfor som eksempler anførte er egnede til anvendelse som bærematerialer. F.eks. er porøse naturlige jordarter, såsom "Celite[®]", egnede som bærematerialer, og enzymer er blevet immobiliseret ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen på porøse kugler fremstillet af "Celite[®]". Endvidere kan organiske materialer, såsom træ, "Viscose", "Sephadex[®]" (en tværbundet dextran) og "Bio-gel" (en polyacrylamidgel) anvendes som bærematerialer. F.eks. er amyloglucosidase blevet immobiliseret på træspåner under anvendelse af garvesyre som udfældningsmiddel og glutaraldehyd som tværbindingsmiddel. Bærematerialet skal selv-
saft være i det væsentlige uopløseligt under behandlingsbetingelserne og i de reaktionsmedier, hvori bærematerialet og det biologisk aktive stof anvendes.

Det følgende er eksempler på biologisk aktive stoffer, der er blevet immobiliseret på porøse titanoxidkugler (med en partikelstørrelse på 500 μ i diameter og med 60% af porerne i området fra 2700 - 10.000 Å i diameter) under anvendelse af garvesyre som udfældningsmiddel og glutaraldehyd som tværbindingsmiddel: amyloglucosidase (fire typer), lactase (fire typer), α -amylase, chymotrypsin, trypsin, urease, glucoseoxidase, lipoxidase, glucoseisomerase og papain.

Mere end ét biologisk aktivt stof kan immobiliseres på den samme bærer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Således er amyloglucosidase og α -amylase blevet immobiliseret sammen.

En række forskellige reagenser er blevet anvendt som udfældningsmiddel ved udførelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Under anvendelse af glutaraldehyd som tværbindingsmiddel er således en i handelen gående amyloglucosidase (der fås under navnet "Agidex") blevet immobiliseret på porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse og porestørrelse som anført ovenfor) under anvendelse af følgende eksempler på udfældningsmidler: garvesyre i 70% ethanol, garvesyre i 50% acetone, garvesyre i en 2:1-blanding af vand og isopropanol og syntetiske polyphenoler i 50% acetone (der fås under navnene "Tannia", "Fixoflex", "Fixin" og "Hysolad" fra Harshaw Chemicals Ltd.).

Amyloglucosidase ("Agidex") er også blevet immobiliseret ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen på porøse titanoxidkugler (partikel- og porestørrelse som anført ovenfor) under anvendelse af formaldehyd eller diethylpyrocarbonat som tværbindingsmiddel. Desuden er amyloglucosidase ("Agidex") blevet immobiliseret på porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse og porestørrelse som anført ovenfor) under anvendelse af garvesyre som udfældningsmiddel og anvendelse af alkalisk oxidation til fremkaldelse af tværbinding. Andre tværbindingsmidler omfatter glyoxal og bis-diazoniumsalte.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er endvidere glucoseoxidase blevet immobiliseret på titanoxidkugler under anvendelse af garvesyre og diethylpyrocarbonat, og papain er blevet immobiliseret på titanoxidkugler under anvendelse af garvesyre og formaldehyd.

De optimale betingelser for immobilisering af biologisk aktive stoffer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen afhænger i det mindste delvis af stoffets biokemiske egenskaber. Det optimale valg af f.eks. udfældningsmiddel, tværbindingsmiddel og tværbindingstid findes således ved forsøg.

Immobiliseringstiden kan variere mellem f.eks. 1/2 time og 24 timer afhængig af det biologisk aktive stof.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres fortrinsvis ved ca. 4°C. Det har vist sig, at der kan indtræde inaktivering af visse biologisk aktive stoffer ved højere temperaturer. Dette afhænger imidlertid af stoffet, og højere eller lavere temperaturer kan være passende.

Det har vist sig ved immobilisering af amyloglucosidase ("Agidex") på porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse og porestørrelse som anført ovenfor) ved udfældning og tværbinding, at den bedste udførelse set ud fra et synspunkt om enzymaktivitet opnås ved anvendelse af garvesyre i acetone som udfældningsmiddel og glutaraldehyd som tværbindingsmiddel. Ved anvendelse af denne særlige kombination af udfældningsmiddel og tværbindingsmiddel har det f.eks. vist sig, at den tilsyneladende enzymaktivitet af amyloglucosidase ("Agidex") immobiliseret på porøse titanoxidkugler kan være op til 20% af enzymaktiviteten af det som kilde for amyloglucosidase anvendte vandige enzympræparat.

Under anvendelse af 5%'s garvesyre i en 5:1-blanding af acetone og vand som udfældningsmiddel og glutaraldehyd som tværbindings-

middel fremstilledes der en portion amyloglucosidase immobiliseret på porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse og porestørrelse som anført ovenfor) ud fra ca. 110 g titanoxidkugler og 30 ml "Agidex", hvilken portion pakkedes i en 60 cm høj kolonne med et volumen på 100 ml til dannelsen af et leje.

En med syre fortyndet stivelsesopløsning passeredes gennem kolonnen med en hastighed på mellem 52 og 230 ml/time. Kolonnen holdtes ved 60°C i 8 dage, i hvilket tidsrum der behandledes 9 liter af opløsningen.

Dextroseækvivalentet (D.E.) af produktet fra kolonnen var lige så højt, som det kan forventes, når der anvendes et opløseligt enzym til den samme omdannelsesproces. Produktets hydrolysegrad var konstant under 7 dages vedvarende anvendelse af kolonnen.

En kolonne af amyloglucosidase immobiliseret på porøse titanoxidkugler anvendtes kontinuerligt til hydrolyse af en dextrinopløsning over et tidsrum på 7 1/2 dag. Produktet fra kolonnen havde en konstant D.E.-værdi, hvilket angav næsten total omdannelse af udgangsmaterialet. Derefter vaskedes kolonnen fri for dextrinopløsning, oplagredes i 5 uger ved stuetemperatur og genanvendtes til den samme hydrolyseproces. D.E.-værdien af produktet viste sig at være den samme som den tidligere opnåede. Kolonnen oplagredes i yderligere 11 uger, og det viste sig, at der ikke var sket noget alvorligt tab i enzymaktivitet.

Det har vist sig, at porøse titanoxidkugler med deri ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen immobiliseret amyloglucosidase kan anvendes enten i et pakket leje som beskrevet ovenfor, i en reaktor med fluidiseret leje eller i en omrørt tankreaktor. Det må forventes, at det vil forholde sig på samme måde for mange partikelformede porøse bærematerialer, hvori der er immobiliseret proteinholdige biologisk aktive stoffer i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Amyloglucosidase er blevet immobiliseret på porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse og porestørrelse som anført ovenfor) under anvendelse af frysetørring og et udfældningsmiddel til fremkaldelse af uopløseliggørelse og glutaraldehyd til fremkaldelse af tværbinding.

Enzymer er blevet immobiliseret in situ på en kolonne af porøse titanoxidkugler.

Ved in-situ-immobilisering kan overskud af biologisk aktivt stof, der ikke er blevet uopløseliggjort i bærematerialet,

genvindes til recirkulation ved vaskning af bærematerialet (f.eks. med acetone/garvesyre) før tværbinding.

Brugt immobiliseret enzym er blevet fjernet fra titanoxidkugler, og kuglerne er blevet genanvendt til yderligere immobilisering. Koncentreret salpetersyre, koncentreret natriumhydroxidopløsning eller opvarmning i en ovn var egnet til fjernelse af enzym fra kuglerne.

En lang række proteinholdige biologisk aktive stoffer kan immobiliseres på en lang række bærematerialer i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Følgelig frembyder opfindelsen en fordel i forhold til kendte "immobiliseringsfremgangsmåder" med hensyn til fleksibilitet, idet der kan vælges et bæremateriale blandt en lang række materialer på basis af dets egenskaber, således at de egner sig til en særlig anvendelse.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

1 ml "Agidex"-opløsning sættes til 3 ml porøse titanoxidkugler (500 μ partikelstørrelse og med 60% af porerne i området fra 2700-10.000 Å i diameter) i et isbad, og man lod opløsningen fordele sig helt gennem kuglerne. 1,5 ml af en 5%'s opløsning af garvesyre i en 5:1-blanding af acetone og vand, hvilken opløsning på forhånd var afkølet i et isbad, tilsattes efterfulgt af 0,25 ml af en 50%'s vandig opløsning af glutaraldehyd. Væskeoverfladen stod derefter lige over overfladen af de porøse titanoxidkugler. Efter 5 timers forløb fjernedes kuglerne fra isbadet, vaskedes og pakkedes i en kolonne, således at enzymaktiviteten kunne undersøges. Der anvendtes en opløsning af dextrin til undersøgelse af kolonnens egenskaber, og idet aktiviteten af den oprindelige "Agidex"-opløsning sættes til 100%, viste den tilsyneladende aktivitet af det immobiliserede enzym i kolonnen sig at være 20%.

Eksempel 2

4,5 ml "Agidex"-opløsning fordeltes fuldstændigt gennem 15 ml porøse titanoxidkugler som i eksempel 1. 6,75 ml af en afkølet 2%'s opløsning af garvesyre i acetone, hvori der kort forinden var blandet 1,05 ml af en 50%'s vandig opløsning af glutaraldehyd, tilsattes,

og den opnåede stive opslemning blandedes grundigt. Efter 5 timers forløb vaskedes kuglerne, og enzymaktiviteten afprøvedes som i eksempel 1. Den tilsyneladende enzymaktivitet af det immobiliserede enzym viste sig at ligge på samme niveau som det i eksempel 1 opnåede.

Eksempel 3

8 ml "Agidex"-opløsning, fortyndet i forholdet 1:1 med vand, fordeltes fuldstændigt gennem 10 ml porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse og porestørrelse som i eksempel 1) og frysetørredes (lyofiliseredes). 1,5 ml "Agidex"-opløsning fordeltes fuldstændigt gennem 5 ml af disse lyofiliserede kugler, og 2,25 ml af en afkølet 2%'s opløsning af garvesyre i acetone og 0,35 ml 50%'s glutaraldehyd tilsattes på samme måde som i eksempel 2. Den tilsyneladende aktivitet af det immobiliserede enzym viste sig at være 15% større end aktiviteten af immobiliseret enzym fremstillet under anvendelse af porøse titanoxidkugler, men uden frysetørringstrinnet.

Eksempel 4

2 ml "Agidex"-opløsning sattes til og fordeltes fuldstændigt gennem 5 ml porøse glaspartikler ("Corning CPG 10-1250", 36-75 μ partikelstørrelse) i et isbad. 3 ml af en afkølet 5%'s opløsning af garvesyre i en 5:1-blanding af acetone og vand tilsattes efterfulgt af 0,5 ml af en 50%'s vandig opløsning af glutaraldehyd. Efter 5 timers forløb vaskedes glaspartiklerne, og enzymaktiviteten undersøgte i en lille omrørt batchreaktor. Den tilsyneladende aktivitet af det immobiliserede enzym var 93% af aktiviteten af enzym immobiliseret på porøse titanoxidkugler af den i eksempel 1, 2 og 3 anvendte type.

Eksempel 5

1 ml "Agidex"-opløsning fordeltes fuldstændigt gennem 3 ml porøse titanoxidkugler som i eksempel 1. 1,5 ml af en afkølet 10%'s opløsning af "Fixoflex" (en syntetisk polyphenol) i en 5:1-blanding af acetone og vand tilsattes efterfulgt af 0,25 ml af en 50%'s vandig opløsning af glutaraldehyd. Efter 5 timers forløb vaskedes kuglerne, og når det immobiliserede enzym afprøvedes som i eksempel 1, viste det sig at have 82% af aktiviteten af immobiliseret enzym fremstillet med garvesyre i en blanding af acetone og vand som udfældningsmiddel.

Eksempel 6

1 ml af en vandig opløsning af lactase ("Maxilact[®]" 75 mg/ml) sættes til og fordeltes fuldstændigt gennem 3 ml porøse titanoxidkugler. 1,5 ml af en afkølet 0,25%'s opløsning af garvesyre i en 5:1-blanding af acetone og vand tilsættes efterfulgt af 0,1 ml af en 20%'s vandig opløsning af glutaraldehyd. Efter 20 minutters forløb vaskedes kuglerne og pakkedes i en kolonne. Den tilsyneladende aktivitet af det immobiliserede enzym var 11% af aktiviteten af det opløselige enzym, når der som substrat anvendtes o-nitrophenyl- β -D-galactosid.

Eksempel 7

1,5 ml "Agidex"-opløsning sættes til 5 ml porøse titanoxidkugler (500 μ) i et isbad og fordeltes fuldstændigt gennem kuglerne. 2,25 ml af en afkølet 2%'s opløsning af garvesyre i acetone tilsættes efterfulgt af 0,35 ml af en 37%'s vandig opløsning af formaldehyd. Efter 5 timers forløb vaskedes kuglerne, og det immobiliserede enzym afprøvedes som i eksempel 1. Det viste sig at have en enzymaktivitet på 56% af aktiviteten af et lignende immobiliseret enzym fremstillet under anvendelse af glutaraldehyd som tværbindingsmiddel.

Eksempel 8

1 ml "Agidex"-opløsning fordeltes fuldstændigt gennem en portion bløde træspåner, der optog et rumfang på 3 ml, i et isbad. 1,5 ml af en afkølet 2%'s opløsning af garvesyre i acetone, hvori der kort forinden var blevet blandet 0,25 ml af en 50%'s vandig opløsning af glutaraldehyd, tilsættes, og reagenserne blandedes grundigt. Efter 5 timers forløb vaskedes spånerne og pakkedes løst i en lille kolonne, således at enzymaktiviteten kunne afprøves som i eksempel 1. Spånerne havde en enzymaktivitet, der var 74 % af aktiviteten af det immobiliserede enzym i eksempel 2.

Eksempel 9

Man lod 1,5 ml af en vandig opløsning af glucoseisomeraseenzym (opnået ved vandig ekstraktion af "Maxazyme[®]-GI" 14.000 celler) gennemvade 5 g porøse titanoxidkugler (partikelstørrelse 500 μ i diameter og med 60% af porerne i området fra 2.700-10.000 Å i diameter) i et isbad.

Enzymet blev udfældet og tværbundet ved hjælp af 2,25 ml af en opløsning af 3% garvesyre i acetone og 0,05 ml 50%'s vandig glutaraldehyd.

Efter omsætning i 1 1/2 time i et isbad vaskedes kuglerne, og enzymaktiviteten bestemtes.

Det viste sig, at kuglerne indeholdt 35% af den aktivitet, der var til stede i udgangsopløsningen af enzymet.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et i adskilte partikler af et bæremateriale immobiliseret proteinholdigt biologisk aktivt stof, ved hvilken en opløsning af det proteinholdige biologisk aktive stof indføres i porerne i et porøst bæremateriale, og det proteinholdige biologisk aktive stof tværbindes, k e n d e t e g n e t ved, at adskilte partikler af det porøse bæremateriale først gennemvædes i en koncentreret opløsning af proteinholdigt biologisk aktivt stof, og det proteinholdige biologisk aktive stof i porerne derefter uopløseliggøres inden tværbindingen ved behandling med en opløsning i vandig acetone, ethanol eller isopropanol af et udfældningsmiddel, fortrinsvis garvesyre.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det proteinholdige aktive stof i porerne behandles samtidig med opløsningen af udfældningsmiddel og et tværbindingsmiddel eller flere sådanne midler.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at det proteinholdige biologisk aktive stof i porerne forbehandles til fremkaldelse af en vis grad af tværbinding før udfældningen.

4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at man til uopløseliggørelse af det proteinholdige biologisk aktive stof i det porøse bæremateriales porer kombinerer behandlingen med udfældningsmidlet med en forudgående frysetørring.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der efter frysetørring af stoffet i det porøse bæremateriales porer, men før tværbinding, indføres yderligere proteinholdigt biologisk aktivt stof i det porøse bæremateriale ved neddykning i en koncentreret opløsning af stoffet, som derefter udfældes ved behandling med opløsningen af udfældningsmiddel.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 1915970

GB patent nr. 1407488

US patent nr. 3804719

A.C.Olson & C.L.Cooney: Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes, Proceedings of a Symposium on Immobilized Enzymes, 166. National Meeting of the American Chemical Society, 1973, Plenum Press, New York, 8/74, side 54-61.