

①9



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①1 CH 666 905 A5

⑤1 Int. Cl.⁴: C 12 N 11/00
C 12 N 9/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①2 **PATENTSCHRIFT** A5

②1 Gesuchsnummer: 5559/84

②2 Anmeldungsdatum: 21.11.1984

②4 Patent erteilt: 31.08.1988

④5 Patentschrift
veröffentlicht: 31.08.1988⑦3 Inhaber:
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd,
Chiyoda-ku/Tokyo (JP)⑦2 Erfinder:
Nagashima, Minoru, Hofu-shi/Yamaguchi-ken
(JP)
Azuma, Masaki, Hofu-shi/Yamaguchi-ken (JP)
Noguchi, Sadao, Hofu-shi/Yamaguchi-ken (JP)⑦4 Vertreter:
Bovard AG, Bern 25⑤4 **Trägergebundenes Enzym, Verfahren zu seiner Herstellung und Verfahren für seine Regeneration.**

⑤7 Das trägergebundene Enzym enthält ein basisches stickstoffhaltiges, Ionenaustauschergruppen aufweisendes Anionenaustauscherharz des Styrol-Divinylbenzol-Typs, das eine macroporelle Struktur hat und dessen stickstoffhaltige Ionenaustauschergruppen alle frei von aktivem Wasserstoff sind, wobei in die Macroporen dieses Anionenaustauscherharzes durch einen polyvalenten Aldehyd vernetztes Enzym eingelagert ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Trägergebundenes Enzym, dadurch gekennzeichnet, dass es ein basisches stickstoffhaltige Ionenaustauschergruppen aufweisendes Anionenaustauscherharz des Styrol-Divinylbenzol-Typen als Träger enthält, welches eine macroreticulare Struktur hat und dessen stickstoffhaltige Ionenaustauschergruppen frei von aktivem Wasserstoff sind und innerhalb der Macroporen des Anionenaustauscherharzes durch einen polyvalenten Aldehyd intermolekular vernetztes Enzym vorhanden ist.

2. Trägergebundenes Enzym gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das basische Anionenaustauscherharz des Styrol-Divinylbenzol-Typen einen mittleren Macroporenradius von 10 – 200 nm aufweist, und dass sein Macroporenvolumen 0,1 ml/g oder mehr beträgt.

3. Trägergebundenes Enzym gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das basische Anionenaustauscherharz vom Styrol-Divinylbenzol-Typ einen mittleren Macroporenradius von 20 – 100 nm aufweist, und dass sein Macroporenvolumen 0,2 – 1,0 ml/g beträgt.

4. Trägergebundenes Enzym gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der polyvalente Aldehyd ein gesättigter aliphatischer Dialdehyd mit 2 – 10 C-Atomen ist.

5. Trägergebundenes Enzym gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Oxidoreductase, Transferase, Hydrolase, Lyase, Isomerase und Ligase.

6. Trägergebundenes Enzym gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glucose-isomerase, Glucoamylase, Fumarase, Aspartase, Lipase, Invertase, Protease, Urease und Aminosäure-oxidase.

7. Verfahren zur Herstellung eines trägergebundenen Enzyms nach einem der Ansprüche 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, dass man ein basisches Anionenaustauscherharz vom Styrol-Divinylbenzol-Typ mit stickstoffhaltigen Ionenaustauschergruppen, welches eine macroreticulare Struktur aufweist, und dessen stickstoffhaltige Ionenaustauschergruppen alle frei von aktivem Wasserstoff sind, mit einer Lösung, die ein Enzym enthält, in Kontakt bringt, um das Enzym am Harz zu adsorbieren, und dann das enzymhaltige Harz mit einer Lösung eines Substrates für das Enzym und nachher mit einer Lösung eines polyvalenten Aldehydes, der das Enzym intermolekular vernetzt, in Kontakt bringt.

8. Verfahren zur Regenerierung eines trägergebundenen Enzyms gemäss Anspruch 1, das nach mehrmaligem Gebrauch zur Durchführung einer Reaktion erschöpft ist, dadurch gekennzeichnet, dass man dasselbe mit einer wässrigen Mineralsäurelösung, die pro Liter 0,2–5 mol Salz enthält, in Kontakt bringt, wobei das Enzym unter gleichzeitiger Auflösung der Vernetzungen desorbiert wird, das erhaltene Harz mit einer enzymhaltigen Lösung in Kontakt bringt und das enzymhaltige Harz mit einer Lösung eines Substrates für das Enzym und dann mit einer Lösung eines polyvalenten Aldehydes, der das Enzym intermolekular vernetzt, in Kontakt bringt.

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein trägergebundenes Enzym, auf ein Verfahren zu seiner Herstellung und auf ein Verfahren zu seiner Regeneration. Der Träger enthält ein basisches Anionenaustauscherharz des Styrol-Divinylbenzol-Typen mit einer macroreticularen Struktur, das stickstoffhaltige Ionenaustauschergruppen ohne aktiven

Wasserstoff aufweist. In den Macroporen des Harzes ist intermolekular durch eine polyvalente Aldehydgruppe miteinander vernetztes Enzym vorhanden.

Unter Verwendung einer Adsorptionsmethode wurden bisher zur Herstellung eines gebundenen Enzyms enthaltenden Harzmaterials macroporöse oder macroreticulare Anionen- oder Kationenaustauscherharze verwendet. Die auf diese Weise erhaltenen Harze zeigten jedoch eine Anzahl von Problemen.

Zum Beispiel ist in einem Verfahren unter Verwendung von «Duolite» A7, welches ein schwachbasisches Anionenaustauscherharz eines Polyphenoltypen ist (ungeprüfte, publizierte JP-PA 80 160/1974) die Elution schwierig und somit ebenfalls die Regeneration schwierig, da die Adsorption sehr stark ist. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, die Adsorptionskräfte aufgrund der hydrophoben Eigenschaften durch die weitere Einführung von hydrophilen Gruppen schwächer zu machen (ungeprüfte publizierte JP-PA 85 890/1978), dieser Vorschlag erwies sich jedoch als nicht zweckmässig.

Andererseits wird in einem Verfahren, worin «Amberlite» IRA-904, ein schwachbasisches Anionenaustauscherharz des Styrol-Divinylbenzol-Typs, verwendet wird (ungeprüfte publizierte JP-PA 53 584/1975), das Enzym im allgemeinen schwach adsorbiert und löst sich während des Gebrauchs graduell ab, dabei findet ebenfalls die bevorzugte Adsorption von Polysacchariden statt (ungeprüfte JP-PA 147 992/1979).

In einer kontinuierlichen Methode, welche ein fixiertes Enzym verwendet, wird die Kontamination mit infektiösen Mikroben in einem Reaktor oft zu einem Problem, wobei als Gegenmassnahmen dafür Bedingungen mit einer hohen Substratkonzentration und ein Medium mit hohen Temperaturen verwendet werden. Die Gegenmassnahmen jedoch führen oft zu einer Verschlechterung des Harzes (z.B. Verhinderung des Kontaktes eines Substrates mit dem Enzym wegen den irreversibel adsorbierten Polysacchariden etc.).

Es ist nun gefunden worden, dass es unter den vorstehend genannten Umständen durch die vorliegende Erfindung möglich ist, ein gebundenes Enzym enthaltendes Harzmaterial zu erhalten, welches der kontinuierlichen Verwendung eines Mediums mit hoher Temperatur standhalten kann und regeneriert und wiederverwendet werden kann, indem ein basisches Anionenaustauscherharz vom Styrol-Divinylbenzol-Typ ausgewählt wird, welches schwierig zu zerstören ist und auf welchem eine reversible Adsorption möglich ist und der Nachteil der schwachen Adsorption durch intermolekulare Vernetzung des Enzyms mit einem polyvalenten Aldehyd behoben wird ist.

Das polyvalente Aldehyd vernetzt die Enzyme durch chemische Kombination mit funktionellen Gruppen, insbesondere Aminogruppen in den Enzymen. In diesem Hinblick ist es notwendig, dass keine funktionelle Gruppe, die Stickstoff enthält, aktiven Wasserstoff enthält.

Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind somit das im Patentanspruch 1 definierte trägergebundene Enzym, das Verfahren zu seiner Herstellung gemäss der Definition in Patentanspruch 8, sowie das Verfahren zu seiner Regenerierung gemäss der Definition in Patentanspruch 9.

Im einzelnen wird die vorliegende Erfindung im nachstehenden Text näher beschrieben.

Unter den basischen Anionenaustauscherharzen vom Styrol-Divinylbenzol-Typ, die eine macroreticulare Struktur und Stickstoffhaltige Ionenaustauschergruppen ohne aktiven Wasserstoff aufweisen, sind diejenigen bevorzugt, die einen mittleren Macroporenradius von 10 – 200 nm, insbesondere 20 – 100 nm aufweisen und das Macroporenvolumen 0,1 ml/g oder mehr, insbesondere 0,2 – 1,0 ml/g, beträgt, z.B. Imac A20S, A20R, (Warenname von Duolite International

Co. (France)), Lewatit MP500A (Warenname von Bayer AG (BRD)), Duolite A378, A369, A368 (Warenname von Diamond Shamrock Co. (USA)) und Diaion HPA75, HPA25 (Warenname von Mitsubishi Chemical Industries Co., Ltd. (Japan)).

Die zu verwendenden polyvalenten Aldehyde sind nicht spezifisch begrenzt, umfassen jedoch vorzugsweise aliphatische Dialdehyde mit 2–10 C-Atomen, wie Glyoxal, Malonaldehyd, Succinaldehyd, Glutaraldehyd und Adipaldehyd.

Die im Rahmen der vorliegenden einzusetzenden Enzyme sind nicht spezifisch begrenzt und umfassen Oxidoreductase, Transferase, Hydrolase, Lyase, Isomerase, Ligase etc.. Insbesondere sind Glucoseisomerase, Glucoamylase, Fumarase, Aspartase, Lipase, Invertase, Protease, Urease, Aminosäureoxidase etc. besonders zweckmässig.

Die Herstellung von erfindungsgemäsem Harzmaterial ist nachstehend beschrieben. Das Harzmaterial kann erhalten werden, indem ein basisches Anionenaustauscherharz vom Styrol-Divinylbenzol-Typ, welches eine macroreticulare Struktur mit stickstoffhaltigen Ionenaustauschergruppen aufweist und worin jede Stickstoff enthaltende Ionenaustauschergruppe frei von aktiven Wasserstoff enthält, in Kontakt mit einer Enzymlösung gebracht wird, um das Enzym auf dem Harz zu adsorbieren, und dann das Harz in Kontakt mit einer Lösung eines Substrates für das genannte Enzym gebracht wird, und überdies das Harz in Kontakt mit einer Lösung eines polyvalenten Aldehydes gebracht wird.

Als enzymenthaltende Lösungen können beispielsweise folgende verwendet werden: Eine mikrobiische Zellfraktionsflüssigkeit oder ein Filtrat davon, eine Lösung eines rohen Enzyms in Wasser oder einer Pufferlösung, wobei das rohe Enzym durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat oder einem Lösungsmittel aus dem Filtrat erhalten worden ist, eine Lösung erhalten durch weitere Dialyse der Lösung, eine Lösung des gereinigten Enzyms etc..

Geeignete Bereiche der Enzymkonzentration in der Lösung sind 0,01 – 200 mg/l als Protein.

Der Anteil des verwendeten Harzes kann als Anteil des adsorbierten Enzyms beschrieben werden und liegt zweckmässigerweise im Bereich von 0,1 – 100 mg Protein/ml Harz.

Die Adsorption des Enzyms wird im allgemeinen im Batch durchgeführt unter Rühren bei 0–40°C während 30 min bis 72 h. Alternativ kann die Adsorption ebenfalls durch eine Säulenpassage der Enzymlösung durchgeführt werden, wobei die Säule mit einem Harz gepackt ist.

Der pH-Wert wird in einem pH-Bereich von 4–10 gehalten, worin das Enzym stabil ist, wobei der pH-Wert mit einer Pufferlösung eingestellt wird.

Anschliessend wird mit oder ohne Fest-Flüssigtrennung das Harz in Kontakt mit einer Lösung eines Substrates für das Enzym gebracht. Diese Behandlung dient dazu, dass verhindert wird, dass die aktiven Zentren in der nachfolgenden Behandlung mit einem polyvalenten Aldehyd beeinträchtigt werden, indem die aktiven Zentren mit dem Substrat temporär kombiniert werden. Der Kontakt kann im Batch oder in der Säule durchgeführt werden, ähnlich wie die Adsorption des Enzyms.

Als Substrate können verwendet werden: Substrate für die entsprechenden Enzyme, z.B. Fumar-, Apfelsäure, Natrium, Ammonium und Kaliumsalze davon etc. für das Enzym Fumarase; Glucose, Fructose etc. für das Enzym Glucoseisomerase; und lösliche Stärke, Maltose, Glucose, Maltotriose etc. für das Enzym Glucoamylase. Als Substratlösung kann eine wässrige Lösung, eine Pufferlösung etc. des Substrates eingesetzt werden.

Die Konzentration des Substrates beim Kontakt beträgt 0,1 mM–1,0 M und falls das Substrat ein Elektrolyt ist,

beträgt die Konzentration vorzugsweise 0,2 M oder weniger, um die Desorption des Enzyms wegen des Elektrolyten zu verhindern.

Der Anteil des verwendeten Substrates liegt zweckmässigerweise im Bereich von 10–1000 mal dem molaren Anteil des verwendeten polyvalenten Aldehydes, unter Berücksichtigung, dass das Substrat das aktive Zentrum im Wettbewerb mit dem polyvalenten Aldehyd schützt.

Die Behandlungstemperatur, der pH-Wert etc. sind ähnlich wie die entsprechenden Werte bei der Adsorption des Enzyms und die Zeit kann von 10 min bis 10 h variieren, abhängig von den Anteilen des Substrates und des polyvalenten Aldehydes; im allgemeinen beträgt die Zeit 30–60 min.

Anschliessend wird die Mischung in Kontakt mit der Lösung des polyvalenten Aldehydes ohne Fest-Flüssigtrennung gebracht. Als Kontaktmethode kann eine ähnliche ausgewählt werden, wie diejenige für die Substratbehandlung. Die Lösung des polyvalenten Aldehydes ist eine wässrige Lösung eines polyvalenten Aldehydes, oder falls dieser in Wasser spärlich löslich ist in Lösungen, wie Methanol, Ethanol oder dgl., wobei die Konzentration beim Kontakt zweckmässig 1–100 mM beträgt. Der Anteil des polyvalenten Aldehydes liegt im Bereich von 0,001–1 mM pro mg des Proteins.

Die Behandlung mit dem polyvalenten Aldehyd wird bei 0–40°C während 1 min bis 48 h durchgeführt. Dabei wird der pH-Wert vorzugsweise im stabilen Bereich des Enzyms konstant gehalten unter Verwendung von beispielsweise einer Pufferlösung.

Nach der Behandlung mit dem polyvalenten Aldehyd wird das Harz gewaschen, z.B. mit Wasser, Methanol oder Ethanol, um das nicht umgesetzte polyvalente Aldehyd, das nicht-umgesetzte Protein etc. zu entfernen, wobei das enzymgebundene Harzmaterial erhalten wird.

Das vorliegende trägergebundene Enzym zeigt eine vorzügliche Aktivität und verursacht keine wesentlichen Nebenreaktionen. Im übrigen wurde das vorliegende Harzmaterial ebenfalls in der Wärmeresistenz verbessert, z.B. wird die Aktivität sogar bei kontinuierlichem Gebrauch bei 40–70°C während einer langen Periode aufrecht erhalten, z.B. mindestens 3–10 Monate im Falle des fumarasegebundenen Harzmaterials.

Überdies kann das trägergebundene Enzym regeneriert werden, indem das beeinträchtigte, Harzmaterial nach der Verwendung für eine bestimmte Zeit mit einer wässrigen Mineralsäurelösung in Kontakt gebracht wird, die 0,2–5 M Salz enthält, um die durch das polyvalente Aldehyd gebildeten Vernetzungen zu zerschneiden, und das Enzym zu desorbieren.

Als Salze werden beispielsweise folgende verwendet: Starkes oder schwaches Alkalisalz einer starken Säure, vorzugsweise ein starkes Alkalisalz. Beispielsweise werden Alkalimetallsalze (z.B. Natriumchlorid, Natriumsulfat), Erdalkalimetallsalze (z.B. Calciumchlorid) und Ammoniumsalze (z.B. Ammoniumchlorid) von Schwefelsäure, Salzsäure oder Phosphorsäure bevorzugt.

Als Mineralsäure werden Schwefel-, Salz-, oder Phosphorsäure bevorzugt verwendet.

Als Kontaktart wird das Arbeiten im Batch unter Rühren oder die Passage einer Regenerationsflüssigkeit durch eine mit erfindungsgemäsem, trägergebundenem Enzym gepackte Säule, angewendet.

Der Kontaktvorgang wird zweckmässigerweise bei einer Mineralsäurekonzentration von 0,5–6 N und bei 40–95°C durchgeführt.

Wenn das regenerierte Harz einer enzymbindenden Operation, ähnlich der vorstehend beschriebenen, unterworfen

wird, erhält man ein trägergebundenes Enzym, in welchem die Aktivität und die Charakteristiken auf nahezu der gleichen Stufe wie bei neuem Harz liegen werden. Überdies sind ähnliche Charakteristiken auch nach zwei- oder dreimaliger Regeneration und Wiederverwendung vorhanden.

Bezüglich der Regeneration und Wiederverwendung existiert bereits ein Verfahren worin mit wässriger Elektrolytsalzlösung und Säurebehandlung gearbeitet wird (ungeprüfte publizierte JP-PA 70 871/1976), erfindungsgemäss wird jedoch das Lösen der Vernetzungen mit einer wässrigen Mineralsäurelösung, die ein Salz enthält, durchgeführt, einem vom genannten Regenerationsverfahren fundamental verschiedenen Verfahren.

Die vorliegende Erfindung wird im einzelnen durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Zuerst werden 300 ml eines Mediums, enthaltend 10% Glucose, 0,5% Natriumdihydrogenphosphat, 0,6% Harnstoff, 0,05% Magnesiumsulfat (Heptahydrat), 2% Pepton, 0,05% Fleischextrakt und 50γ/l Biotin, in einen 2000 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben und ein Fumarase produzierender Mikroorganismus, *Corynebacterium Flutamicum* ATCC 21513 wird inokuliert und kultiviert unter Schütteln bei einer Kulturtemperatur von 30°C während 48 h. Die mikrobiellen Zellen werden aus der Kulturflüssigkeit gewonnen, gewaschen und gefriergetrocknet, wobei 9 g mikrobiische Zellen erhalten werden. Die mikrobiischen Zellen werden in 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert 6,0) bei einer Konzentration von 50 g/l dispergiert und einer Ultraschallbehandlung unterworfen.

Als Träger werden verwendet «Imac» A20S (Duolite International Co., France) als Träger der vorliegenden Erfindung und Duolite A6 (Diamond Shamrock Co., USA) als Kontrolle. Jeder Träger wird gründlich mit entionisiertem Wasser gewaschen und anschliessend mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert 6,0) gepuffert. Danach wird die hergestellte rohe Enzymsuspension mit dem Harz in Kontakt gebracht, in einem Verhältnis von 200 U (als Aktivitätswert) pro ml Harz bei Zimmertemperatur während 16 h. Der Anteil des adsorbierten Proteins beträgt 90% oder mehr in beiden Fällen. Anschliessend wird einer dem Harz gleicher Anteil 0,1 M wässriger Natriumfumaratlösung als Stabilisator für das Enzym zugegeben. Der Überstand wird verworfen und dann wird ein dem Harz gleicher Anteil 0,2% wässrige Glutaraldehydlösung zum Harz zugegeben, und die Reaktion bei Zimmertemperatur während 30 min durchgeführt.

Jedes Harz wird gründlich gewaschen, wobei trägergebundene Enzyme A («Imac» A20S) bzw. B («Duolite» A6) erhalten werden. Jedes gebundene Enzym wird in eine ummantelte 10 ml Säule abgefüllt und dann wird eine 1 M wässrige Natriumfumaratlösung auf die Säule gegeben, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass diese Lösung bei 50°C mit einer Raumgeschwindigkeit $SV = 0,3$ (Aufgabevolumen/Trägervolumen · h) durch die Säule fliesst. Umwandlungen von Apfelsäure von 80% mit dem Träger A und 78% mit dem Träger B werden während 20 Tagen erhalten, was zeigt, dass eine kontinuierliche Herstellung möglich ist.

Beispiel 2

Werden die Operationen mit den Trägern gemäss Beispiel 1 während einem weiteren Monat fortgesetzt, werden die Umwandlungen reduziert auf 78% mit dem Träger A und 75% mit dem Träger B, wobei jedoch keine Kontamination wegen infektiösen Mikroben festgestellt werden kann. Anschliessend wird das Harz der Säule entnommen, und

0,5 N Schwefelsäure mit 0,5 M Natriumchlorid wird zum Harz gegeben, und die Mischung wird auf 70°C erwärmt und während 2 h auf dieser Temperatur gehalten. Das Harz wird mit entionisiertem Wasser gewaschen und das Enzym wird wiederum darauf fixiert, in gleicher Weise wie in Beispiel 1 beschrieben. Namentlich die rohe Enzymsuspension wird in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellt, und die Enzymsuspension wird in einem Verhältnis von 200 U pro ml des Adsorptionsharzes für das Enzym mit dem Harz in Kontakt gebracht. Die Anteile des adsorbierten Proteins sind 90% mit dem Träger A und 40% mit dem Träger B. Ähnlich wird eine Natriumfumaratlösung dazugegeben, eine Vernetzung unter Verwendung von Glutaraldehyd durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben, um das Enzym zu fixieren. Die enzymgebundenen Träger A bzw. B werden sorgfältig gewaschen und in 10 ml Säulen gefüllt und anschliessend lässt man 1 M wässrige Natriumfumaratlösung mit einer Raumgeschwindigkeit $SV = 0,3$ durch jede Säule fliessen. Die Umwandlung zu Apfelsäure in der ausfliessenden Flüssigkeit kann bei 80% während 20 Tagen mit dem Träger A gehalten werden, während sie mit dem Träger B am ersten Tag schnell auf 25% fällt, auf 15% am zehnten Tag und auf 11% am zwanzigsten Tag.

Danach wird die Regeneration und Wiederverwendung des enzymfixierten Trägers A in gleicher Weise wie oben wiederholt mit dem Resultat, dass bei der zweiten und dritten Wiederverwendung die Umwandlung in Apfelsäure im Ausfluss während 20 Tagen auf 80% gehalten werden kann.

Beispiel 3

Zuerst werden 25 g nasse Mikrobenzellen *Streptomyces phaeochromogenes* IFO 3105 in einer 0,02 M Phosphatpufferlösung (pH-Wert 8) autodigeriert, und anschliessend wird die Mischung filtriert, wobei eine Glucose-isomerase-Enzymlösung erhalten wird.

Auf einen pH-Wert von 8 gepuffertes «Duolite» A378 (Diamond Shamrock Co., USA) wird in der Enzymlösung suspendiert und die Suspension wird auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt und anschliessend mässig bei Zimmertemperatur während 16 h gerührt.

Anschliessend wird der Überstand verworfen und 50 ml einer 1%igen wässrigen Glucoselösung wird dem Harz beigegeben. Die Mischung wird während 10 min mässig gerührt und dann wird der Überstand verworfen. Dann werden 50 ml einer 0,2%igen wässrigen Glutaraldehydlösung zum Harz gegeben, und die Mischung wird bei Zimmertemperatur während 30 min gerührt, um die Vernetzung durchzuführen.

Das Harz wird in eine Säule gefüllt und mit Wasser gründlich gewaschen. Eine 0,5 M Glucoselösung, die 0,05 M $MgSO_4$ und 5×10^{-4} M $CoCl_2$ enthält, wird durch die Säule mit unlöslichem Enzym fliessengelassen, mit einer Geschwindigkeit von 500 ml pro h ($SV = 10$) bei 60°C. Die Fructose in der ausfliessenden Flüssigkeit weist eine Konzentration von 30 mg/ml auf, bestimmt durch die Cystein-carbazol-Methode.

Bei einem Durchtritt mit einer Raumgeschwindigkeit von 4 beträgt die Konzentration der Fructose 46 mg/ml und diejenige der Glucose 44 mg/ml, bestimmt durch die Glucoseoxidase-Methode und folglich wird ein Isomerisationsgrad von 51% erhalten. Wenn im weiteren die Zuckerlösung kontinuierlich durch die Kolonne durchtritt mit einer Raumgeschwindigkeit ($SV = 4$) während 20 Tagen, beträgt der Isomerisationsgrad am 20. Tag 49%. Dann wird das Harz aus der Säule ausgestossen und gründlich mit Wasser gewaschen, und 0,5 N Schwefelsäure, enthaltend 0,5 M Natriumchlorid dazugegeben. Die Mischung wird während 2 h auf 70°C erwärmt. Das Harz wird gewaschen und die Wiederfixierung

wird in der gleichen Weise wie in der ersten Operation durchgeführt. Wenn die gleiche Zuckerlösung wie oben durch den wiederfixierten Träger mit $SV = 10$ durchtritt, beträgt die Konzentration der Fructose in der ausfliessenden Flüssigkeit 31 mg/ml, woraus ersichtlich ist, dass das wiederfixierte Harz den gleichen Aktivitätsgrad wie das neue Harz aufweist.

Beispiel 4

Glucoamylase (hergestellt durch Nagase Sangyo Co., Ltd.) wird in einem 0,1 M Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,5 aufgelöst, wobei eine Lösung hergestellt wird, die 14 mg Enzym als Protein pro ml enthält. Dann werden 10 ml der Lösung zu 5 ml HPA75-Harz (hergestellt durch Mitsubishi Chemical Industries Co., Ltd.) zugefügt, und die Mischung wird in einem Thermostat während 16 h bei 37°C geschüttelt, wobei 22 mg des Proteins pro ml des Harzes adsorbiert wird.

Weiter wird das Harz gewaschen, der Überstand verworfen, 5 ml einer 1%igen wässrigen Lösung von löslicher Stärke zum Harz zugegeben und die Mischung mässig gerührt. Dann wird der Überstand verworfen, 5 ml einer 0,2%igen wässrigen Glutaraldehyd-Lösung zum Harz zugegeben und die Mischung mässig bei Zimmertemperatur während 30 min gerührt, um eine Vernetzung zu bewirken.

Das Harz wird in eine Säule transferiert, gründlich mit Wasser gewaschen, und eine 10%ige wässrige Lösung von löslicher Stärke wird bei 50°C mit einer Raumgeschwindigkeit von 1,0 durchfliessen gelassen. Die Glukosekonzentration in der ausfliessenden Flüssigkeit beträgt 85 g/l am dritten Tag und 83 g/l am 10. Tag.

Danach nach 50 tägigem Durchfluss wird die Glucosekonzentration etwas reduziert auf 80 g/l, jedoch wurde keine merkliche Kontamination mit infektiösen Mikroben beobachtet. Anschliessend wird das Harz aus der Säule ausgestossen und dann wird 0,5 N Schwefelsäure, enthaltend 0,5 M Natriumchlorid zum Harz zugegeben. Die Mischung wird während 2 h auf 70°C erwärmt. Das Harz wird gewaschen und die Wiederfixierung wird in der gleichen Weise wie bei einem neuen Harz durchgeführt. Das erhaltene Harz wird in eine Säule transferiert und eine 10%ige wässrige Lösung von löslicher Stärke wird durch die Säule mit dem insolubilierten Enzym mit einer Raumgeschwindigkeit von 1,0 bei einer Temperatur von 50°C durchfliessen gelassen. Die Glucosekonzentration in der ausfliessenden-Flüssigkeit beträgt am dritten Tag 85 g/l und am 10 Tag 83 g/l.

Als Kontrolle wurde die oben beschriebene Fixierungsoperation unter Verwendung von «Duolite» A7-Harz wiederholt. Das erhaltene, enzymgebundene Harz wird in eine Säule gefüllt und eine 10%ige wässrige Lösung von löslicher Stärke wird mit einer Raumgeschwindigkeit von 1,0 bei 50°C durchfliessen gelassen. Die Glucosekonzentration in der ausfliessenden Flüssigkeit beträgt am dritten Tag 80 g/l und am zehnten Tag 78 g/l. Am zwanzigsten Tag vermindert sie sich auf 40 g/l. Anschliessend wird die Regeneration und Wiederfixierung in gleicher Weise wie in den obenbeschriebenen Beispielen durchgeführt. Die Glucosekonzentration in der ausfliessenden Flüssigkeit zeigte bei der Wiederfixierung eines Enzyms keine befriedigenden Resultate für die Wiederverwendung; d.h. 30 g/l am dritten Tag und 25 g/l am

zehnten Tag. Im weiteren wird ein enzymgebundenes «Duolite» A7-Harz in gleicher Weise wie vorstehend beschrieben hergestellt, und eine 10%ige wässrige Lösung von löslicher Stärke wird mit einer Raumgeschwindigkeit von 1,0 bei 40°C durchfliessen gelassen. In diesem Fall wächst die Kontamination mit infektiösen Mikroben graduell, und die Glucosekonzentration wird von 75 g/l am dritten Tag auf 60 g/l am zehnten Tag reduziert. Ähnliche Resultate werden bei der Verwendung von «Imac» A20SU-Harz anstelle von «Duolite» A7-Harz im gleichen Verfahren und unter den gleichen Bedingungen wie oben, erhalten.

Im weiteren wird ein Vergleich einer Fixierungsmethode gemacht unter Verwendung eines «Duolite» A7-Harzes, jedoch nicht unter Verwendung von Glutaraldehyd. Dabei werden 10 ml «Duolite» A7-Harz mit 20 ml Glucoamylaselösung gemischt, mit einer Konzentration von 14 mg/ml als Protein, hergestellt unter Verwendung eines 0,1 M Acetatpufferlösung (pH-Wert 4,5). Die Mischung wird bei 37°C während 16 h geschüttelt, um die Fixierung des Enzyms zu erwirken, wobei 23 mg Protein adsorbiert wird. Je 5 ml Harz werden in zwei Säulen gefüllt und gewaschen und eine 10%ige wasserlösliche Stärkelösung wird durch jede der Säulen mit dem unlöslichen Enzym mit einer Fliessgeschwindigkeit von 1,0 durchfliessengelassen. Eine Säule wird auf eine Temperatur von 50°C gehalten (Experiment A) und die andere bei 40°C (Experiment B). Im Falle des Experimentes A beträgt die Glukosekonzentration in der ausfliessenden Flüssigkeit 78 g/l am dritten Tag und 65 g/l am zehnten Tag, was einen grossen Abfall der Enzymaktivität darstellt. Beim Experiment B wird die Glucosekonzentration auf 73 g/l am dritten Tag und auf 58 g/l am zehnten Tag reduziert, wobei ebenfalls eine Kontamination mit infektiösen Mikroben beobachtet wird.

Die Regeneration und Wiederfixierung wird durchgeführt unter Verwendung der beiden Träger in den beiden Experimenten A und B. Die Regenerierungsbedingungen sind ein Verfahren zur Erwärmung des verwendeten Harzes in 0,5 N Schwefelsäure, enthaltend 0,5 M Natriumchlorid bei 70°C (Experimente A-1 und B-1) und ein Verfahren zur Erwärmung des gebrauchten Harzes in 4 N Natriumhydroxid bei 60°C (Experimente A-2 und B-2). Die regenerierten Harze werden in gleicher Weise wie bei der ersten Fixierung wiederfixiert. Die Anteile des adsorbierten Proteins sind 10 mg in A-1, 10 mg in B-1, 15 mg in A-2 und 13 mg in B-2, womit die Adsorptionsfähigkeit im Vergleich mit dem ersten mal reduziert wird. Bei der Abfüllung der Harze in Säulen und den Durchfluss einer 10%igen wasserlöslichen Stärkelösung bei 40°C und einer Raumgeschwindigkeit von 1,0, betragen die Konzentrationen von Glucose in der ausfliessenden Flüssigkeit bloss 20 mg/ml in A-1, 18 mg/ml in B-1, 25 mg/ml in A-2 bzw. 20 mg/ml in B-2 am dritten Tag.

Beispiel 5

Das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 wird mit der Ausnahme wiederholt, dass «Lewatit» MP500A anstelle von «Imac» A20S eingesetzt wird, wobei nahezu das gleiche Resultat erhalten wird.