

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149312 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

- (21) Patentansøgning nr.: 3893/76
(22) Indleveringsdag: 27 aug 1976
(41) Alm. tilgængelig: 01 mar 1977
(44) Fremlagt: 28 apr 1986
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 29 aug 1975 US 609077

(51) Int.Cl.º: C 12 N 11/00

- (71) Ansøger: *AMERACE CORPORATION; New York, US.
(72) Opfinder: Bruce S. *Goldberg; US.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

- (54) Immobiliserede proteinagtige præparater, fremgangsmåde til fremstilling af sådanne samt anvendelse af sådanne præparater

DK 149312 B

Den foreliggende opfindelse angår et proteinagtigt præparat og en fremgangsmåde til fremstilling heraf. Den proteinagtige forbindelse i præparatet er fortrinsvis et katalytisk aktivt enzym. Andre proteinagtige stoffer som antistoffer eller antigener kan dog også anvendes.

Som det er veldokumenteret, er enzymer proteinagtige forbindelser, generelt med høj molekylvægt, der virker som biologiske katalysatorer, der er i stand til at fremme en lang række kemiske reaktioner, eksempelvis reagerer glucose med enzymet glucose-isomerase til fremstilling af fructose. Uheldigvis er de fleste enzymer opløselige i vand, hvilket gør det vanskeligt at fjerne dem fra opløsningen for gentagen brug og/eller vedligeholde deres katalytiske virkning over lang tid. Desuden er enzymer hyppigt temmelig kostbare at fremstille i kommercielle mængder. Som følge deraf er mange teknikker blevet foreslået til at immobilisere enzymer og gøre dem uopløselige, og det gøres typisk ved at binde eller koble dem til et uopløseligt bærestof. Udtrykket "immobil" eller "immobiliseret" betyder, når det anvendes på enzymer, at det drejer sig om enzymer, der i det væsentlige er blevet gjort vanduopløselige ved binding til eller indkapsling i en vanduopløselig bærer på en sådan måde, at de bibeholder deres virkning og let kan fjernes fra den reaktive opløsning og kan anvendes igen.

Tidligere forsøg på at udføre katalytiske reaktioner under anvendelse af immobiliserede enzymer har haft mere eller mindre held, afhængigt af den koblings- eller bindingsmetode, der er anvendt til at koble eller binde enzymet til den uopløselige bærer, arten af, samt fysiske og kemiske egenskaber af selve bærestoffet og endvidere den massetransportmekanisme ved hvilken et substrat brin-

ges i kontakt med enzyrbærestoffet. Udtrykket "substrat" anvendes heri til at angive et stof, hvorpå enzymet reagerer katalytisk.

5 For eksempel har man adsorberet enzymer på siliciumholdige bærestoffer, såsom porøse glaskugler, se USA-patentskrift nr. 3 556 945, eller man har kemisk koblet enzymerne til sådanne porøse glaskugler ved et silankoblingsmiddel (USA-patentskrift nr. 3 519 538). Porøse keramiske kugler har været foreslået i stedet for glas, hvor enzymet påkobles via adsorption (USA-patentskrift nr. 3 850 751).
10 Da imidlertid de før nævnte porøse glaskugler eller keramiske kugler er meget små af størrelse, er det nødvendigt for at udføre en enzymatiske reaktion at lade substratet strømme igennem et pakket leje af mange sådanne diskrete partikler. En reaktor med et fast enzymleje er dyr, kan nemt stoppe til eller danne kanaler, har relativ stor strømningsmodstand og har tendens til at tilbageholde substratet i porerne på grund af sidstnævntes relativt lille størrelse, hvilket således giver et forureningsproblem,
15 når en række forskellige substrater eller prøver ledes igennem det pakkede leje, og når enzymreaktionen er en relativt hurtig reaktion.

Som tidligere rapporteret i litteraturen (USA-patentskrift nr. 3 824 150) har enzymer ligeledes været immobiliseret ved
25 mekanisk indeslutning i en semi-permeabel bærer, såsom en membran, eller ved kemisk kobling igennem et mellemprodukt til naturlige eller syntetiske polymere stoffer omfattende cellulosematerialer i form af filterpapir. I membranreaktoren eller den mekaniske indesluttende reaktor sker den enzymatiske reaktion kun ved diffusion af
30 substratopløsningen gennem bæreren, og endvidere giver anvendelsen af sådanne bærere ofte ikke nogen ekstra stabilitet for enzymet. Anvendelse af cellulosefilterpapir og lignende organiske bærestoffer, der har enzymer koblet

dertil eller på anden vis bundet til bæreren, lider af de ulemper, der er indbygget, når man anvender sådanne stoffer, idet disse sædvanligvis er skøre og er følsomme over for kemiske og mikrobielle angreb og ikke uden videre kan steriliseres uden at blive ødelagt.

Endvidere er det kendt at anvende et vandopløseligt polymert overtræk, der har nitrilo, syre-amido eller ureidogrupper til en enkelt fase makroporøs polymer bærer, og dernæst koble enzymerne ved adsorption til den overtrukne overflade af en sådan bærer (USA-patentskrift nr. 3 705 084). Fremstilling af sådanne overtrukne reaktorer er imidlertid tidskrævende og dyr. Endvidere er mængden af enzymer, der kan fæstes til en volumenenhed af den fremkomne reaktor, begrænset af det faktum, at bæreren er makroporøs.

Det er nu formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe et immobiliseret proteinagtigt præparat, fortrinsvis enzympræparat og en fremgangsmåde til fremstilling af samme, hvilket præparat ikke nedbrydes biologisk og er kemisk modstandsdygtigt. Det har endvidere et stort overfladeareal, høj permeabilitet, glimrende fysiske styrkeegenskaber, kan nemt steriliseres, og det er sidst men ikke mindst billigt at fremstille.

Det immobiliserede proteinagtige præparat er ifølge opfindelsen ejendommeligt ved, at det består af en mikroporøs bærer omfattende en binder af polyvinylchlorid eller hård gummi og en mængde findelte siliciumdioxidholdige partikler dispergeret i binderen og en proteinagtig forbindelse bundet til i det mindste nogle af de siliciumdioxidholdige partikler dispergeret i binderen, hvorhos den mikroporøse bærer omfatter et netværk af i det væsentlige forbundne mikroporer, hvis størrelsesfordeling ligger fra $0,01\mu$ til 100μ bestemt ved kviksølvintrusionsmetoden.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af ovennævnte præparat er ejendommelig ved, at den prote-
inagtige forbindelse kemisk bindes til i det mindste
5 nogle af de dispergerede siliciumdioxidholdige partik-
ler i den mikroporøse bærer omfattende en binder af po-
lyvinylchlorid eller hård gummi og en mængde findelte
siliciumdioxidholdige partikler dispergeret i binderen,
hvorhos den mikroporøse bærer omfatter et netværk af i
10 det væsentlige forbundne mikroporer, hvis størrelses-
fordeling ligger fra $0,01\mu$ til 100μ bestemt ved kvik-
sølvintrusionsmetoden.

Det mikroporøse materiale, som er særligt egnet og der-
for særligt foretrukket til anvendelse som immobilise-
ret enzyrbærer er beskrevet i USA-patentskrift nr.
15 3 862 030. Som det fremgår af nævnte patent, består så-
danne mikroporøse materialer af polyvinylchlorid og
findelte hydrofile fyldstofpartikler af siliciumdioxid,
dispergeret i formstofmatrixen, og af et netværk af
forbundne mikroporer dannet i materialet. Netværket
20 af forbundne mikroporer består af mikroporer dannet
mellem nabopartikler af det dispergerede uorganiske
fyldstof, mellem partikler af dispergeret fyldstof
og formstofmatrix og i selve formstofmatrixen
med en størrelsesfordeling, der ligger fra $0,01\mu$
25 til 100μ , hvor middelporediameteren af mikroporerne ty-
pisk er ca. $0,1\mu$ - $0,2\mu$, hvilket bestemmes porøsimetrisk
ved kviksølvintrusionsmetoden. Endvidere er den totale
porøsitet i et sådant materiale typisk af størrelsesorde-
nen 50 - 70%. Sådanne mikroporøse materialer har været
30 anvendt tidligere, f.eks. ved fremstilling af batterise-
paratorer som beskrevet i USA-patentskrift nr. 3 696 061
eller for nylig som filtermedium beskrevet i USA-patent-
skrift nr. 3 862 030.

I stedet for en termoplastisk binder beskrevet i nævnte
35 patentskrift kan syntetiske eller naturlige termohærdende
gummipolymere eller copolymere deraf anvendes som binder.

Hvis det mikroporøse materiale dannes af en gummiagtig polymer, blandes sidstnævnte med tilsætningsmidler, såsom antidegraderingsmidler, tværbindingmidler, inerte fyldstoffer eller lignende, der normalt anvendes af fagmanden ved fremstilling af termohærdende forbindelser, grundigt under anvendelse af kendte metoder med et fyldstof, såsom silicahydrogel eller udfældet hydratiseret siliciumoxid, f.eks. kiseltsyre ($n \text{SiO}_2 \cdot m \text{H}_2\text{O}$), hvor n og m er hele tal, og hvor sidstnævnte er kommercielt tilgængelig, f.eks. under handelsnavnet Hi-Sil fra PPG Industries. Den fremkomne forbindelse formes derefter til folie, fortrinsvis ved kalendrering på en egnet bærer, f.eks. papir eller en tynd metalfolie eller en perforeret folie, vindes op på spoler af passende størrelse og vulkaniseres herefter under hydrostatiske betingelser i en dampautoklav til en passende vulkaniseringsgrad under anvendelse af overtryksdamp som varmekilde. Den vulkaniserede folie tørres i varm tør luft, som også tjener til at dehydratisere siliciumoxiden. En sådan dehydratisering medfører dannelse af mikroporer i folien forårsaget ved sammenskrumpning af siliciumoxiden, hvorved der dannes en normal hydrofil mikroporøs artikel.

I den endelige udførelse består en typisk termohærdet gummilignende polymerbaseret mikroporøs folie af 1 del gummi-polymer og ca. 0,5 dele siliciumoxid pr. vægt og har en volumenporøsitet på 60%. Porestørrelsesfordelingen er typisk temmelig stor og varierer fra ca. 0,05 til 10/ μ for de fleste, hvor middelporestørrelsen typisk er 1,4/ μ . Sådanne termohærdede gummilignende polymerfolier er normalt hydrofile, og vand suges hurtigt ind i materialet og løber igennem uden at påføre tryk, hvilket indikerer, at mikroporerne i det væsentlige er bundet sammen. Sådanne folier og fremgangsmåden til fremstilling af disse er kendt.

Fyldstofpartikler af siliciumdioxid dispergeret i binderen eller i matrixen af det mikroporøse materiale anvendes som de aktive steder, hvortil enzymerne kobles. På grund af den porøse opbygning og dispergering af fyldstofpartiklerne i

5 matrixen eller binderen har sådanne mikroporøse materialer en temmelig stor overflade, typisk af størrelsesordenen $80 \text{ m}^2/\text{g}$, og antallet af tilgængelige enzymkoblingssteder er relativt stort, hvilket betyder, at belastningsfaktoren eller den mængde enzymer, der kan kobles pr. volumen

10 enhed af et sådant mikroporøst materiale, er tilsvarende stort. Da fyldstofpartiklerne endvidere omhylles af det tværbundne netværk af forskellige størrelser mikroporer, vil et substrat i form af en flydende eller vandig strøm, der for eksempel strømmer igennem et relativt

15 tyndt lag af mikroporøst materiale, hvortil er koblet enzymer, umiddelbart komme i kontakt eller finde vej til et stort antal enzymsteder, hvorved der tilvejebringes en ekstremt hurtig enzymatisk reaktion og en høj omsætningsgrad af produktet. Hvis således reaktionsvirkningsgraden af enzymet er relativt høj, kan folien laves temmelig tynd, og en i det væsentlige fuldstændig reaktion kan foregå næsten momentant ved passage af substratet igennem folien. På lignende måde nødvendiggør et mindre reaktivt enzym en lidt tykkere folie og lidt længere reaktionstid for at få en næsten fuldstændig omdannelse.

20 På grund af den høje porøsitet og den hydrofile natur af de dispergerede fyldstofkonstituenten befugtes det mikroporøse materiale let og er temmelig permeabelt for væsker, der strømmer igennem. Der kræves således et reelt lavt hydraulisk tryk for at lede substratet igennem materialet. Som anført i førnævnte patentskrift nr. 3 862 030 har man opnået gennemstrømningshastigheder på $17 \text{ liter}/\text{m}^2/\text{min}$. - $375 \text{ liter}/\text{m}^2/\text{min}$. igennem folier med det foretrukne mikroporøse materiale, der har en tykkelse på $0,5 \text{ mm}$ under en trykgradient på $0,7 \text{ kg}/\text{cm}^2$ og med et fyldstof/binderforhold af størrelsesordenen $1/1 - 2/1$. Generelt vil en

35

forøgelse af fyldstof til binderforholdet føre til en forøget permeabilitet i materialet. Som følge heraf er den immobiliserede enzytbærer ifølge opfindelsen særlig egnet til anvendelse i form af en såkaldt gennemstrømningsreaktorkerne, dvs. en reaktorkerne, hvori substratopløsningen gennemtrænger en overflade af det enzymholdige materiale, hvorved det katalytisk omsættes ved enzymet, og det omdannede produkt samt uomsat substrat går ud gennem den samme eller den anden overflade af materialet.

Opfindelsen angår således også en anvendelse af det immobiliserede proteinagtige præparat ifølge opfindelsen, hvor den proteinagtige forbindelse er et katalytisk aktivt enzym, hvilken anvendelse er ejendommelig ved det i krav 23's kendetegnende del anførte.

Da porestørrelsesfordelingen som nævnt ovenfor af den mikroporøse bærer er relativt bred (fra ca. $0,01\mu$ til ca. 100μ), og da mikroporerne i det væsentlige er bundet sammen, indeholder materialet en lang række kanaler af tilstrækkelig størrelse, hvori både substrat og/eller omdannet produkt nemt kan strømme. Produktudstrømningen fra materialet er således temmelig hurtig og kan afsluttes i det væsentlige samtidig med, at man stopper for tilførselen af substrat igennem bærematerialet. De katalytiske reaktioner, der udføres med de omhandlede enzytbærere, har med andre ord en særdeles skarp afslutning, og som følge deraf kan mange forskellige substrater ledes igennem den samme immobiliserede enzytbærer i hurtig følge efter hinanden uden fare for forurening mellem efterfølgende produkter, hvilket er en umådelig fordel, når immobiliserede enzymer anvendes til at udføre successive katalytiske reaktioner på en række forskellige substrater, som det anvendes i forbindelse med medicinske eller industrielle analytiske instrumenter.

Det førnævnte udgør en betydelig fordel ved den foreliggende opfindelse, da porestørrelsen i andre kendte immo-

biliserede enzymreaktorer, såsom reaktorer med pakket
leje af porøse glaskugler, eller membranreaktorer, er kon-
trolleret til at være ret. ensartet og er af så lille stør-
relse, at massetransporten gennem reaktoren sker ved diffu-
5 sion. I sådanne diffusionsbegrænsede enzymreaktorer kan
den totale udstrømningstid for produktet være betydeligt
efter det tidspunkt, hvor substrattilførselen er afslut-
tet, hvilket giver et forureningsproblem, hvis en efter-
følgende substratprøve ledes til reaktoren for hurtigt.

10 Foruden de foregående fordele har det mikroporøse enzym-
bærestof ifølge opfindelsen særdeles gode styrkeegenska-
ber og har typisk en trækstyrke på ca. 28 kg/cm² og en
forlængelse på under 20% og kan således håndteres nemt
under de forskellige behandlingstrin, der er nødvendige
15 for at binde eller knytte enzymet til bæreren, som det
vil blive forklaret i detaljer nærmere nedenfor. På grund
af den særdeles gode dimensionsstabilitet og styrke kan
det mikroporøse materiale modstå sammenpresning under hy-
draulisk tryk og er derfor særlig egnet til anvend-
20 else i stor skala i massefremstillingsreaktorer, hvor
store enzymreaktionsområder skal anvendes, og hvor
store dynamiske kræfter udøves på enzytbæreren, såsom
f.eks. i kommercielle industrielle eller kemiske
processer, hvor der anvendes enzymreaktioner. Desuden
25 er det mikroporøse materiale modstandsdygtigt over for
angreb af kemikalier, såsom syrer og alkoholer, og
f.eks. er det i stand til at udsættes for høje tempe-
raturer, uden at de fysiske egenskaber påvirkes. Hvad an-
går sidstnævnte, har det vist sig muligt f.eks. at varme-
30 sterilisere det foretrukne mikroporøse materiale ved at
udsætte det for en dampstrøm ved ca. 1 ato og 115 °C i
30 minutter, uden at den dimensionelle stabilitet eller
de fysiske egenskaber af materialet er blevet ødelagt.

Som fuldstændigt beskrevet i det førnævnte patentskrift kan
35 det særligt foretrukne mikroporøse materiale fremstilles ved
at blande passende mængder af et findelt polyvinylchlorid-
formstof, et findelt siliciumdioxid dannende fyldstof, et
opløsningsmiddel (f.eks. cyclohexanon) og et ikke-opløs-

ningsmiddel (f.eks. vand) under betingelser med lave forskydningsspændinger til dannelse af et stabilt, fugtigt og fritflydende pulver. Pulverblandingen kan herefter ekstruderes og kalandreres fortrinsvis til dannelse af en i det væsentlige plan struktur eller folie af de ønskede dimensioner, der herefter kan ledes gennem et vandigt bad til at udvaske opløsningsmidlet, hvorefter den føres gennem en luftopvarmet ovn til fjernelse af alle spor af fugtighed.

10 Den fremkomne artikel i form af en mikroporøs, dimensionelt stabil, halvstiv, uopløselig, flydende permeabel bærer behandles herefter på en sådan måde, at den proteinagtige forbindelse især enzymet kobles eller bindes.

15 Som det er generelt kendt, er det muligt at binde eller knytte enzymer til en uopløselig bærer ved direkte at adsorbere enzymet på bærestoffet eller ved indirekte adsorption eller kovalent binding af enzymet til bærestoffet igennem et mellem-koblingsmiddel. Primært på grund af den dispergerede siliciumdioxid-fyldstofkomponent har man 20 fundet, at den mikroporøse bærer ifølge opfindelsen har en netto negativ ladning, hvilket ses ved en væsentlig adsorption af proteiner ved pH-værdier under det isoelektriske punkt for det adsorbere protein. Selvom en direkte adsorption af enzymer til det dispergerede fyldstofmateriale er mulig, har det vist sig, at den adsorptive interaktion (direkte) er utilstrækkelig til at 25 hindre en relativt hurtig desorption under anvendelsen og medfølgende tab af enzymaktivitet fra enzympræparatet.

30 Ved udøvelsen af opfindelsen foretrækkes det derfor, at det mikroporøse materiale behandles på en sådan måde, at der opnås en kemisk binding mellem det katalytisk aktive enzym og det uopløselige mikroporøse bærestof. I ubehandlet tilstand mangler det mikroporøse materiale den orga-

niske funktion, der er nødvendig for at udvirke den kemiske binding til det proteinagtige materiale, og derfor kan enhver kendt teknik til at give den påkrævende funktionalitet til det mikroporøse materiale anvendes.

5 De fleste kendte enzymer kan immobiliseres ved kovalent kobling eller tværbinding af fri aminogrupe på enzymmolekylet, som ikke er væsentlige for den enzymatiske virkning af enzymet, til bærestoffets overflade indeholdende alifatiske primære eller sekundære amino- eller

10 hydroxylgrupper eller -rester. Andre kendte enzymer kan herudover kovalent kobles eller tværbindes til bærestoffets overflade på lignende måde via andre funktionelle grupper, såsom carboxyl, isonitril, aldehyd eller ketongruppen, eller via en anion for at nævne nogle få.

15 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 9 og især i krav 10 anførte. Her tilføres det mikroporøse udgangsmateriale en organisk funktionel gruppe især en alifatisk primær aminfunktion ved kovalent at binde direkte til de dispergerede fyldstofpartikler i det

20 mikroporøse materiale, et tværbindende middel fortrinsvis i form af en organosilan, såsom gamma-aminopropyltriethoxysilan. En alternativ foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 16 og især krav 17 anførte. Her

25 tilføres det mikroporøse materiale et mellemkoblingsmiddel fortrinsvis i form af en makromolekylær polyelektrolyt såsom polyethylenimin (PEI) ved irreversibel kemisk adsorption direkte til de dispergerede fyld-

30 stofpartikler i det mikroporøse materiale. Enzymer kan

herefter kovalent bindes eller tværbindes til det kemisk modificerede mikroporøse materiale og mere specielt til de alifatiske primære amingrupper, der er tilført overfladematerialet ved hjælp af førnævnte tværbindingsmidler.

Når eksempelvis et tværbindingsmiddel, såsom gamma-aminopropyltriethoxysilan anvendes, mener man som nævnt, at sidstnævnte er bundet kovalent direkte til de hydrofile uorganiske fyldstofpartikler dispergeret i det polymere bindemiddel, som udgør det mikroporøse materiale. Alment er anvendelsen af en silan som tværbindende middel for at binde eller knytte enzymer til siliciumoxidholdige materialer kendt og er f.eks. beskrevet i førnævnte USA-patentskrift nr. 3 519 583. Når der anvendes et tværbindingsmiddel, såsom polyethylenimin, mener man, at sidstnævnte er knyttet eller bundet til de dispergerede hydrofile uorganiske fyldstofbestanddele i det mikroporøse materiale via stærke kemiske adsorptive kræfter. Generelt er anvendelsen af en makromolekylær polyelektrolyt eller polyamin som tværbindingsmiddel for at binde eller knytte enzymer til overfladen af kolloide partikler af siliciumoxid eller til fibrøs cellulose kendt og er beskrevet f.eks. i USA patentskrifterne nr. 3 796 634 og 3 741 871.

I begge tilfælde tværbindes enzymet fortrinsvis til tværbindingsmidlet ved hjælp af et bifunktionelt elektrofilt stof, såsom glutaraldehyd eller bisimidatestre til frembringelse af den ønskede kovalente binding af enzymet til de funktionelle amingrupper, der er tilført de eksterne overflader af de hydrofile fyldstofpartikler dispergeret i den mikroporøse bærer via tværbindingsmidlet.

Når der anvendes et adsorptivt tværbindingsmiddel i form af førnævnte polyethylenimin eller et tværbindingsmiddel, der kovalent bindes til bærerens overflade, såsom førnævnte gamma-aminopropylethoxysilan, kan den kovalente binding mellem enzym og bærestof udføres i et enkelt eller i to trin. Når den udføres i et enkelt trin, behandles det kemisk modificerede bærestof på én gang med et bifunktionelt elektrofilt middel og enzymet for at opnå den samtidige intermolekulære tværbinding af den bærestof-overfladereaktive polymer og enzymet. Kommercielle renhedsgrader af glutaraldehyd, der er et typisk bifunktionelt middel som nævnt ovenfor, indeholder betydelige mængder af opløselige polymere forbindelser dannet ved intermolekulære aldolkondensationer af det monomere dialdehyd, og derfor vil hvert kondensationssted føre til en særdeles reaktiv alfa-beta umættet aldehyddel, der hurtigt vil undergå additionsreaktioner af Michael-typen, der involverer nucleophiler, såsom alifatiske aminer eller andre restgrupper, der forekommer på overfladen af enzymerne. Desuden kan frie alifatiske aldehydgrupper, der er til stede på den reaktive polymers overflade, også deltage i tværbindingsreaktionerne ved kombination med alifatiske aminogru-
per i bæreren eller i enzymet til dannelselse af Schiff-baser. Selv om den grad med hvilken en ønsket kovalent konjugering af enzymerne konkurrerer med uønskede uproductive reaktioner, der fører til en simpel proteinmodifikation og tværbinding af bærestofoverfladen, kan bestemmes empirisk ved at variere forsøgsbetingelserne, såsom pH, proteinkoncentration og koncentration af tværbindingsmiddel, er det vanskeligt selektivt at kontrollere disse uønskede, konkurrerende reaktioner, da det bifunktionelle tværbindingsmiddel altid er til stede i et væsentligt molært overskud under reaktionen. I visse tilfælde kan enkelttrins-metoden derfor føre til en delvis eller total enzyminaktivering på grund af for vidtgående kemiske modifikationer af enzymet eller til kemiske modifikationer af de væsentlige aktive steder.

I de situationer, hvor kemiske modifikationer fører til udbredt enzyminaktivering, anbefales totrinsmetoden, hvori den kemisk modificerede bærer først tværbindes med det bifunktionelle middel og herefter inkuberes med enzymet.

5 Ved at anvende en passende høj koncentration af tværbindingsmiddel kan de bimolekylære reaktioner blive udkonkurrerende for overflade-aminogrupeerne i forhold til intermolekylære reaktioner, såsom tværbinding. Dette fører til en stor overfladetæthed af grupper, der er i

10 stand til at reagere med de nucleophile sidekæder i enzymerne. Efter fjernelse af overskud af uomsat tværbindingsmiddel kan det pågældende enzym herefter inkuberes med den modificerede bærer, og dette fører til en kovalent konjugation af enzymet og bærer. De to trin har vist

15 sig at føre til en minimal modifikation af enzymet, idet kun grupper i nærheden af kontaktområdet mellem enzym og bærestof berøres.

Det er klart, at andre metoder inden for kemien end anvendelsen af elektrofile bifunktionelle reagenser

20 kan bruges til kovalent at binde enzymer til de organiske funktionelle grupper på de siliciumdioxidholdige partikler i bærestofferne. Sådanne alternativer kan f.eks. være acylering af den alifatiske aminogruppe på den reaktive bærestof overflade med ravsyreanhydrid til

25 opnåelse af en tilsvarende alifatisk carboxylgruppe, der herefter omsættes med enzymernes nucleophile sidekædegrupper i nærværelse af et vandopløseligt carbodiimid. Direkte reaktion mellem aminogruppen på bærestoffets reaktive overflade og sidekæde-carboxylgrupper i enzy-

30 merne i nærværelse af et vandopløseligt carbodiimid; acylering af aminogruppen på den reaktive overflade med p-nitrobenzoylchlorid, reduktion af arylnitro til arylamin via natriumdithionit, oxidation af arylaminogruppen til et aryldiazoniumsalt via salpetersyring og påfølg-

ende omsætning med en aromatisk sidekædegruppe i proteinerne til dannelsen af en stabil azobinding; acylering af aminogruppen på bærestofoverfladen med terephthaloylchlorid, omsætning af det tilsvarende p-benzoylsyrehalogenid med hydrazid til et benzoylazid og påfølgende omsætning med enzymernes nucleophile sidekædegrupper.

Når enzymet omsættes med den kemisk modificerede bærer, forefindes enzymet fortrinsvis i en pufferopløsning, og reaktionen udføres ved en temperatur, der er tilstrækkelig lav til at undgå deaktivering af enzymet eller en væsentlig ændring af sidstnævntes tilstand. Generelt ligger temperaturen på ca. 5 til ca. 50 °C. Som det er kendt inden for enzym-videnskaben, kan pH af enzymreaktionsopløsningen kontrolleres til et ønsket niveau ved at vælge egnede puffer, afhængigt af det særlige enzym, der anvendes. På lignende måde kan koncentrationen af enzym i den pufrede, reaktive opløsning, og dermed den udstrækning med hvilken den kemisk modificerede bærer vil blive fyldt med enzymer, vælges afhængigt af enzymets omdannelseshastighed, substratkoncentration og strømningshastigheden for substratet gennem reaktorkernen.

Opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler, hvor eksempel 1-3 omhandler fremstillingen af bæreren (udgangsmaterialet).

25 EKSEMPEL 1

Fremstilling af ubehandlet enzytbærer

En plade af mikroporøst materiale behandlede ved først at blande 9,1 kg Conoco ^(B) 5385 et polyvinylchloridformstof med en partikelstørrelse på ca. 80 mesh og 18,2 kg Hi Sil 233, et udfældet hydratiseret silica, i en Patterson Kelley-blandemaskine med lille forskydningsspænding til blanding af væsker og faststof i ca. 3 minutter. Heref-

ter tilsattes under omrøring 24,8 kg opløsningsmiddel (cyclohexanon) i løbet af 20 minutter ved hjælp af en pumpe. 26,8 kg vand blev tilsat til blandingen, og der omrørtes i yderligere 20 minutter til dannelse af et

5 fugtigt, stabilt, fritflydende pulver. Dette blev indført i en skrue-extruder med en cylindertemperatur på ca. 49 °C, og ekstrudatet ledtes igennem et par kalandre-ringsvalser til opnåelse af en i det væsentlige flad plade med en tykkelse på 0,5 mm. Pladen ledtes gennem et

10 ekstraktionsbad af vand ved 77 °C, og herefter tørredes det i en tørreovn ved ca. 110 °C i 6 minutter. Den færdige mikroporøse plade havde en relativ bred porestørrelsesfordeling, nemlig fra 0,01 til ca. 100 μ , og en middelporediameter på ca. 0,15 μ - 0,25 μ bestemt ved

15 kviksølvintrusions-metoden. Desuden var den totale porøsitet af materialet ca. 65 volumen-%, og den dispergerede fyldstofkomponent udgjorde ca. 56 vægt-%. Vand blev hurtigt opsuget i materialet uden at anvende tryk, hvilket viser, at mikroporerne i det væsentlige er forbundet

20 fra overflade til overflade. Ud fra den færdige, i det væsentlige flade, halvstive, mikroporøse plade blev udskåret en lang række ubehandlede bærere med en størrelse på 5 x 5 cm. Disse varmesteriliseredes ved neddykning i et dampbad i 1 time, hvorefter de fik lov at afkøle og

25 tørredes i fri luft.

EKSEMPEL 2

Kemisk modificering ved kovalent binding

En ubehandlet bærer fremstilledes som i eksempel 1 inkuberedes i en 10% vol./vol. vandig opløsning af gamma-aminopropyltriethoxysilan indeholdende 1% (vol./vol.) koncentreret saltsyre i 24 timer. Den behandlede bærer vaskedes med vand og 1M natriumchlorid for at fjerne uom-

30 satte reaktanter. Tilstedeværelsen af alifatiske primære aminogrupper blev herefter kvalitativt undersøgt ved at

omsætte den behandlede bærer med 0,5% (vægt/volumen) trinitrobenzensulfonsyre i 0,1M natriumtetraboratpuffer ved 21 °C, og der kunne observeres et stærkt orangefavret trinitrophenylaminderivat ved overfladen af den behandlede bærer. En anden ubehandlet bærer fremstillet som i eksempel 1 blev undersøgt på samme måde, men viste ingen reaktion overfor denne prøve. Grundstofanalyse af den behandlede bærer gav 0,5% nitrogen på tørstofbasis mere end i den ubehandlede bærer. Stabiliteten af aminofunktionen i den behandlede bærer konstateredes ved et meget ringe nitrogentab efter lagring i vand i en periode på 12 måneder. Den behandlede bærer havde samme strømningsegenskaber som den ubehandlede bærer og var ikke følsom over for forskelle i typen af puffere eller ionstyrke.

15 EKSEMPEL 3

Kemisk modificering ved kemisk adsorption

En anden ubehandlet bærer fremstillet som i eksempel 1 inkuberedes i en 5% (vægt/volumen) vandig opløsning af en forgrenet polyethylenimin (PEI) med molvægt på 50 000 ved stuetemperatur i en time. Den behandlede bærer blev skyllet med vand og 1M natriumchlorid for at fjerne spor af ikke-absorberet PEI. Der blev udført den samme analyse med trinitrobenzensulfonsyre som i eksempel 2, og et stærkt orangefarvet trinitrophenylaminderivat kunne observeres på overfladen af den behandlede bærer, hvilket viste tilstedeværelsen af den alifatisk aminofunktion. Nitrogenoptagelsen på den behandlede bærer blev bestemt ved grundstofanalyse, og indholdet var 1,25% nitrogen på tørvægtsbasis imod 0,2% nitrogen på tørvægtsbasis i den ubehandlede bærer. Den kemiske adsorption af PEI på den behandlede bærer synes fuldstændigt irreversibel, idet stoffet ikke kunne fjernes ved inkubering med opløsninger med høj ionstyrke (f.eks. 1M natriumchlorid eller 1M $K_2 HPO_4 / KH_2 PO_4$) ved pH-værdier mellem 3 og 9. Kun ved

stærkt sure betingelser (inkubering i 1M saltsyre i 2 timer) var der en delvis desorption svarende til 50% af nitrogenindholdet bestemt ved grundstofanalyse. Overfladearealet af den behandlede bærer ved standard BET-metoden var 55,4 m²/g imod 81,1 m²/g for kontrolprøven. Bæreren behandlet med PEI havde samme strømningsegenskaber som den ubehandlede bærer, uanset hvilken puffer eller ionstyrke der anvendtes.

EKSEMPEL 4

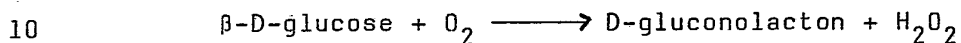
10 Enzymkoblingsreaktion (glucoseoxidase)

Bæreren behandlet som i eksempel 3 inkuberedes en time i en 10% (volumen/volumen) vandig opløsning af glutaraldehyd ved pH 7. Bæreren rensedes med vand og inkuberedes en time i en opløsning af glucoseoxidase, der var rensed fra *Aspergillus niger*. Betingelserne ved enzymkoblingsreaktionen var følgende: Glucoseoxidasekoncentration 20 mg/ml i 0,1M K₂HPO₄/KH₂PO₄ -puffer ved pH 6,0 ved stuetemperatur. Direkte pumpning af enzymopløsningen igennem bæreren under et positivt hydraulisk tryk forbedrede ikke enzymoptagelsen i forhold til det, der kunne opnås ved simpel inkubering. Temperaturen ved koblingsreaktionen synes ikke at være kritisk, dog må den ikke overskride den termiske inaktiveringstærskel på 50 °C for glucoseoxidase. Bæreren vaskedes herefter med rigeligt vand og 1M natriumchlorid for at fjerne uomsat enzym. Fjernelse af elektrofile grupper i bærerne blev opnået ved inkubering af det immobiliserede enzymesystem med 0,1M ethanolamin ved pH 7 indeholdende 50 mmol NaCNBH₃. Det immobiliserede enzym synes at kunne lagres i uendelig lang tid, når det lagres ved 4 °C i 0,1M K₂HPO₄-puffer ved pH 6.

EKSEMPEL 5

Enkeltenzymreaktor

Følgende reaktion udførtes ved at anvende et par skiver med en diameter på 1,5 cm fremstillet som i eksempel 4 og anbragt oven på hinanden i en gennemstrømningsreaktor, hvori strømningsvektoren af substratet i det væsentlige var lodret i forhold til hver skives plan. Tværsnittet af hver skive var 79 mm². Glucoseoxidase (E.C.1.1.3.4) katalyserer den aerobe oxidation af glucose.



Enzymaktiviteten i reaktoren blev bestemt ved at måle oxygenfaldet neden for reaktoren med en Biological Oxygen Monitor, Model No. 53, forhandlet af Yellow Springs Instrument Company. En opløsning af 0,15 mmol glucose i anomerisk ligevægt i luft mættet med 0,1M natriumacetatpuffer ved pH 5,5 pumpedes igennem reaktoren med en strømningshastighed på 2 ml/min. Omdannelsen af det begrænsende substrat, β -D-glucose, var kvantitativ udtrykt ved oxygenkoncentrationsnedgangen efter reaktoren. Opholdstiden i reaktoren var ca. 1,6 sekunder. Den integrerede form for hastighedsligning for glucoseoxidase under disse eksperimentelle betingelser er kendt explicit, og det kan beregnes, at den nedre grænse for den immobiliserede enzymkoncentration er 10 mg/ml. Den usædvanlige høje aktivitet i denne reaktor skyldes, at der ikke findes interne massetransportvirkninger, dvs. man kunne ikke observere nogen tegn på begrænsning af massetransporten i denne reaktor.

30 Et andet sæt stablede skiver blev fremstillet som i eksempel 4 og anbragt i en gennemstrømningsreaktor. Skiverne blev imidlertid fremstillet med væsentligt reducerede koncentrationer af immobiliseret enzym, dvs. med en faktor

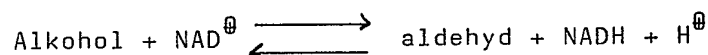
10. En 1 mmol glucoseopløsning i 0,1M natriumacetatpuffer ved pH 5,5 pumpedes igennem denne anden reaktor med en strømningshastighed, der var tilstrækkelig hurtig til, at reaktoren kun virkede således, at man kun fik en partiel
 5 omdannelse af glucose til gluconolacton. Ligevægtsniveauet for substratombdannelsen i reaktoren under disse betingelser fandtes at være meget følsom over for enzymkoncentrationen. Kontinuerlig drift i en periode på 4 timer gav ingen ændring i ligevægtsomdannelsesniveaue, hvilket viser,
 10 at der ikke er noget tab i den enzymatiske virkning fra reaktoren.

EKSEMPEL 6

Enzymkoblingsreaktion (alkoholdehydrogenase)

En anden bærer behandlet som i eksempel 3 inkuberedes en
 15 time i en 10% (volumen/volumen) vandig opløsning af glutaraldehyd ved pH 7. Bæreren rensedes med vand og inkuberedes i en time i en opløsning af alkoholdehydrogenase. Betingelserne ved enzymkoblingsreaktionen var følgende: Alkoholdehydrogenasekoncentration 5 mg/ml i 0,1M K_2HPO_4/KH_2PO_4
 20 puffer ved pH 6,0 indeholdende 0,1 mmol EDTA og 10 μ mol NADH (reduceret nicotinamidadeninucleotid) ved stuetemperatur. Bæreren vaskedes derefter grundigt med reaktionspufferen og 1M natriumchlorid for at fjerne omsat enzym. Ureagerede elektrophile grupper i bæreren blev
 25 blokeret ved inkubering af det immobiliserede enzymesystem med 0,1M ethanolamin ved pH 7,0 indeholdende 50 mmol $NaCNBH_3$. Enzymoptagelsen var 11 mg/g bærer og beregnedes ved at måle forøgelsen i nitrogen på bæreren inden omsætning med ethanolamin.

30 Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1) katalyserer den reversible oxidation af primære alkoholer ifølge ligningen



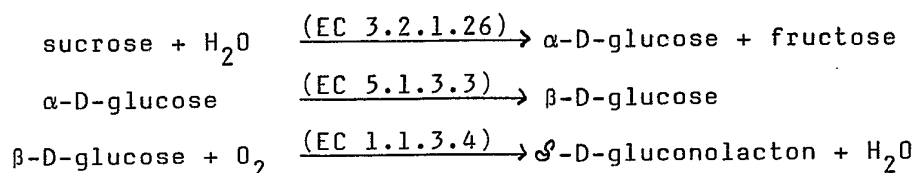
Den enzymatiske aktivitet i reaktoren med de stablede skiver vurderedes ved en spektrofotometrisk måling af dannelsen af NADH[⊖] 340 nm efter reaktoren med en gennemstrømningsmodel af Model UA-5 absorptions monitor, forhandlet af Instrumentation Specialties Co. En enkelt 1,5 cm skive af det immobiliserede enzym anbragtes i gennemstrømningsreaktoren som i eksempel 5. En opløsning af 50 mM ethanol og 0,5 mM NAD[⊖] i 0,1M K₂HPO₄/KH₂PO₄ puffer ved pH 7,4 indeholdende 10, μM EDTA pumpedes igennem reaktoren med en strømningshastighed på 1 ml/min. Den beregnede ligevægtsomdannelse ved omsætningen under disse betingelser er 16% af udgangs NAD[⊖]-koncentrationen. Fuldstændig ligevægt kunne observeres, hvilket viser, at nogle få millisekunders kontakt med det immobiliserede enzym var tilstrækkelig til at opnå reaktionens termodynamiske grænse. For at vise stabiliteten af det immobiliserede enzym valgtes et sæt betingelser, ved hvilke reaktoren blev kørt i 24 timer. Da omdannelsen af substratet til produkter er særdeles følsom over for katalysatoraktiviteten under disse betingelser, betyder en nedgang i omdannelsesniveaueet tab af eller inaktivering af enzymet. Betingelserne under forsøget var 5 mM ethanol og 50, μM NAD[⊖] i 0,1 M K₂HPO₄/KH₂PO₄ puffer ved pH 7,0 indeholdende 10, μM EDTA. Denne opløsning pumpedes igennem reaktoren ved en strømningshastighed på 1 ml/min. i 24 timer under kontinuerlig måling og registrering af omdannet substrat. Forsøget viste, at omdannelsen forblev konstant under denne periode, hvilket viser en fuldstændig bevarelse af det immobiliserede enzymesystem.

30 EKSEMPEL 7

Dobbeltenzymreaktor

Der konstrueredes et reaktorsystem, hvori anbragtes tre forskellige immobiliserede enzympræparater til brug ved

katalyse af reaktionerne vist nedenfor



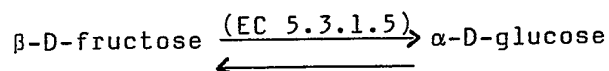
Glucoseoxidasen var homogen og fremstillet ud fra *Aspergillus niger*, aldose-1-epimeraseenzymet (EC 5.1.3.3) blev fremstillet ud fra svinenyrer og var 20% (vægt/vægt) renhed og α -D-fructo-furanoidase (EC 3.2.1.26) var et særdeles rent præparat fra *Candida utilis*. Hver af de førnævnte enzymer var kovalent immobiliserede til et par 1,5 cm skiver som beskrevet i eksempel 4 med en enzymkoncentration på 20 mg/ml. Aldehydhæmningsreaktionen blev ikke anvendt. To sæt af disse tre skiver, hvor hver skive i hvert sæt svarer til en af de tre enzymer i den koblede reaktion og i den viste rækkefølge, blev anbragt i gennemstrømningsreaktoren i eksempel 5 oven på hinanden. En 1 mM opløsning af ultraren sucrose i 0,05 M K_2HPO_4 med pH 6,0, luftmættet ved 25 °C, pumpedes igennem reaktoren med en strømningshastighed på 12 ml/min. Omdannelsen målt ved oxygentabet efter reaktoren var 10% af det teoretiske baseret på den kendte støkiometri for totalreaktionen. Den maksimale omdannelse, der kunne opnås, var imidlertid 25%, da det opløste oxygen er det begrænsende substrat (250 μmol). Under betingelserne anvendt i dette eksempel er aldose-1-epimerase det hastighedsbegrænsende enzym. Ved lavere strømningshastighed og dermed længere reaktionstid i reaktoren nærmede den målte omdannelse sig 25%.

25 EKSEMPEL 8

Immobilisering af glucoseisomerase på mikroporøs bærer

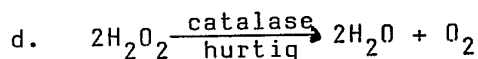
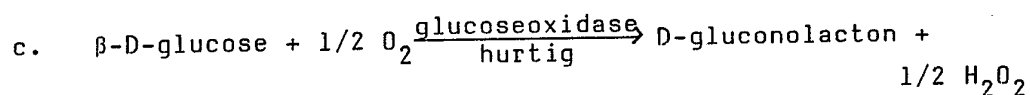
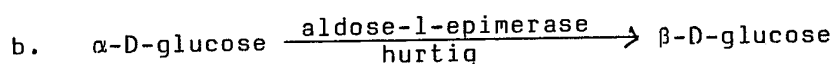
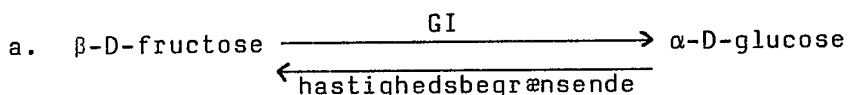
Glucoseisomerase (EC 5.3.1.5) katalyserer den reversible

omdannelse af β -D-fructose til α -D-glucose ifølge reaktionen



5 Fire skiver med en diameter på 26 mm blev udskåret fra en plade af mikroporøst materiale (eksempel 1) og behandlet som i eksempel 3, hvorefter de blev stablet i pyramidestilling i en standardholder til et Millipore filter uden pakningsholdere for at udgøre en gennemstrømningsreaktor. Den PEI-holdige bærer blev modificeret ved at pumpe glutaraldehyd (10% vægt/volumen, pH indstillet til 8,0) igennem reaktoren med recirkulering fra et 100 ml reservoir i 1 time. Bæreren rensedes herefter in situ ved at pumpe 500 ml (ca. en halv time) ionbyttet vand igennem og 200 ml af en puffer af typen Hepes eller tilsvarende (dvs. 2 g/l $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og 0,2 g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH 7,0 - 7,5 i ionbyttet vand) igennem reaktoren. En opløsning af glucoseisomerase ved pH 7,5 (30 ml indeholdende 0,43 enheder/ml) ledtes igennem et Millipore filter 0,65 μ og cirkuleredes igennem reaktoren en time ved stuetemperatur. Udtrykket "enheder" anvendt heri refererer til aktivitetsenheder og er defineret som den mængde enzym, der katalyserer omdannelsen af et μ mol β -D-fructose til α -D-glucose pr. minut ved 25 °C. Reaktoren rensedes med ca. 500 ml Hepes puffer, indtil der ikke kunne observeres protein i effluenten. Glucoseisomeraseenzymet, der er immobiliseret i dette eksempel, opnåedes som et lyofiliseret helcelle homogenat af *Streptomyces albus* fra Novo Enzyme Corporation og rensedes ved opløselig proteinisolering og fraktionering med ammoniumsulfat. Selv om fraktioneringen delvis afhænger af begyndelseskonzentrationen af protein i den ovenstående væske opnået ved proteinisoleringstrinnet, findes hoveddelen af glucoseisomeraseaktiviteten i de 70 - 85% ammoniumsulfatpellets. Disse proteinpellets indeholdende hoveddelen af aktiviteten opløses i 20 -

30 ml Hepes-puffer og dialyseres mod 4 liter puffer i 24 timer ved 4 °C, idet der anvendes standard-celluloseacetatdialysemembraner. Selv om enzympræparatet på dette punkt eventuelt er egnet til immobilisering, kan ovennævnte enzymkoncentration renses yderligere ved standardgelpermeeringsmetoden. Proteinanalyse af renses gennemstrømningsvæsken udførtes ved at anvende følgende reaktionssekvens



Som nævnt katalyserer glucoseisomerase den reversible om-

10 dannelselse af β -D-fructose til α -D-glucose. Ved 25 °C er ligevægtkonstanten for denne reaktion ca. 1 og vil føre til en ca. 50 - 50 blanding af β -D-fructose og α -D-glucose. Den spontane epimerisering af mellemproduktet α -D-glucose til β -D-glucose er ikke tilstrækkelig hurtig under forsøgsbetingelserne til at hindre akkumulering af dette mellemprodukt, og derfor sættes aldose-1-epimerase til forsøgsopløsningen for at lette denne mellemproduktreaktion.

15 Den reaktion, man kan analysere, er den aerobe (glucoseoxidase) oxidation af β -D-glucose til D-gluconolacton i nærværelse af catalase, der resulterer i en total støkiometri på 2 mol β -D-fructose pr. mol oxygen (O_2). Sidstnævnte reaktion måles ved hjælp af en biologisk oxygenmåler, såsom en YVI Model 53.

20

Forsøget blev udført som følger: I en reaktionscelle, der var i ligevægt ved 25 °C, tilsattes 3 ml 0,01 molær phosphatpuffer, pH 8, og der omrørtes med en indstilling på 5 på en Thomas-omrører. Herefter tilsattes 30 µliter Sigma-glucoseoxidase type V koncentreret 10 gange og 100 µliter aldose-1-epimerase fremstillet i overensstemmelse med Lapedes and Chase¹. Herefter blev tilsat 10 µliter Sigma-C-100 catalase (5 mg/ml koncentration) og 20 µliter 72% (4 molær) β-D-fructose. Efter at den fremkomne opløsning var omrørt i ialt 3 - 5 minutter, anbragtes en elektrode af en model Model 53 YVI biological oxygen monitor forsigtigt i cellen, idet man sikrede sig, at ingen luftbobler blev tilbageholdt. Skriveren af en Model 53 YVI, der kørte med en hastighed på ca. 1 am pr. minut, fik lov at stabilisere, dvs. indtil der blev opnået en ret basislinie. Når denne var etableret, tilsattes 100 µliter puffer til reaktionscellen, og skriverlinien fik igen lov at stabilisere sig. Forsøget er lineært op til 10 µmol O₂ pr. minut, selv om mindre hastigheder rutinemæssigt anvendes, idet der anvendes en ekspanderet skala på måleinstrumentet. Der forekom intet skift i skriverens optegning hvilket indikerer, at der ikke findes aktivt enzym i pufferen.

En belastning på 0,7 enheder glucoseisomerase pr. ml reaktormatrix blev beregnet baseret på aktiviteten af proteinopløsningen anvendt til immobilisering.

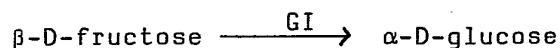
¹ "Aldose-1-epimerase from Hog Kidney: Isomation and Evidence of Purity, Chemical Studies and Inhibition Kinetics", S.L. Lapedes og A.M. Chase, Biochem. & Biophys. Res. Comm., 31 967 (1968).

30 EKSEMPEL 9

Sammenligning af en mikroporøs bærer med kontrolleret poreglas (CPG)

Kontrollerede poreglaspartikler med en størrelse på 40 - 80 mesh indkøbtes fra Electronucleonics Corporation og blev kemisk modificeret ved standardmetoder som beskrevet i "Immobilized Enzymes: A Prototype Device for the Analysis of Glucose in Biological Employing Immobilized Glucose Oxidase", M.K. Weibel et al., Anal. Biochem., 52 502 (1973) til indføring af kovalente bindinger, alifatiske aminofunktioner på de eksterne og interne overflader. 2 gram aminomodificeret CPG blev afluftet og suspenderet i 100 ml Hepes puffer i en halv time. Den ovenstående væske blev fjernet fra partikellejet, og partiklerne resuspenderedes i 100 ml 10% vandig glutaraldehyd i en time. CPG-pariklerne vaskedes grundigt ved suspensionen og dekanteredes, indtil lugt af glutaraldehyd var væk. 10 ml enzymopløsning indeholdende 0,43 enheder/ml med pH 7,5 sættes til partiklerne og fik lov at reagere i en time. 1/2 ml af partiklerne anbragtes i en lille kolonne (0,6 cm i diameter) til dannelse af en reaktor med et pakket leje og rensedes med Hepes-puffer, indtil intet protein kunne afsløres i den ovenstående væske bestemt ved analyseteknikken i eksempel 8. Baseret på tab af aktivitet fra reaktionsopløsningen bestemtes belastningen til 0,66 enheder/ml (CPG har en vægtfylde på 0,36 g/ml), hvilket i det væsentlige svarer til det immobiliserede enzym i eksempel 8. Det relative volumen af skiven (eksempel 8) og det pakkede leje lå inden for 20%, idet de var henholdsvis 1,0 og 1,2 ml. Reaktorerne vurderedes empirisk ved at måle omdannelsesgraden af 7,2% vægt/volumen fructoseopløsning (0,4 molær) pH 7,0 med adskillige gennemstrømningshastigheder i Hepes-puffer. Glucose målttes ved fortynding af reaktoreffluenten 100 gange med 0,1 molær natriumacetat, pH 5,5, for at måle slutoxygenoptagelsen i nærværelse af enzymerne. Analyse af det immobiliserede enzyms aktivitet blev udført på samme måde som beskrevet i eksempel 8, bortset fra at den første reaktion allerede

var udført, og man kun behøvede at analysere mængden af α -D-glucose i effluentstrømmen fra reaktoren. Reaktionen:



5 var allerede sket i reaktoren og udførtes med en 7,2% fructoseopløsning i Hepes puffer. Den analytiske sekvens af reaktoreffluenten er den samme som ligningerne b, c og d ovenfor.

10 Analyse af reaktoreffluenten for den effektive omdannelse af β -D-fructose til α -D-glucose er som følger: I reaktionscellen, der var i ligevægt ved 25 °C, afpipeteredes 3 ml natriumacetatpuffer ved pH 5,5, og der omrørtes med en omrøringshastighed på 5 på Thomas-omrøreren. Derefter tilsattes 60 μ liter glucoseoxidase, 200 μ liter aldose-1-epimerase og 10 μ liter catalase til cellen. Efter at den fremkomne opløsning var omrørt i ialt 3 - 5 minutter, anbragtes elektroden fra oxygenmåleren forsigtigt i cellen, idet man sikrede sig, at ingen luftbobler blev tilbageholdt på overfladen af elektroden, på cellen eller i selve opløsningen. Med den biologiske oxygenmåler og tilhørende skriver, der kørte med en papirphastighed på ca. 1 cm pr. minut, fik kurven lov at stabilisere sig på en konstant basislinie. Når en ret basislinie var etableret, injiceredes 30 μ liter reaktoreffluent i reaktionscellen, og kurven fik igen lov at stabilisere sig.

25 Resultatet af de empiriske forsøg er vist nedenfor. Både immobiliserings- og reaktorstudierne udførte parallelt på samme dag for at sikre, at en direkte sammenligning kunne udføres. Driften af hver reaktor i en periode på 6 timer var uændret, og dette bestemtes ved en konstant omdannelse af fructose til glucose, når de to reaktorer kørte på 30 en kinetisk måde.

Reaktor med pakket leje (volumen 1,2 ml)

<u>Strømningshastighed</u>	<u>% omdannelse</u>	<u>Opholdstid</u>
1,30 ml/min.	0,38	0,92 min.
0,69 ml/min.	0,56	1,74 min.
0,20 ml/min.	1,50	6,00 min.

Skivereaktor (volumen 1,0 ml)

<u>Strømningshastighed</u>	<u>% omdannelse</u>	<u>Opholdstid</u>
0,75 ml/min.	0,81	1,33 min.
0,37 ml/min.	1,30	2,72 min.
0,18 ml/min.	2,45	5,50 min.

5 Som det ses af ovennævnte data, er effektiviteten af reaktoren med pakket leje kun 60 - 70% af effektiviteten for en reaktor med stablede skiver, når opholdstiderne normaliseres. Dette er meget overraskende i betragtning af de beregninger, der viser, at "bulk-koncentrationen" af enzy-
 10 m til praktiske formål er identisk for begge reaktorer. Skivereaktoren fik lov at blive ved stuetemperatur i nærværelse af substratopløsningen i 5 dage. Transportegenskaberne for reaktoren var uændret, og den procentvise omdannelse ved 0,37 ml/min. var lidt højere, nemlig 1,50%.

EKSEMPEL 10

Mikroporøs bærer med termohærdet matrix

15 Der fremstilledes en folie af mikroporøst materiale ved grundigt at blande 100 vægtdele naturlig gummi 165,5 dele silicahydrogel, 3,1 dele inert fyldstof (gummistøv), 39 dele svovl, 0,8 dele stearinsyre og 0,8 dele diphenylguanidin i en Banbury mixer til opnåelse af en homogen blanding. Denne ekstruder-
 20 edes til folie og kalandreredes til en tykkelse på 1,2 mm. Den kalandrerede folie blev viklet op på en spole og

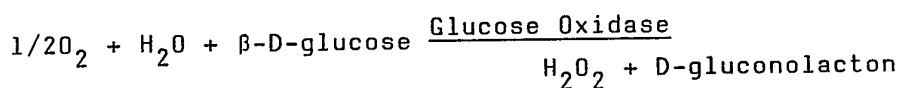
vulkaniseret i en autoklav i 35 minutter ved 172 °C og 11 kg/cm². Den vulkaniserede folie lufttørredes i en ovn for at fjerne alle spor af fugtighed. Det fremkomne mikroporøse materiale er ekstremt porøst med mikroporer af en størrelse fra 0,5 μ til 5 μ , og en middelporediameter på ca. 1,5 μ bestemt ved kviksølvintrusionsmetoden. Desuden er den totale porøsitet af dette materiale ca. 56 volumen-%, og det dispergerede fyldstofindhold (dvs. silicadioxid) var ca. 26 vægt-%. prøver af dette bærestof med en diameter på 1,3 cm blev udstanset af den færdige mikroporøse folie og blev anvendt til at lave en enkelt reaktor som følger:

1. Reaktor nr. 1 - kun inkuberet i enzym
2. Reaktor nr. 2 - inkuberet i polyethylenimin, glutaraldehyd og enzym.

For sammenligningsformål fremstilledes en tredje reaktor med skive (reaktor nr. 3) ved at lave en skive af materialet i eksempel 1 med en diameter på 1,3 cm og inkubere denne i polyethylenimin, glutaraldehyd og enzym. Hver mikroporøs reaktorskive (reaktorer nr. 2 og 3) blev, efter de var skåret i den rigtige størrelse, neddyppet i 20 ml 5% polyethylenimin i 30 minutter og omrørt hyppigt for at fjerne luftbobler. Stykkerne vaskedes i 30 minutter i en 1 molar opløsning af natriumchlorid for at fiksere polyethylenimin og vaskedes derefter grundigt med destilleret vand for at fjerne natriumchlorid fra reaktorpladerne. Dette krævede fire omgange, idet der anvendtes 50 ml og 10 minutter hver gang. Reaktorpladerne udblødtes herefter i 50 ml 10% vandig opløsning af glutaraldehyd ved pH 9 og omrørtes hyppigt for at sikre ensartet gennemtrængning af pladen med glutaraldehyd. Efter inkubering i glutaraldehyd vaskedes pladen grundigt i destilleret vand, idet

der anvendtes 50 ml vaskevæske i en tid på 10 minutter. Glucoseoxidase (1 270 enheder/ml) fortyndedes 50/50 med phosphatpuffer (0,1 molær pH 6). Den fremkomne opløsning (50 ml) indstilledes til pH 6 med fortyndet natriumhydroxid, og pladereaktorerne nr. 1, 2 og 3 inkuberedes i denne opløsning i 30 minutter. Efter 30 minutters inkubering fjernedes reaktorpladerne og vaskedes grundigt med destilleret vand for at fjerne det frie enzym fra det porøse materiale, hvorefter der kun var det immobiliserede enzym tilbage.

Hver af de ovennævnte tre reaktorer afprøvedes for omdannelse af β -D-glucose til D-gluconlacton, og der målttes hydrogenperoxidkoncentrationen i effluenten fra reaktoren. Substratopløsningen (β -D-glucose, 0,15 millimol i 0,1 molær kaliumphosphatpuffer ved pH 6) pumpedes igennem reaktorerne med forskellig strømningshastighed, og effluentstrømmen opsamledes og analyseredes for hydrogenperoxid, der udvikledes efter ligningen:



I analysatorkuvetten sættes 25 μ liter af peroxidaseopløsningen (10 mg/5 ml i kaliumphosphatpuffer ved pH 6) og 50 μ liter reduceret O-dianisidubopløsning (2% i methanol). Kuvetten fyldtes med reaktoreffluenten, omrørtes, og analyseredes i en Bausch & Lomb Spectronic 20 ved 460 millimikrometer for den optiske densitet over for en blank standard. De observerede resultater summeres som følger:

Reaktor nr. 1

Den mindste enzymaktivitet udvist af denne reaktor. Den aktivitet, der fandtes, blev nemt vasket ud, efterhånden

som glucoseopløsningen pumpedes igennem reaktoren, hvilket tyder på, at enzymet ikke er bundet til mediet, men snarere indesluttet i porerne.

Reaktor nr. 2

5 Denne reaktor viste god virkning på den første dag, idet den næsten var lige så aktiv som kontrollen (reaktor nr. 3), når man normaliserede for silicaindholdet af materialet. Ved en strømningshastighed på 0,5 ml/min. igennem et areal på 1 cm² viste pladen en aktivitet på 9,65 enh./g
10 materiale. Aktiviteten synes at falde en smule den anden dag, men måltet ikke.

Reaktor nr. 3

15 Denne reaktor viste god virkning og forblev konstant begge dage. Ved en strømningshastighed på 0,5 ml/min. igennem 1 cm², viste skiven en aktivitet på 1,8 enh./g materiale.

20 Det bemærkes, at aktiviteten af reaktor nr. 2 var ca. halvdelen af reaktor nr. 3 og også materialet i reaktor nr. 2 indeholdt ca. halvdelen af siliciumoxidfyldstoffet i reaktor nr. 3. Dette indikerer, at fyldstoffet (siliciumoxid) i det mikroporøse materiale udgør den primære binder for det immobiliserede enzym og ikke så meget den omliggende matrix af hård gummi eller polyvinylchlorid.

25 Selv om de foregående eksempler illustrerer det immobiliserede enzymesystem ifølge opfindelsen i form af en såkaldt gennemstrømningsreaktor, er det klart, at andre former for reaktorer kan anvendes. For eksempel kan det mikroporøse udgangsmateriale formes til et hult rør og behandles på samme måde som ovenfor for herved at binde det ka-

talytisk aktive enzym til bæreren. Substratet kan således ledes igennem røret i den ene ende, hvorved det enzymatisk reagerer, når det strømmer igennem og kommer i kontakt med den indre del af røret, og det fremkomne produkt strømmer ud af den anden ende af røret.

I andre tilfælde, hvor substratet har en relativ høj viskositet, eller hvor det på anden måde er ønskværdigt at anvende et pakket leje, fluidiseret leje eller en omrørt reaktor, kan plader af mikroporøst udgangsmateriale med enzym bundet dertil udskæres eller deles i små dele til i praksis enhver ønskværdig størrelse (dvs. store stykker granulater, kugler, pulvere osv.). De fremkomne neddelte immobiliserede enzymparikler kan anvendes af fagmanden til de formål, der kræver en sådan anvendelse af immobiliserede enzytbærestoffer.

P a t e n t k r a v :

1. Immobiliseret proteinagtigt præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det består af en mikroporøs bærer omfattende en binder af polyvinylchlorid eller hård gummi og en mængde findelte siliciumdioxidholdige partikler dispergeret i binderen og en proteinagtig forbindelse bundet til i det mindste nogle af de siliciumdioxidholdige partikler dispergeret i binderen, hvorhos den mikroporøse bærer omfatter et netværk af i det væsentlige forbundne mikroporer, hvis størrelsesfordeling ligger fra 0,01 μ til 100 μ bestemt ved kviksølvintrusionsmetoden.
5
2. Præparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den proteinagtige forbindelse er et katalytisk aktivt enzym.
10
3. Præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er glucoseoxidase.
15
4. Præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er aldose-1-epimerase.
20
5. Præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er α -D-fructofuranosidase.
25
6. Præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er alkoholdehydrogenase.
7. Præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved; at enzymet er glucoseisomerase.
8. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret proteinagtigt præparat ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at den protein-

agtige forbindelse kemisk bindes til i det mindste nogle af de dispergerede siliciumdioxidholdige partikler i en mikroporøs bærer omfattende en binder af polyvinylchlorid eller hård gummi og en mængde findelte siliciumdioxidholdige partikler dispergeret i binderen, hvorhos den mikroporøse bærer omfatter et netværk af i det væsentlige forbundne mikroporer, hvis størrelsesfordeling ligger fra $0,01\mu$ til 100μ bestemt ved kviksølvintrusionsmetoden.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, kendetegnet ved, at den proteinagtige forbindelse kovalent bindes eller tværbindes til et mellemkoblingsmiddel, der er kovalent bundet til de siliciumdioxidholdige partikler

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, kendetegnet ved, at den proteinagtige forbindelse er et katalytisk aktivt enzym, der kovalent bindes eller tværbindes til overfladen af de siliciumdioxidholdige partikler ved, at behandle bæreren, der er behandlet med et mellem-koblingsmiddel til dannelse af organiske funktionelle grupper, der kovalent er bundet til overfladen, behandles med en opløsning indeholdende enzymet for kovalent at binde enzymet til de organiske funktionelle grupper på de siliciumdioxidholdige partikler.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, kendetegnet ved, at den behandlede bærer behandles med et tværbindingsmiddel inden behandling med enzymopløsningen.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 10, kendetegnet ved, at den behandlede bærer samtidig behandles med enzymopløsningen og et tværbindingsmiddel.

13. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 10-12, k e n d e t e g n e t ved, at mellem-koblingsmidlet er en organosilan.
- 5 14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g -
n e t ved, at organosilanen er gamma-aminopropyltriethoxysilan.
15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, k e n d e t e g -
n e t ved, at tværbindingmidlet er glutaraldehyd.
- 10 16. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g -
n e t ved, at den proteinagtige forbindelse kovalent bindes eller tværbindes til et mellem-koblingsmiddel, der er kemisk adsorberet til overfladen af i det mindste nogle af de findelte dispergerede siliciumdioxidholdige partikler.
- 15 17. Fremgangsmåde ifølge krav 16, k e n d e t e g -
n e t ved, at den proteinagtige forbindelse er et katalytisk aktivt enzym, der kovalent bindes eller tværbindes til overfladen af de siliciumdioxidholdige partikler ved, at bæreren, der er behandlet med
20 et mellem-koblingsmiddel til dannelse af organiske funktionelle grupper kemisk adsorberet til overfladen, behandles med en opløsning indeholdende enzymet for kovalent at binde enzymet til de organiske funktionelle grupper på de siliciumdioxidholdige partiklers overflade.
- 25 18. Fremgangsmåde ifølge krav 17, k e n d e t e g -
n e t ved, at den behandlede bærer behandles med et tværbindingmiddel inden behandlingen med enzymopløsningen.

19. Fremgangsmåde ifølge krav 17, k e n d e t e g -
n e t ved, at den behandlede bærer samtidigt behandles
med enzymopløsningen og et tværbindingsmiddel.
- 5 20. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene
17-19, k e n d e t e g n e t ved, at mellem-koblings-
midlet er en polyelektrolyt.
21. Fremgangsmåde ifølge krav 20, k e n d e t e g -
n e t ved, at polyelektrolytten er polyethylenimin.
22. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g -
n e t ved, at tværbindingsmidlet er glutaraldehyd.
23. Anvendelse af præparatet ifølge et vilkårligt af
kravene 2-7, k e n d e t e g n e t ved, at præparatet,
der har form af en folie med i det mindste et par mod-
stående overflader, der strækker sig i det væsentlige pa-
rallelt med hinanden, behandles med et substrat, der skal
omdannes enzymatisk, ved at substratet ledes gennem fo-
lien i en retning i det væsentlige vinkelret på de paral-
lelle overflader.

Fremdragne publikationer:

US patent nr. 3766013.