



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 N 11/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

629 251

⑮① Gesuchsnummer:	8260/75	⑦③ Inhaber: United Kingdom Atomic Energy Authority, London (GB)
⑮② Anmeldungsdatum:	25.06.1975	
⑮③ Priorität(en):	25.06.1974 GB 28212/74	⑦② Erfinder: Alan Rosevear, London (GB)
⑮④ Patent erteilt:	15.04.1982	
⑮⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.04.1982	⑦④ Vertreter: E. Blum & Co., Zürich

⑤④ Verfahren zur Fixierung einer biologisch aktiven Substanz auf einem porösen Trägermaterial.

⑤⑦ Das vernetzbare biologisch aktive Material wird in den Poren eines Trägermaterials dauerhaft fixiert und unbeweglich gemacht, indem man es zunächst in den Poren des Trägermaterials unlöslich macht, und dann darin vernetzt. Das biologisch aktive Material kann dabei bereits in seiner biologisch aktiven Form vorliegen oder als aktivierbarer Vorläufer, der dann vor der Verwendung aktiviert werden kann.

Das so erhaltene, im Trägermaterial fixierte biologisch aktive Material kann mit Vorteil zur Durchführung von Reaktionen mit Substraten verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Fixierung einer vernetzbaren biologisch aktiven Substanz oder eines Vorläufers der biologisch aktiven Substanz auf einem Trägermaterial, indem man die biologisch aktive Substanz, bzw. den Vorläufer, in das Trägermaterial einführt und dort durch Vernetzung unbeweglich macht, dadurch gekennzeichnet, dass man die biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer in die Poren eines porösen Trägermaterials einführt, die biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer unlöslich macht, damit sie während der Vernetzung im wesentlichen nicht aus den Poren verdrängt wird, und die biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer vernetzt, und wobei die Einführung der biologisch aktiven Substanz oder deren Vorläufers, deren Unlöslichmachung und deren Vernetzung so erfolgt, dass der Hauptteil der biologisch aktiven Substanz oder deren Vorläufers in den Poren des Trägermaterials, und nicht an dessen äusserer Oberfläche fixiert ist.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Unlöslichmachen der biologisch aktiven Substanz in den Poren des porösen Trägermaterials erfolgt, indem man die biologisch aktive Substanz aus einer Lösung der biologisch aktiven Substanz ausfällt.

3. Verfahren nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausfällungsverfahren und die Vernetzung nacheinander durchgeführt werden, indem man die Lösung der biologisch aktiven Substanz in den Poren mit einem Ausfällungsmittel behandelt und anschliessend die biologisch aktive Substanz mit einem Vernetzungsmittel behandelt.

4. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das poröse Trägermaterial zunächst mit einer konzentrierten Lösung der biologisch aktiven Substanz getränkt wird, wobei die Lösung in die Poren des porösen Trägermaterials eindringt, und dass man dann anschliessend eine Behandlung mit einem Ausfällungsmittel, welches die biologisch aktive Substanz nicht denaturiert, durchführt, um die biologisch aktive Substanz in den Poren auszufällen, und anschliessend die Behandlung mit dem Vernetzungsmittel durchführt, um die biologisch aktive Substanz zu versetzen und in den Poren des porösen Trägermaterials unbeweglich zu machen.

5. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die biologisch aktive Substanz vor dem Unlöslichmachen einer Vorbehandlung unterwirft, um eine Vorvernetzung zu erreichen.

6. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die biologisch aktive Substanz zunächst in die Poren des porösen Trägermaterials eingebracht wird, und man sie dann gleichzeitig mit einem Ausfällungsmittel und einem Vernetzungsmittel oder mehreren derartigen Mitteln behandelt.

7. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man ein poröses Trägermaterial mit einer konzentrierten Lösung der biologisch aktiven Substanz trinkt, um diese Lösung in die Poren des porösen Trägermaterials einzuführen, die biologisch aktive Substanz in den Poren des porösen Trägermaterials gefrieretrocknet und dann das poröse Trägermaterial mit der gefrieretrockneten biologisch aktiven Substanz mit einem Vernetzungsmittel behandelt, und zwar unter solchen Bedingungen, dass praktisch nichts von der gefrieretrockneten Substanz in Lösung geht, wobei durch die Vernetzung der biologisch aktiven Substanz diese in den Poren des porösen Trägermaterials unlöslich gemacht wird.

8. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Gefrieretrocknen der biologisch aktiven Substanz in den Poren des porösen Trägermaterials aber vor der Vernetzung derselben weitere Mengen an der biologisch aktiven Substanz in die Poren des porösen Trägermate-

rials eingeführt werden, indem man dieses in eine konzentrierte Lösung der biologisch aktiven Substanz einbringt, und die biologisch aktive Substanz, durch Behandlung mit einem Fällungsmittel in den Poren ausfällt.

9. Verfahren nach einem der Patentansprüche 3, 4, 6 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als ausfällendes Mittel Tanninsäure in Äthanol, Tanninsäure in Aceton, Tanninsäure in einer Mischung aus Wasser und Isopropanol, ein synthetisches Polyphenol in Aceton, Aceton, ein ausflockendes Mittel oder eine wässrige Lösung von Tanninsäure, Salminsulfat, Alginsäure, Protaminsulfat, Pektin, Gallussäure, Pyrogallol, Polyäthylenglycol, Diäthylaminoäthyl-dextran, Dextransulfat, Polygalacturonsäure oder Polyäthylenimin verwendet.

10. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die Vernetzung des vernetzbaren, biologisch aktiven Materials durchführt, indem man als Vernetzungsmittel Glutaraldehyd, Formaldehyd, Diäthylpyrocarbonat, Glyoxal oder ein Bis-diazoniumsalz verwendet, oder die Vernetzung durch alkalische Oxydation durchführt.

11. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das verwendete poröse Trägermaterial ein aus Teilchen aufgebautes poröses Trägermaterial ist, so dass die vernetzbare biologisch aktive Substanz in die Poren einer Vielzahl von getrennten Teilchen des porösen Trägermaterials eindringt.

12. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als poröses Trägermaterial poröse Titandioxidkugeln, poröse Calciumphosphatkugeln, poröse Aluminiumoxidkugeln, poröse Zirkonoxidkugeln, poröses Glas mit eingestellter Porengrösse, zerstoßenes poröses, aus Asche, Zement und Sand erzeugtes Isoliermaterial, Teilchen eines Aluminiumsilikat-katalysators, bzw. eines entsprechenden verbrauchten Katalysatormaterials oder poröse natürliche Erden verwendet, wobei von diesen Zeolith bevorzugt ist, und ferner solche Titandioxidkugeln, die einen durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 500 μ besitzen und bei denen 60% der Poren einen Durchmesser im Bereich von 2 700 bis 10 000 Å aufweisen.

13. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als poröses Trägermaterial Holz, Viscose, ein vernetztes Dextran oder ein Polyacrylamidgel verwendet.

14. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendete vernetzbare biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer ein Protein enthaltendes Material, insbesondere ein Enzym ist.

15. Verfahren nach Patentanspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym Amyloglucosidase, Lactase, α -Amylase, Chymotrypsin, Trypsin, Urease, Glucose-oxidase, Lipoxidase, Glucose-isomerase oder Papain ist.

16. Nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 1 hergestellte immobilisierte biologisch aktive Substanz.

17. Immobilisierte biologisch aktive Substanz gemäss Patentanspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie immobilisierte Amyloglucosidase ist.

18. Verwendung der immobilisierten Amyloglucosidase gemäss Patentanspruch 17 zur Hydrolyse von Stärke.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Fixierung einer vernetzbaren biologisch aktiven Substanz oder einer noch nicht aktiven Vorstufe derselben in den Poren des Trägermaterials. Im zweitgenannten Fall kann dann die durch Vernetzung unbeweglich gemachte biologisch akti-

ve Substanz jederzeit in die biologisch aktive Substanz übergeführt werden.

In der USA-Patentschrift Nr. 3 804 719 wird bereits ein Verfahren zum Unbeweglichmachen von Enzymen auf Trägermaterialien beschrieben. In dieser Patentschrift (s. beispielsweise Sp. 2, Zeile 54 bis Spalte 3, Zeile 9) wird erläutert, dass dann wenn das Trägermaterial mit einer wässrigen Lösung des Enzymes getränkt wird, und dann eine wässrige Lösung eines Vernetzungsmittels angewandt wird, um das Enzym zu vernetzen, grosse Mengen an Enzym verloren werden und die Aktivität des so auf dem Trägermaterial unbeweglich gemachten Enzymes sehr gering ist. Deshalb wurde dort ein kompliziertes aus zwei Phasen bestehendes flüssiges System angewandt, um das Enzym unlöslich zu machen.

Im Gegensatz dazu wurde nun ein neues Verfahren entwickelt, bei dem ohne Anwendung von zwei flüssigen Phasen ein biologisch aktives Material in den Poren eines Trägermaterials vernetzt und unbeweglich gemacht wird, und bei dem eine grosse Menge des biologisch aktiven Materials in diesen Poren verankert werden kann. Diese Vorteile werden beim erfindungsgemässen Verfahren dadurch erreicht, dass das biologisch aktive Material zunächst in den Poren unlöslich gemacht und dann durch Vernetzung dauerhaft darin fixiert wird.

Biologisch aktive Substanzen, wie zum Beispiel Enzyme, sind als Katalysatoren in verschiedenen Arbeitsverfahren nützlich, wie zum Beispiel die Amyloglucosidase, die zur Herstellung von Glucose, ausgehend von Stärke, verwendet werden kann. Bei der praktischen Durchführung derartiger Arbeitsverfahren hat es sich jedoch herausgestellt, dass die biologisch aktiven Substanzen oft nur in solchen Formen zur Verfügung stehen, die wasserlöslich sind, wie zum Beispiel in Form von Enzympräparaten. Dies bedeutet, dass eine derartige Substanz nicht in wirtschaftlich günstiger Weise nach dem Ablaufen des gewünschten Arbeitsverfahrens isoliert werden kann und dadurch verliert man entweder die biologisch aktive Substanz in dem Abwasser oder diese Substanz verunreinigt das hergestellte Produkt.

Aus diesen Gründen kann es vorteilhaft sein, die biologisch aktive Substanz auf einem Trägermaterial unbeweglich zu machen, d.h. sie zu immobilisieren, so dass dann das die aktive Substanz enthaltende Trägermaterial aus dem Reaktionsmedium durch physikalische Arbeitsverfahren abgetrennt werden kann, beispielsweise durch eine Filtration oder durch eine Sedimentation. Ausserdem sind biologisch aktive Substanzen, die sich in unbeweglicher Form auf einem Trägermaterial befinden, geeignet, um lokalisiert zur Anwendung zu gelangen, beispielsweise in Form eines Bettes oder in einer Säule.

Eine biologisch aktive Substanz wird dann als auf einem Trägermaterial unbeweglich gemacht betrachtet, wenn sie auf dem Trägermaterial in solcher Weise fixiert ist, dass zumindest der Hauptteil dieser Substanz auf dem Trägermaterial unter den speziellen Arbeitsbedingungen, die bei dem Verfahren herrschen, in dem das mit der biologisch aktiven Substanz versehene Trägermaterial eingesetzt wird, zurückgehalten werden.

Verschiedene Arbeitsverfahren zur Fixierung oder zum Unbeweglichmachen, das auch häufig als «Unlöslichmachen» von biologisch aktiven Substanzen auf Trägermaterialien bezeichnet wird, wurden bisher in der Literatur beschrieben. Diese bisher bekannten Verfahren sind jedoch nicht befriedigend, weil die nach ihnen erhaltenen Produkte bestimmte Nachteile aufweisen. Beispielsweise wird die biologisch aktive Substanz entweder bei der Verwendung des Produktes von dem Trägermaterial ausgelaugt, wenn dieses verwendet wird, und/oder die physikalische, die chemische oder die mikrobiologische Beständigkeit der Kombination aus biologisch

aktiver Substanz und Trägermaterial ist nicht befriedigend. Dies führt dazu, dass die Verwendung der Substanz für eine fortgesetzte erneute Verwendung während langer Zeiträume schwierig ist.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Verfahren zur Fixierung einer biologisch aktiven Substanz oder eines Vorläufers der biologisch aktiven Substanz auf einem Trägermaterial zu entwickeln, bei dem das erhaltene Produkt eine sehr gute physikalische chemische und mikrobiologische Beständigkeit besitzt, und bei dessen Verwendung ferner die biologisch aktive Substanz nicht ausgelaugt wird. Es zeigte sich, dass diese angestrebten Ziele dadurch erreicht werden können, dass man bei dem Herstellungsverfahren solche Arbeitsschritte anwendet, dass der Hauptteil der biologisch aktiven Substanz oder deren Vorläufers in den Poren des Trägermaterials und nicht an dessen äusserer Oberfläche fixiert ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Fixierung einer vernetzbaren biologisch aktiven Substanz oder eines Vorläufers der biologisch aktiven Substanz auf einem Trägermaterial, indem man die biologisch aktive Substanz, bzw. den Vorläufer, in das Trägermaterial einführt und dort durch Vernetzung unbeweglich macht, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man die biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer in die Poren eines porösen Trägermaterials einführt und die biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer unlöslich macht, damit sie während der Vernetzung im wesentlichen nicht aus den Poren verdrängt wird, und die biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer vernetzt, und wobei die Einführung der biologisch aktiven Substanz oder deren Vorläufer, deren Unlöslichmachung und deren Vernetzung so erfolgt, dass der Hauptteil der biologisch aktiven Substanz oder deren Vorläufers in den Poren des Trägermaterials, und nicht an dessen äusseren Oberfläche fixiert ist.

In der vorliegenden Beschreibung versteht man unter dem Ausdruck «Vorläufer der biologisch aktiven Substanz» Produkte, die selbst noch nicht biologisch aktiv sind, die jedoch nach dem Unbeweglichmachen auf dem Trägermaterial jederzeit aktiviert werden können, um sie biologisch aktiv zu machen. Beispiele für derartige selbst noch nicht aktive Vorläufer von biologisch aktiven Substanzen sind in der Literatur beschrieben. Als Beispiel für einen derartigen Vorläufer einer biologisch aktiven Substanz sei Merkuripapain genannt, das durch Behandlung mit Äthylendiamintetra-essigsäure in das entsprechende aktive Enzym Papain umgewandelt werden kann.

Aus Gründen der Einfachheit werden in der Folge die einzelnen Arbeitsschritte zum Unlöslichmachen und Vernetzen der biologisch aktiven Substanz hauptsächlich anhand der biologisch aktiven Substanz selbst erläutert, wobei jedoch aus dem oben angegebenen zu ersehen ist, dass ein Vorläufer der biologisch aktiven Substanz in der gleichen Weise entsprechend fixiert werden kann.

Beispiele für biologisch aktive Substanzen, die nach dem erfindungsgemässen Verfahren fixiert werden können, sind proteinhaltige Materialien, beispielsweise Enzyme, und auch solche Substanzen die in der Lage sind an spezifischen Wechselwirkungen teilzunehmen, wobei zu derartigen Substanzen beispielsweise Produkte biologischen Ursprungs gehören und diejenigen, die auf den lebenden Organismus einwirken. Substanzen synthetischen Ursprungs, die an Reaktionen teilnehmen können, die spezifische Wechselwirkungen umfassen, die analog denjenigen sind, die bei natürlich auftretenden Substanzen vorkommen, sind auch unter dem Begriff «biologisch aktive Substanzen» zu verstehen.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens kann das Unlöslichmachen der biologisch aktiven Substanz

in den Poren des porösen Trägermaterials erfolgen, indem man die biologisch aktive Substanz aus einer Lösung der biologisch aktiven Substanz ausfällt. Es ist dabei möglich das Ausfällungsverfahren und die Vernetzung nacheinander durchzuführen, indem man die Lösung der biologisch aktiven Substanz in den Poren mit einem Ausfällungsmittel behandelt, und anschliessend die biologisch aktive Substanz mit einem Vernetzungsmittel behandelt. Beispielsweise kann das poröse Trägermaterial zunächst mit einer konzentrierten Lösung der biologisch aktiven Substanz getränkt werden, wobei die Lösung in die Poren des porösen Trägermaterials eindringt, und anschliessend wird dann eine Behandlung mit einem Ausfällungsmittel, welches die biologisch aktive Substanz in den Poren nicht denaturiert, durchgeführt, um die biologisch aktive Substanz in den Poren auszufällen, und daran anschliessend wird dann die Behandlung mit dem Vernetzungsmittel durchgeführt um die biologisch aktive Substanz zu vernetzen und in den Poren des porösen Trägermaterials unbeweglich zu machen.

Gemäss einer anderen Ausführungsart des erfindungsgemässen Verfahrens kann das Unlöslichmachen der biologisch aktiven Substanz in den Poren erfolgen, indem man sie in die Poren des porösen Trägermaterials einbringt und gleichzeitig mit einem Ausfällungsmittel und Vernetzungsmittel oder mehreren derartigen Mitteln behandelt.

Es sei darauf hingewiesen, dass es auch möglich ist, dass die biologisch aktive Substanz bereits zu einem gewissen Ausmass vorvernetzt ist ehe sie in den Poren des porösen Trägermaterials ausgefällt wird. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Vorvernetzung nicht so stark sein darf, dass das Eindringen der biologisch aktiven Substanz in die Poren des porösen Trägermaterials behindert wird. Ausserdem darf durch diese Vorvernetzung auch in keiner Weise die Fähigkeit der biologisch aktiven Substanz in den Poren ausfällbar zu sein behindert werden.

Gemäss einer weiteren Ausführungsart des erfindungsgemässen Verfahrens wird ein poröses Trägermaterial mit einer konzentrierten Lösung der biologisch aktiven Substanz getränkt um die Lösung in die Poren des porösen Trägermaterials einzuführen, worauf dann die biologisch aktive Substanz in den Poren des porösen Trägermaterials gefriergetrocknet wird und dann das poröse Trägermaterial mit der gefriergetrockneten biologisch aktiven Substanz mit einem Vernetzungsmittel behandelt wird, und zwar unter solchen Bedingungen, dass praktisch nichts von der gefriergetrockneten Substanz in Lösung geht, wobei durch die Vernetzung der biologisch aktiven Substanz diese in den Poren des porösen Trägermaterials unlöslich gemacht wird.

Dabei ist es möglich nach dem Gefrieretrocknen der biologisch aktiven Substanz in den Poren des porösen Trägermaterials, aber vor der Vernetzung derselben, weitere Mengen an biologisch aktiven Substanzen in die Poren des Trägermaterials einzuführen, indem man dieses in eine konzentrierte Lösung der biologisch aktiven Substanz einbringt und diese durch Behandlung mit einem Fällungsmittel in den Poren ausfällt.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens kann als ausfällendes Mittel beispielsweise Tanninsäure in Äthanol, Tanninsäure in Aceton, Tanninsäure in einer Mischung aus Wasser und Isopropanol, ein synthetisches Polyphenol in Aceton, Aceton, ein ausflockendes Mittel oder eine wässrige Lösung von Tanninsäure, Salminsulfat, Algininsäure, Protaminsulfat, Pektin, Gallussäure, Pyrogallol, Polyäthylenglycol, Diäthylaminoäthyl-dextran, Dextransulfat, Polygalacturonsäure oder Polyäthylenimin verwendet werden.

Die Vernetzung des biologisch aktiven Materials kann auch durchgeführt werden, indem man als Vernetzungsmittel Glutaraldehyd, Formaldehyd, Diäthylpyrocarbonat, Glyoxal

oder ein Bis-diazoniumsalz verwendet, oder es ist auch möglich die Vernetzung durch alkalische Oxydation zu erreichen.

Das verwendete poröse Trägermaterial kann ein aus Teilchen aufgebautes poröses Trägermaterial sein, und die vernetzbare biologisch aktive Substanz in die Poren einer Vielzahl von getrennten Teilchen des porösen Trägermaterials eingeführt und dort unlöslich gemacht werden, wobei durch Vernetzung das biologisch aktive Material in den Poren des aus einzelnen Teilchen aufgebauten Trägermaterials unbeweglich gemacht wird.

Beispiele für verwendbare poröse Trägermaterialien sind poröse Titandioxidkugeln, poröse Calciumphosphatkugeln, poröse Aluminiumoxiddkugeln, poröse Zirkonoxiddkugeln, poröses Glas mit eingestellter Porengrösse, zerstossener «Thermalite» (ein poröses, aus Asche, Zement und Sand erzeugtes Isoliermaterial der Firma Thermalite Ltd., Birmingham, GB), Teilchen eines Aluminiumsilikat-katalysators, bzw. eines verbrauchten Katalysatormaterials oder poröse natürliche Erden. Von diesen sind speziell bevorzugt Zeolith und ferner solche Titandioxidkugeln, die einen durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 500 μ besitzen und bei denen 60% der Poren einen Durchmesser im Bereich von 2 700 bis 10 000 Å aufweisen. Weitere Beispiele für verwendbare poröse Trägermaterialien sind Holz, Viskose, ein vernetzbares Dextran oder ein Polyamidgel. Ein bevorzugtes Beispiel für eine verwendbare vernetzbare biologisch aktive Substanz oder deren Vorläufer ist ein Protein enthaltendes Material, und insbesondere ein Enzym. Wie bereits erwähnt, kann auch in diesem Fall nach der Vernetzung des Vorläufers dieser unter Bildung des aktiven Enzyms aktiviert werden.

Spezielle Beispiele für Enzyme, die unter Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens fixiert werden können, sind Amyloglucosidase, Lactase, α -Amylase, Chymotrypsin, Trypsin, Urease, Glucose-oxidase, Lipoxidase, Glucose-isomerase oder Papain.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung eine nach dem erfindungsgemässen Verfahren in den Poren eines porösen Trägermaterials durch Vernetzung unbeweglich zurückgehaltene, biologisch aktive Substanz.

Die in den Poren eines porösen Trägermaterials durch Vernetzung unbeweglich gemachte biologisch aktive Substanz kann zur Durchführung einer Reaktion zwischen einem Substrat und der in den Poren in unbeweglicher Form vorliegenden biologisch aktiven Substanz verwendet werden.

Bei dieser Verwendung kann man das Trägermaterial mit der in seinen Poren in unbeweglicher Form fixierten, biologisch aktiven Substanz in einem Substrat dispergieren, oder in Form eines Fliessbettes mit dem Substrat in Berührung bringen, oder in Form eines Festbettes mit dem Substrat in Berührung bringen, beispielsweise als Säulenfüllung anwenden, über die das Substrat geleitet wird.

Während eine Adsorption der biologisch aktiven Substanz durch das Trägermaterial während des Zeitraumes der temporären Zurückhaltung auftreten kann, hat es sich herausgestellt, dass die Verwendung eines reinen Adsorptionsvorganges zur Erreichung einer temporären Zurückhaltung nur zu einer geringen Menge an unbeweglich gemachten Enzymen führt. Dementsprechend wird nach dem erfindungsgemässen Verfahren in sehr vorteilhafter Weise eine Behandlung der Substanz durchgeführt, so dass mehr als eine bloss adsorptive Zurückhaltung dieser Substanz durch das Trägermaterial erreicht wird.

Die temporäre Zurückhaltung der biologisch aktiven Substanz auf dem Trägermaterial kann erreicht werden, indem man beispielsweise eine Ausfällung aus einer Lösung einer biologisch aktiven Substanz unter Verwendung eines ausfällenden Mittels durchführt. Andererseits kann auch eine Gefrieretrocknung in Verbindung mit einem Ausfällungsmittel

angewandt werden, um eine temporäre Zurückhaltung zu erzielen.

Auch eine Gefriertrocknung allein kann angewandt werden, um eine temporäre Zurückhaltung zu erreichen, es hat sich jedoch herausgestellt, dass dies weniger wirksam sein kann, als wenn ein Fällungsmittel verwendet wird.

Obwohl ein Anteil der biologisch aktiven Substanz auf der äusseren Oberfläche des Trägermaterials unbeweglich gemacht werden kann, werden dennoch erfindungsgemäss die Poren eines porösen Trägermaterials zu diesem Zweck verwendet, denn auf diese Weise kann das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen des Trägermaterials sehr stark vergrössert werden, und dementsprechend kann eine grössere Menge an biologisch aktiver Substanz auf einer bestimmten Menge an Trägermaterial unbeweglich gemacht werden. Die Porengrösse und die Porenform des porösen Trägermaterials sollen so ausgewählt werden, dass ein Eintreten der biologisch aktiven Substanz, die unbeweglich gemacht werden soll, erreicht wird, und ferner soll die Porengrösse und die Porenform auch so sein, dass das Eintreten derjenigen Produkte, die mit der unbeweglich gemachten biologisch aktiven Substanz in Wechselwirkung treten sollen, möglich ist.

Das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht, dass die biologisch aktive Substanz in den Poren des porösen Trägermaterials unbeweglich gemacht wird. Wenn dann nach der temporären Zurückhaltung und der Vernetzung die biologisch aktive Substanz auf dem porösen Trägermaterial unbeweglich gemacht ist, dann wird diese Substanz in den Poren des Trägermaterials und ebenfalls an der äusseren Oberfläche des Trägermaterials anwesend sein. Wenn man beispielsweise ein aus Teilchen aufgebautes poröses Trägermaterial verwendet, dann kann man annehmen, dass der Hauptteil der unbeweglich gemachten Substanz sich in den Poren befindet, und nicht an der äusseren Oberfläche des aus Teilchen aufgebauten Trägermaterials.

Es hat sich herausgestellt, dass es möglich ist, einige biologisch aktive Substanzen gleichzeitig mit einem Ausfällungsmittel und einem Vernetzungsmittel oder mehreren derartigen Mitteln zu behandeln. Ein derartiges Arbeitsverfahren ist beispielsweise bei Enzymen möglich, wie zum Beispiel bei der Amyloglucosidase, wo die Zeit, die für das Ablaufen der Vernetzung benötigt wird, wesentlich länger ist, als diejenige, die zur Ausfällung des Enzyms erforderlich ist.

Es kann vorteilhaft sein die vernetzbare biologisch aktive Substanz vor ihrem Unlöslichmachen einer Vorbehandlung zu unterwerfen, um eine Vorvernetzung zu erreichen. Dabei darf jedoch die Vorvernetzung nur so stark sein, dass dadurch das Eindringen der biologisch aktiven Substanz in die Poren des porösen Trägermaterials in keiner Weise behindert wird. Anschliessend an diese Vorvernetzung erfolgt dann das Unlöslichmachen, beispielsweise eine Ausfällung der biologisch aktiven Substanz.

Vorzugsweise wird bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens das poröse Trägermaterial zuerst mit einer konzentrierten Lösung der biologisch aktiven Substanz, beispielsweise einem Enzym, getränkt und dann anschliessend eine Behandlung mit einem ausfällenden Mittel durchgeführt, welches zu keiner Denaturierung der biologisch aktiven Substanz führt, wobei durch diesen Ausfällungsschritt die biologisch aktive Substanz während eines gewissen Zeitraumes auf dem porösen Trägermaterial zurückgehalten wird, worauf dann eine Behandlung mit einem Vernetzungsmittel erfolgt, um die biologisch aktive Substanz zu vernetzen und auf dem porösen Trägermaterial unbeweglich zu machen.

Man sieht, dass bei der Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens unter Verwendung eines porösen Trägermaterials die biologisch aktive Substanz in Form einer Lösung in dieses Trägermaterial eingeführt werden kann und zwar

so, dass das Porenvolumen des Trägermaterials gefüllt wird, worauf dann eine nachfolgende Behandlung durchgeführt wird und zwar in einer solchen Weise, dass wesentliche Mengen des biologisch aktiven Materials nicht aus den Poren verdrängt werden, wobei durch diese Behandlung erreicht wird, dass die biologisch aktive Substanz aus der Lösung herauskommt und eine zeitweilige Zurückhaltung dieser Substanz auf dem Trägermaterial erreicht wird. Die temporär zurückgehaltene biologisch aktive Substanz ist also auf dem Trägermaterial lokalisiert und anschliessend erfolgt eine Vernetzung, um die biologisch aktive Substanz in den Poren unbeweglich zu machen.

Unter Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens wurde Amyloglucosidase unbeweglich gemacht, indem man Tanninsäure als ausfällendes Mittel verwendete und Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel einsetzte, wobei die in der Folge genannten anorganischen Materialien als Beispiele für verwendbare Trägermaterialien angeführt sind:

poröse Titandioxid-Kügelchen, poröse Calciumphosphat-Kügelchen, poröse Aluminiumoxid-Kügelchen, poröse Zirkonoxid-Kügelchen, poröses Glas mit bestimmten Porengrössen, wie zum Beispiel die Corning Glastypen CPG10-240, 10-370, 10-1250, 30-370 und 30-2000, zerkleinerte Thermaliteblöcke, verbrauchter Laporte-Katalysator, verbrauchter Crosfield-Katalysator (die verbrauchten Laporte-Katalysatoren und Crosfield-Katalysatoren enthalten poröse Aluminosilikat-Teilchen).

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass auch andere Materialien als die vorhin angegebenen speziellen Beispiele als Trägermaterialien zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens verwendet werden können. Beispielsweise können poröse natürliche Erden, wie zum Beispiel Zeolith in geeigneter Weise als Trägermaterialien eingesetzt werden, und Enzyme wurden nach dem erfindungsgemässen Verfahren auf porösen Kügelchen, die aus Zeolith hergestellt waren, unbeweglich gemacht. Ferner können auch organische Materialien, wie zum Beispiel Holz, Viskose, Sephadex (ein vernetztes Dextran) und Bio-gel (ein Polyacrylamidgel) als Trägermaterialien verwendet werden. Beispielsweise wurde Amyloglucosidase auf Holzspänen unter Verwendung von Tanninsäure als ausfällendes Mittel und Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel unbeweglich gemacht. Es ist sehr wünschenswert, wenn die eingesetzten Trägermaterialien im wesentlichen unter den beim Verfahren angewandten Bedingungen und in den zur Durchführung der Reaktion angewandten Medien in welchen das Trägermaterial und die biologisch aktiven Materialien eingesetzt werden, unlöslich sind.

In der Folge werden Beispiele für biologisch aktive Substanzen angeführt, die auf porösen Titandioxid-Kügelchen, die einen Teilchendurchmesser von 500 μ besaßen und bei denen 60% der Poren einen Durchmesser im Bereich von 2700 - 10000 Å hatten, unbeweglich gemacht werden. Zu diesem Unbeweglichmachen der biologisch aktiven Substanzen auf den Titandioxid-Kügelchen wurde als Fällungsmittel Tanninsäure eingesetzt und als Vernetzungsmittel Glutaraldehyd. Die biologisch aktiven Materialien waren: Amyloglucosidase (4 Arten dieses Enzyms), Lactase (4 Arten dieses Enzyms), α -Amylase, Chymotrypsin, Trypsin, Urease, Glucose-oxidase, Lipoxidase, Glucose-isomerase und Papain.

Mehr als eine einzige biologisch aktive Substanz kann auf dem gleichen Trägermaterial nach dem erfindungsgemässen Verfahren unbeweglich gemacht werden. Dementsprechend kann man auf dem Trägermaterial beispielsweise gemeinsam Amyloglucosidase und α -Amylase unbeweglich machen.

Eine Anzahl an unterschiedlichen Reagenzien wurden verwendet, um die Ausfällung bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens durchzuführen. Wenn man Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel einsetzt, dann kann eine

käuflich erhältliche Amyloglucosidase, die unter dem Namen «Agidex» im Handel ist, auf porösen Titandioxid-Kügelchen, die die oben angegebene Teilchengrösse und Porengrösse besitzen, unbeweglich gemacht werden, wobei bei diesem Verfahren die in der Folge als Beispiele angeführten Ausfällungsmittel eingesetzt wurden:

Tanninsäure in 70% Äthanol,

Tanninsäure in 50% Aceton,

Tanninsäure in einer Mischung von 2 Teilen Wasser und 1 Teil Isopropanol,

synthetische Polyphenole in 50% Aceton

(diese Produkte sind unter dem Handelsnamen Tannia, Fixoflex, Fixin, Hysolad von der Harshaw Chemicals Ltd. erhältlich),

Aceton,

LT 24 Floccular (ein Ausflockungsmittel, das von der Allied Colloids Ltd., erhältlich ist),

wässrige Lösungen von Tanninsäure,

Salmin-sulphat,

Algininsäure,

Protaminsulfat,

Pektin,

Gallussäure,

Pyrogallol,

Polyäthylenglycol,

DEAE-dextran,

Dextransulfat,

Polygalacturon-säure und

Polyäthylenimin.

Die Amyloglucosidase der Handelsbezeichnung Agidex wurde auch nach dem erfindungsgemässen Verfahren auf porösen Titandioxid-Kügelchen der oben angegebenen Teilchengrösse und Porengrösse unbeweglich gemacht, indem man Formaldehyd als Vernetzungsmittel und Tanninsäure als ausfällendes Mittel verwendete und ferner auch indem man Diäthylpyrocarbonat als Vernetzungsmittel einsetzte und jedes der in der Form angeführten Beispiele für ausfällende Mittel verwendete: wässrige Tanninsäure, Salminsulfat, Algininsäure, Protaminsulfat, Pektin sowie Tanninsäure in 70% Äthanol. Ausserdem wurde Amyloglucosidase der Handelsbezeichnung Agidex auf porösen Titandioxid-Kügelchen der oben angegebenen Teilchengrösse und Porengrösse unbeweglich gemacht, indem man Tanninsäure als ausfällendes Mittel einsetzte und eine alkalische Oxydation zur Durchführung der Vernetzung verwendete. Beispiele für andere verwendbare Vernetzungsmittel sind Glyoxal und Bis-diazoniumsalze.

Nach dem erfindungsgemässen Verfahren wurde auch Glucose-oxidase auf Titandioxid-Kügelchen unbeweglich gemacht, indem man Tanninsäure und Diäthylpyrocarbonat verwendete und ferner wurde Papain auf Titandioxid-Kügelchen unbeweglich gemacht, indem man Tanninsäure und Formaldehyd verwendete.

Die optimalen Bedingungen, die angewandt werden, um eine biologisch aktive Substanz nach dem erfindungsgemässen Verfahren auf einem Trägermaterial unbeweglich zu machen, sind zumindest teilweise von den biochemischen Eigenschaften der biologisch aktiven Substanz abhängig. So sind beispielsweise die Auswahl des Ausfällungsmittels und des Vernetzungsmittels sowie die Vernetzungszeit durch Vorversuche auf die optimalen Verhältnisse abzustellen.

Die Zeit, die zum Unbeweglichmachen der biologischen Substanz benötigt wird, kann beispielsweise zwischen ungefähr einer halben Stunde und 24 Stunden liegen, wobei diese Zeit von der eingesetzten biologischen Substanz abhängig ist.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird vorzugsweise bei einer Temperatur von etwa 4°C ausgeführt. Es hat sich herausgestellt, dass eine Inaktivierung bestimmter biologischer

Substanzen auftreten kann, wenn man höhere Temperaturen verwendet. Jedoch hängt auch die Arbeitstemperatur von der eingesetzten biologischen Substanz ab und höher liegende Temperaturen oder tiefer liegende Temperaturen können gegebenenfalls auch geeignet sein.

Es hat sich herausgestellt, dass dann, wenn man Amyloglucosidase, nämlich das Handelsprodukt Agidex, auf porösen Titandioxid-Kügelchen der oben angegebenen Teilchengrösse und Porengrösse durch Ausfällung und Vernetzung unbeweglich macht, die besten Ergebnisse vom Gesichtspunkt der Enzymaktivität des unbeweglich gemachten Enzymes erreicht werden, indem man als Ausfällungsmittel Tanninsäure in Aceton verwendet und als Vernetzungsmittel Glutaraldehyd einsetzt. Beispielsweise hat es sich gezeigt, dass bei der Anwendung dieser speziellen Kombination an ausfällendem Mittel und Vernetzungsmittel die erreichte Enzymaktivität der Amyloglucosidase (Agidex) die auf den porösen Titandioxid-Kügelchen unbeweglich gemacht wurde bis zu 20% der Enzymaktivität eines wässrigen Enzympräparates, das als Quelle für Amyloglucosidase eingesetzt wird, betragen kann.

Indem man 5% Tanninsäure in einer Mischung aus 5 Teilen Aceton und 1 Teil Wasser als ausfällendes Mittel verwendete und Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel einsetzte, wurde ein Ansatz von Amyloglucosidase auf porösen Titandioxid-Kügelchen unbeweglich gemacht, wobei die Kügelchen die oben angegebene Teilchengrösse und Porengrösse besaßen, und als Ausgangsmaterial ungefähr 110 g Titandioxidkügelchen und 30 ml Agidex verwendet wurden, wobei man diese Materialien in eine Säule gab, die 60 cm hoch war und ein Volumen von 100 ml besass, so dass sich ein Bett ausbildete.

Eine mit Säure verdünnte Stärkelösung wurde durch die Säule mit einer Geschwindigkeit zwischen 52 und 230 ml pro Stunde geleitet. Die Säule wurde 8 Tage lang bei 60°C belassen und während dieser Zeit wurden 9 Liter der mit Säure verdünnten Stärkelösung behandelt.

Das Dextrose-Äquivalent des Produktes, das aus der Säule abgezogen wurde, was so hoch wie dasjenige, das erwartet wurde, wenn ein lösliches Enzym in dem gleichen Umwandlungsverfahren eingesetzt worden wäre. Das Dextrose-Äquivalent wird in der Fachsprache auch als «D.E.» abgekürzt, und es handelt sich dabei um ein in der Stärkeindustrie angewandtes Mass für das Ausmass der Hydrolyse von Glucosepolymeren, beispielsweise Stärkehydrolysaten. Dabei bedeutet ein Dextrose-Äquivalent von 100 vollständige Hydrolyse. Das Ausmass der Hydrolyse des Produktes war während 7 Tage dauernder Verwendung der Säule konstant.

Eine Säule, die poröse Titandioxid-Kügelchen enthielt, auf denen Amyloglucosidase unbeweglich gemacht worden war, wurde kontinuierlich verwendet, um eine Dextrinlösung während eines Zeitraumes von 7½ Tagen zu hydrolysieren. Das aus der Säule abgezogene Produkt hatte einen konstanten Wert bezüglich des Dextrose-Äquivalentes, und daraus sieht man, dass eine beinahe vollständige Umwandlung des Ausgangsmaterials in der Säule stattfindet. Anschliessend wurde die Säule so lange gewaschen, bis sie frei von Dextrinlösung war und sie wurde 5 Wochen lang bei Zimmertemperatur gelagert und dann zur Durchführung des gleichen Hydrolyseverfahrens erneut eingesetzt. Der Wert des Dextrose-Äquivalentes des aus der Säule bei der erneuten Verwendung abgezogenen Produktes stellte sich als gleich mit demjenigen heraus, der bei der ersten Verwendung erhalten wurde. Anschliessend wurde die Säule noch weitere 11 Wochen lang gelagert und es zeigte sich, dass auch dann keine drastische Abnahme bezüglich der Aktivität des Enzymes auftrat.

Es wurde ferner gefunden, dass Titandioxid-Kügelchen, auf denen Amyloglucosidase nach dem erfindungsgemässen

Verfahren unbeweglich gemacht worden war, entweder in einem festgepackten Bett, wie es oben beschrieben wurde, verwendet werden können, oder auch in einem Fließbett-Reaktor oder in einem gerührten Tank-Reaktor. Man kann annehmen, dass derartige Ergebnisse bei vielen aus Teilchen aufgebauten Trägermaterialien, auf welchen biologisch aktive Substanzen nach dem erfindungsgemässen Verfahren unbeweglich gemacht wurden, der Fall sein werden.

Amyloglucosidase wurde auf porösen Titandioxid-Kügelchen der oben angegebenen Teilchengrösse und der oben angegebenen Porengrösse unbeweglich gemacht, indem man zunächst eine Gefriertrocknung durchführte und dann ein ausfällendes Mittel einsetzte, um eine zeitweilige Zurückhaltung des Enzymes zu erreichen und anschliessend Glutaraldehyd zur Vernetzung verwendete.

Enzyme wurden in situ auf einer Säule, die poröse Titandioxid-Kügelchen enthielt, unbeweglich gemacht.

Während dieser in situ Immobilisierung kann ein Überschuss an biologisch aktiver Substanz, der nicht temporär auf dem Trägermaterial zurückgehalten wird, wiedergewonnen werden und erneut eingesetzt werden, indem man das Trägermaterial wäscht, beispielsweise unter Verwendung von Tanninsäure in Aceton, ehe man die Vernetzungsreaktion durchführt.

Verbrauchtes unbeweglich gemachtes Enzym wurde aus den Titandioxid-Kügelchen entfernt und diese Kügelchen wurden dann zu einem weiteren Unbeweglichmachen von Enzymen erneut verwendet. Konzentrierte Salpetersäure, konzentrierte Natronlauge oder ein Erhitzungsvorgang in einem Brennofen sind geeignete Arbeitsverfahren, um Enzym von den Kügelchen zu entfernen.

Sehr viele unterschiedliche biologisch aktive Substanzen können nach dem erfindungsgemässen Verfahren aus sehr vielen unterschiedlichen Trägermaterialien unbeweglich gemacht werden. Dementsprechend stellt das erfindungsgemässe Verfahren den Vorteil einer Beweglichkeit und guten Anpassungsfähigkeit gegenüber bekannten Verfahren zur Unbeweglichmachung dar, und zwar dahingehend, dass das Trägermaterial aus einem weiten Bereich unterschiedlicher Materialien ausgewählt werden kann, je nach den erwünschten Eigenschaften, die für das jeweilige Anwendungsgebiet besonders gut geeignet sind.

Die Erfindung sei nun anhand von Beispielen näher erläutert:

Beispiel 1

1 ml an Agidex-Lösung wurde zu 3 ml Kügelchen aus porösem Titandioxid zugegeben, wobei die Kügelchen eine durchschnittliche Teilchengrösse von 500 μ besaßen und 60% ihrer Poren einen Porendurchmesser im Bereich von 2 700 bis 10 000 Å aufwiesen. Die Lösung wurde zu den porösen Titandioxid-Kügelchen unter Kühlung mit einem Eisbad gegeben und man liess die Lösung sich gleichmässig über sämtliche Kügelchen verteilen. Anschliessend wurden 1,5 ml einer 5%igen Lösung von Tanninsäure in einer Mischung aus 5 Teilen Aceton und 1 Teil Wasser in einem Eisbad gekühlt und man gab dann diese gekühlte Lösung zu der oben beschriebenen Mischung zu und anschliessend 0,25 ml einer 50%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd. Sobald sämtliche Lösungen zugegeben worden waren, lag der Flüssigkeitsspiegel gerade oberhalb der Oberfläche der porösen Titandioxid-Kügelchen. Nach 5 Stunden wurden die Kügelchen aus dem Eisbad entfernt, man wusch sie und füllte sie in eine Säule ein, damit die Enzymaktivität dieser Kügelchen untersucht werden konnte. Eine Lösung von Dextrin wurde zu der Untersuchung der Eigenschaften der Säule herangezogen und wenn man die Aktivität der als Ausgangsmaterial eingesetzten Agidex-Lösung mit 100% annimmt, dann stellte

sich die offensichtliche Aktivität des auf der Säule unbeweglich gemachten Enzymes als 20% heraus.

Beispiel 2

4,5 ml einer Agidex-Lösung wurden auf 15 ml porösen Titandioxid-Kügelchen gleichmässig verteilt, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. 6,75 ml einer gekühlten 2%igen Lösung von Tanninsäure in Aceton, in die knapp vorher 1,05 ml einer 50%igen wässrigen Lösung an Glutaraldehyd einge-mischt wurden, setzte man zu und der dabei erhaltene steife Brei wurde gründlich durchgemischt. Nach 5 Stunden wusch man die Kügelchen und die Enzymaktivität wurde in der gleichen Weise, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist, getestet. Die aufscheinende Enzymaktivität des unbeweglich gemachten Enzymes stellte sich als ähnlich heraus, wie diejenige, die in Beispiel 1 erhalten wurde.

Beispiel 3

8 ml einer Agidex-Lösung, die im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt war, verteilte man gleichmässig auf 10 ml Titandioxid-Kügelchen, die die gleiche Teilchengrösse und die gleiche Porengrösse besaßen, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist und dann führte man eine Gefriertrocknung (Lyophilisierung) durch. 1,5 ml Agidex-Lösung wurde gleichmässig über 5 ml dieser lyophilisierten Kügelchen verteilt und dann setzte man 2,25 ml einer gekühlten 2%igen Lösung von Tanninsäure in Aceton und 0,35 ml eines 50%igen Glutaraldehydes zu und zwar in der gleichen Weise, wie dies in Beispiel 2 beschrieben ist. Die offensichtliche Aktivität des unbeweglich gemachten Enzymes stellte sich als um 15% höher heraus, als die Aktivität von unbeweglich gemachtem Enzym, das unter Verwendung von porösen Titandioxid-Kügelchen, jedoch ohne Anwendung eines Gefriertrocknungsschrittes erhalten wurde.

Beispiel 4

2 ml Agidex-Lösung wurden zu 5 ml porösen Glasteilchen unter Kühlung mit einem Eisbad gegeben und auf diesen gleichmässig verteilt. Die verwendeten Glasperlen waren Corning CPG 10-1250 mit einer Teilchengrösse von 36 bis 75 μ . 3 ml einer gekühlten 5%igen Lösung von Tanninsäure in 5 Teilen Aceton plus 1 Teil Wasser wurden zugesetzt und anschliessend 0,5 ml einer 50%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd. Nach 5 Stunden wurden die Glasteilchen gewaschen und die Enzymaktivität untersucht, indem man ein kleines Reaktionsgefäss für ansatzweises Arbeiten verwendete. Die festgestellte Aktivität des unbeweglich gemachten Enzymes betrug 93% der Aktivität des gleichen Enzymes, das unter Verwendung von Titandioxid-Kügelchen desjenigen Typs, wie er in den Beispielen 1, 2 und 3 angewandt wurde, unbeweglich gemacht worden war.

Beispiel 5

1 ml einer Agidex-Lösung wurde gleichmässig auf 3 ml Titandioxid-Kügelchen nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren verteilt. 1,5 ml einer gekühlten 10%igen Lösung von Fixoflex in einer Mischung aus 5 Teilen Aceton plus 1 Teil Wasser wurde dann zugesetzt und anschliessend gab man 0,25 ml einer 50%igen wässrigen Lösung an Glutaraldehyd zu. Das eingesetzte Fixoflex ist ein synthetisches Polyphenol. Nach 5 Stunden wurden die Kügelchen gewaschen und dann prüfte man das unbeweglich gemachte Enzym in der gleichen Weise, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Es stellte sich heraus, dass das unbeweglich gemachte Enzym 82% der Aktivität eines unbeweglich gemachten Enzymes besaß, das unter Verwendung von Tanninsäure in einer Mischung aus Aceton und Wasser als Ausfällungsmittel

nach einem entsprechenden Verfahren unbeweglich gemacht worden war.

Beispiel 6

1 ml einer wässrigen Lösung von Lactase (das Produkt Maxilact 75 mg/ml) wurde zu 3 ml porösen Titandioxid-Kügelchen zugesetzt und auf diesen Kügelchen gleichmässig verteilt. Anschliessend gab man 1.5 ml einer gekühlten 0,25%igen Lösung von Tanninsäure in 5 Teilen Aceton plus 1 Teil Wasser zu und dann setzte man 0,1 ml einer 20%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd zu. Nach 20 Minuten wurden die Perlen gewaschen und in eine Säule eingefüllt. Die erhaltene Aktivität des unbeweglich gemachten Enzymes betrug 11% der Aktivität des löslichen Enzymes, wenn man o-Nitro-phenyl- β -D-galactosid als Substrat zur Testung der Aktivität verwendete.

Beispiel 7

1,5 ml einer Agidex-Lösung wurden zu 5 ml porösen Titan-dioxid-Kügelchen eines durchschnittlichen Kugeldurchmessers von 500 μ gegeben, wobei man mit einem Eisbad kühlte und die Lösung gleichmässig über die Kügelchen verteilte. 2,25 ml einer gekühlten 2%igen Lösung an Tanninsäure wurden dann zugesetzt und anschliessend 0,35 ml einer 37%igen wässrigen Lösung von Formaldehyd. Nach 5 Stunden wurden die Kügelchen gewaschen und das unbeweglich gemachte Enzym wurde in der gleichen Weise getestet, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Es stellte sich heraus, dass dieses eine Enzymaktivität von 56% derjenigen besass, die ein in ähnlicher Weise unbeweglich gemachtes Enzym aufwies, das unter Verwendung von Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel unbeweglich gemacht worden war.

Beispiel 8

1 ml Agidex wurde gleichmässig über einen Pfropfen aus weichen Holzspänen verteilt, wobei das Spanvolumen 3 ml

betrug und das Material unter Verwendung eines Eisbades gekühlt wurde. 1,5 ml einer gekühlten 2%igen Lösung von Tanninsäure in Aceton, in die man 0,25 ml einer 50%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd unmittelbar vorher eingemischt hatte, wurden zugesetzt und die Materialien wurden gut durchgemischt. Nach 5 Stunden wurden die Holzspäne gewaschen und lose in eine kleine Säule eingefüllt, damit die Enzymaktivität in derjenigen Weise überprüft werden konnte, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Die so behandelten Holzspäne hatten eine Enzymaktivität, die 74% derjenigen Aktivität entsprach, die das nach dem Verfahren gemäss Beispiel 2 unbeweglich gemachte Enzym besass.

Beispiel 9

1,5 ml einer wässrigen Lösung des Enzymes Glucose-isomerase wurden auf 5 g porösen Titandioxid-Kügelchen unter Verwendung eines Eisbades zur Kühlung aufgesaugt. Das verwendete Enzympräparat der Glucose-isomerase wurde durch wässrige Extraktion von Maxazyme - GI 14,000 Zellen erhalten. Maxazyme - GI Zellen sind Zellen, die Glucose-isomerase enthalten. Die Herstellung derartiger Zellen ist in der USA-Patentschrift Nr. 3 834 988 beschrieben. Die verwendeten Titandioxid-Kügelchen besaßen einen durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 500 μ und 60% ihrer Poren hatten einen Durchmesser von 2700 bis 10 000 Å.

Das Enzym wurde ausgefällt und vernetzt, indem man 2,25 ml einer 3%igen Lösung von Tanninsäure in Aceton und 0,05 ml einer 50%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd verwendete.

Man liess die Materialien 1½ Stunden lang unter Verwendung eines Eisbades reagieren und wusch die Kügelchen dann und überprüfte sie auf ihre Enzymaktivität.

Es stellte sich heraus, dass die Kügelchen 35% derjenigen Enzymaktivität besaßen, die in der als Ausgangsmaterial eingesetzten Enzymlösung vorhanden war.