



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 268 975 A1

4(51) C 12 N 11/08

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

|      |                       |      |          |      |          |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | WP C 12 N / 247 339 5 | (22) | 19.01.83 | (44) | 14.06.89 |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|

---

(71) siehe (72)

(72) Schellenberger, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem., Amselweg 44, Halle, 4020; Kochmann, Werner, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Schwachula, Gerhard, Dr. Dipl.-Chem.; Dobritsch, Wolfgang, Dipl.-Chem.; Mansfeld, Johanna, Dr. Dipl.-Chem.; Erben, Matthias, Dipl.-Biochem.; Häupke, Klaus, Dipl.-Chem., DD

---

(54) Verfahren zur Herstellung von Enzym-Träger-Komplexen

---

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Enzym-Träger-Komplexen beschrieben, mit dessen Hilfe es möglich ist, in ein im wesentlichen aus vinylaromatischen Monomeren hergestelltes Polymer gleichzeitig Aminomethyl- und Aldehydgruppen einzuführen und an dasselbe Enzyme oder Proteine kovalent zu binden. Das Verfahren besteht darin, daß in das Polymere durch aufeinanderfolgende polymeranaloge Reaktionen zunächst Chlormethyl- und dann Hexamethylentetraaminomethyl-Gruppen eingeführt werden und diese dann durch Einwirkung einer nicht zu ihrer vollständigen Umsetzung zu Aminomethylgruppen ausreichenden Menge Säure simultan zum Teil zu Aldehyd- und zum Teil zu Aminomethyl-Gruppen umgesetzt werden. Derart gemischt funktionalisierte Polymere können direkt mit Enzymen oder anderen Biokatalysatoren zur Reaktion gebracht werden, wodurch letztere kovalent an das Polymere gebunden werden. Mit Hilfe der immobilisierten Enzyme können chemische Umsetzungen, die für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie Bedeutung haben, speziell der enzymatische Abbau vorhydrolysierter Stärke zu Glucose, die Invertierung von Saccharose und die Gewinnung verschiedener L-Aminosäuren aus ihren synthetisch hergestellten D,L-Formen, besonders vorteilhaft durchgeführt werden.

### Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Enzym-Träger-Komplexen, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein im wesentlichen aus Benzylhexamethylentetraamino-Einheiten bestehendes Copolymeres mit einer nicht zur vollständigen Umsetzung derselben in Benzylamin-gruppen ausreichenden Mengen Säure in einem organischen Lösungsmittel behandelt und anschließend ohne weitere Aktivierung mit einem Enzym oder Protein über kovalente Bindungen beladen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die zur Zersetzung der Benzylhexamethylentetraamino-Gruppen verwendete Säuremenge geringer ist, als 4 Mol für eine dem Molekulargewicht der Monomereinheit entsprechende Gewichtsmenge des trockenen Polymeren.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Zersetzung der Benzylhexamethylentetraamino-Gruppen Salzsäure angewendet wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein mit Glucoamylase beladenes funktionalisiertes Polymeres zur enzymatischen Spaltung von Stärke oder deren Vorhydrolysaten verwendet wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein mit Invertase beladenes funktionalisiertes Polymeres zur enzymatischen Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose verwendet wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein mit Aminoacylase beladenes funktionalisiertes Polymeres zur Gewinnung verschiedener L-Aminosäuren aus ihren synthetisch herstellbaren D, L-Formen verwendet wird.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung funktionalisierter Polymerer auf Styrenbasis, an die Enzyme oder andere Biokatalysatoren ohne weitere Vorbehandlung kovalent gebunden werden können. Die so herstellbaren Enzym-Träger-Komplexe können in der Lebensmittelindustrie sowie in der chemischen und pharmazeutischen Industrie angewendet werden. Solche Anwendungsfälle sind beispielsweise die enzymatische Spaltung vorhydrolysierte Stärke zu hochwertiger Glucose, die Invertierung von Saccharose und die Herstellung verschiedener L-Aminosäuren aus ihren D, L-Formen.

### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

In den DD-PS 141977, 142131 und 149679 sind Verfahren zur Herstellung von Trägern auf Styrenbasis und zur Bindung von Enzymen an dieselben beschrieben. Ferner wird an dieser Stelle dargestellt, daß die Anwendung von Enzymen in immobilisierter Form besondere technische und ökonomische Vorteile bedingt, die sich vor allem in einer wesentlichen Enzymsparnis, einer Stabilisierung der Enzyme, einer erhöhten Endprodukt-Reinheit, erheblich kürzeren Reaktions- und Verweilzeiten sowie in der Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozeßführung mit den damit verbundenen Vorteilen äußern.

Bei der Immobilisierung von Enzymen muß nun aber auf jeden Fall solchen Verfahren der Vorzug gegeben werden, bei denen das Enzym durch Hauptvalenzverbindungen an den Träger gebunden ist, weil erfahrungsgemäß nur so eine Inaktivierung des Enzym-Träger-Komplexes durch allmähliches Auswaschen des Enzyms verhindert werden kann.

Derartige Verfahren sind in der Literatur vielfach beschrieben (G. BAUM, *Biotechnol. Bioeng.* 17, [1975], 253-270; G. MANECKE, W. BEIER, *Angew. Makromol. Chem.* 97, [1981], 23-33; G. P. ROYER, *Reviews in Catal. Rev.-Sci. Eng.* 22, [1980], 29-73; G. MANECKE, H. G. VOGT, *Biochemie* 62, [1980], 603-613; R. GOLDMAN, L. GOLDSTEIN, E. KATCHALSKI in „*Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports* [Stark, G. A. Ed.], Acad. Press, New York [1971]), wobei speziell die Bindung des Enzyms über am Träger fixierte Aldehydgruppen, die durch Umsetzung eines Aminogruppen enthaltenden Polymeren mit Gutaraldehyd eingeführt werden, zu günstigen Trägern führt (vgl. o. g. Veröffentlichung von BAUM und DD-PS 149679).

Bei der Herstellung solcher Trägermaterialien existiert aber der Nachteil, daß die beispielsweise als Zwischenprodukt bei der in DD-PS 79152 beschriebene Synthese relativ leicht zugänglichen Polymeren mit Aminomethylgruppen noch einem zusätzlichen Syntheseschritt, nämlich der Behandlung mit Gutaraldehyd unterworfen werden müssen. Andere Verfahren zur Aktivierung von Trägern zwecks kovalenter Bindung von Enzymen sind z. B. von GOLDMAN et al. „*Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports*“ (G. A. Stark Ed.), Acad. Press, New York (1971); WELBOECK und JAWOREK (*Chimia* 29 [1975], 109); MANECKE (*Chimia* 28 [1974], 467) und LYNN („*Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides*“, (H. H. Weetall Ed.), Marcel Dekker Inc., New York [1975], 1, 1) angegeben. Sie alle bestehen darin, daß der bereits funktionalisierte Träger mit einem Agens behandelt wird, das mit ihm hauptvalenzmäßig reagiert und zusätzlich eine reaktive chemische Gruppierung enthält, die das später zugegebene Enzym kovalent bindet.

Die bekannten Verfahren zur effektiven Bindung des Enzyms an den Träger erfordern also grundsätzlich die Anwendung eines Hilfsstoffes wie Gutaraldehyd usw. und eines zusätzlichen Arbeitsganges. Dabei muß eventuell mit toxikologisch bedenklichen Substanzen wie Chinonen oder Triazinderivaten gearbeitet werden, so daß der Einsatz des gebildeten Enzym-Träger-Komplexes nicht zur Herstellung oder Behandlung von Lebensmitteln oder Pharmazeutika geeignet ist oder nur nach aufwendigen Reinigungsoperationen möglich wird.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Trägers für immobilisierte Enzyme, das ökonomisch günstig und ohne zusätzliche Aktivierung des Trägers Enzyme stabil und in aktiver Form zu binden vermag.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die oben genannten Nachteile der bisher bekannten technischen Problemlösungen dadurch zu vermeiden, daß ein Träger verwendet wird, der von vornherein direkt an das Polymergerüst gebundene Aldehydgruppen enthält, mit denen funktionelle Gruppen des zu bindenden Enzyms unter Ausbildung von Hauptvalenzbindungen reagieren können, und daß ein den oben angegebenen Zwecken entsprechendes Trägerpolymerisat neben den Aldehydgruppen noch primäre oder sekundäre Aminogruppen enthält.

Bei dem Versuch, Trägerpolymere auf Styren-Basis zum Zweck der Immobilisierung von Enzymen an denselben herzustellen, die am Polymergerüst nebeneinander Aldehydgruppen zur kovalenten Bindung dieser Enzyme und (vorzüglich primäre) Aminogruppen enthalten sollten, ergab sich überraschenderweise, daß es genügt, bei dem in DD-PS 149679 genannten und an sich bekannten (DD-PS 79 152) Verfahren der Zersetzung eines Reaktionsproduktes aus mit Divinylbenzen vernetztem Poly(chlormethylstyren) mit Hexamethylentetramin (Urotropin) mittels Säure die angewandte Säuremenge gezielt herabzusetzen, um in einem Reaktionsschritt das in erwünschter Weise gemischt funktionalisierte Trägermaterial zu erhalten. Während man mit dem Ziel, ein nur Aminomethylgruppen enthaltendes Polymeres (d.h. vernetztes Poly(aminomethylstyren)), zu erhalten, eine Menge an Umsetzungsprodukt aus vernetztem Poly(chlormethylstyren) mit Urotropin, die einer molaren Menge der Monomereinheit entspricht, mit mindestens 500 ml konzentrierter Salzsäure in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Methanol) durch Kochen am Rückfluß umsetzt, bewirkt eine Senkung der Salzsäuremenge auf weniger als 50% der angegebenen Menge eine nachweisbare Bildung von Aldehydgruppen; bei einer Senkung auf weniger als 25% der oben angegebenen Menge treten Aldehyd- und Aminomethylgruppen in vergleichbaren Mengen auf.

Es konnte festgestellt werden, daß die so gewonnenen gemischt funktionalisierten Trägerpolymeren in der gleichen Weise zur Bildung eines Enzym-Träger-Komplexes mit technisch ausnutzbarer Aktivität befähigt sind, wie die nach einem herkömmlichen Verfahren hergestellten und ausschließlich Aminomethylgruppen enthaltenden Polymeren nach einer Aktivierung mit Glutaraldehyd, Benzochinon oder anderen Mitteln. Dabei wurde eine ähnliche Abhängigkeit der Aktivität des Enzym-Träger-Komplexes von der physikalischen Struktur des Trägerpolymeren beobachtet, wie sie in DD-PS 149679 beschrieben ist, d.h. es ergab sich, daß nur poröse Trägerpolymere eine technisch ausnutzbare Aktivität vermitteln, und unter ihnen solche, deren Porenstruktur durch Verwendung von 0,75 bis 0,90 Gew.-Teilen eines porenbildenden Hilfsstoffes pro Gew.-Teil Monomere, die sich wiederum aus vinylaromatischen Stoffen mit einer Vinylgruppe und vernetzenden Monomeren mit mindestens zwei nicht konjugierten Vinylgruppen im Massenverhältnis 8:2 bis 9,5:0,5 zusammensetzen, determiniert wird, die besten Ergebnisse zeigen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Trägerpolymere für immobilisierte Enzyme geht dementsprechend folgendermaßen vor sich:

Es wird ein Gemisch aus monovinylaromatischen Verbindungen und vernetzenden Monomeren, dem vorzugsweise ein porenbildender Hilfsstoff zugesetzt wird, wobei für diese drei Komponenten vorteilhaft die oben angegebenen gegenseitigen Verhältnisse eingehalten werden, hergestellt. Als monovinylaromatische Komponenten kommen vorzüglich Styren oder ein Alkylderivat desselben in Frage, als Vernetzer vorzüglich Divinylbenzen oder eine andere Verbindung mit zwei oder mehr nicht konjugierten Doppelbindungen. Als porenbildender Hilfsstoff kommt jeder Stoff in Frage, der mit den Monomeren mischbar ist, aber das entstehende Polymere nicht löst und so wenig quillt, daß bei der Polymerisation eine Phasentrennung eintreten muß. Es werden vorzüglich paraffinische Kohlenwasserstoffe im Siedebereich von 336 bis 523 K (auch als Gemische) verwendet.

Die Polymerisationsreaktion wird radikalisch initiiert, indem das beschriebene Gemisch in Gegenwart eines in der Wärme in Radikale zerfallenden Stoffes wie Dibenzoylperoxid oder Azo-bis(isobuttersäurenitril) auf Temperaturen zwischen 323 und 423 K erwärmt wird. Diese Polymerisation wird vorzugsweise nach der bekannten Technologie der Suspensions-(Perl-)polymerisation durchgeführt. In das entstandene vernetzte Polymere werden nach bekannten Methoden an den aromatischen Kern gebundene Chlormethylgruppen eingeführt, wobei vorzugsweise die in GB-PS 654 706, 700 470, 649 851 und 679 852 beschriebene Reaktion mit Monochlordimethylether in Gegenwart von Friedel-Crafts-Katalysatoren benutzt wird.

Das so erhaltene chlormethylierte Polymere wird dann in einem organischen Lösungsmittel bei 303 bis 373 K mit Hexamethylentetramin umgesetzt. Als Lösungsmittel kommen vorzugsweise niedere Alkohole und Halogenkohlenwasserstoffe in Frage, die bei einer Reaktionstemperatur siedend, so daß die Umsetzung unter Rückfluß vor sich geht. Anschließend wird das so umgesetzte Produkt mit einem organischen Lösungsmittel (vorzüglich Methanol) oder mit Wasser gewaschen und dann auf die erfindungsgemäße Weise zersetzt; der Zersetzung kann eine Nachaminierung mit Ammoniak zur Überführung der bei der Reaktion mit Hexamethylentetramin nicht umgesetzten Chlormethylgruppen zu Aminomethylgruppen vorangehen:

Eine Menge des feuchten Harzes, die 100 g Trockensubstanz enthält, wird mit weniger als 120 (vorzugsweise 30 bis 70) ml konzentrierter Salzsäure in etwa 500 ml Methanol mindestens 2 (vorzugsweise 4 bis 8) Stunden unter Erwärmen bis zum Rückfluß gerührt. Dann wird es von der Flüssigkeit getrennt und mit Wasser säurefrei gewaschen. Das so hergestellte Trägerpolymere, das in Form wasserfeuchter opaker Kügelchen (vorzugsweise im Korngrößenbereich von 0,2 bis 0,8 mm) vorliegt und in dem IR-spektroskopisch oder nach anderen Methoden der organischen Analyse Aldehydgruppen und Aminomethylgruppen nebeneinander nachgewiesen werden können, wird folgendermaßen mit dem zu immobilisierenden Enzym beladen:

Eine gegebene Menge des feuchten Trägermaterials wird in einer dem jeweiligen Enzym angepaßten Pufferlösung mit einer entsprechenden Enzymmenge mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vier- bis fünfmaligem Waschen mit einem Puffersystem (vorzugsweise Natriumacetatpuffer pH 5,0/1 M NaCl) wird die Probe unter Wasser bei 277 K aufbewahrt. Die Prüfung der Aktivität des Enzym-Träger-Komplexes erfolgt nach einer für den jeweiligen Fall spezifischen Methode; bei immobilisierter Glucoamylase wird beispielsweise folgende Arbeitsweise angewendet:

Der feuchte Enzym-Träger-Komplex wird in einer temperierbaren Fritte mit 1%iger Stärkelösung gerührt, und die entstandene Glucose durch Umsetzung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure bestimmt.

Es ist bemerkenswert, daß schon sehr geringe relative Mengen an Aldehydgruppen, wie sie bei Anwendung von Salzsäuremengen, die an der oberen Grenze des angegebenen Bereiches liegen, erhalten werden, für eine kovalente Bindung befriedigender Enzymaktivitäten ausreichen. Ferner ist es interessant, daß bei den erfindungsgemäßen Trägerpolymeren die bisher übliche Umsetzung mit einem die Bindung des Enzyms vermittelnden Agens nicht nur unnötig, sondern sogar in bezug auf die Aktivität des Enzym-Träger-Komplexes schädlich ist.

#### Ausführungsbeispiele

Das folgende Beispiel demonstriert das erfindungsgemäße Verfahren und seinen Effekt, ohne den Umfang der Anwendbarkeit der Erfindung beschreiben zu wollen:

In einem beheizbaren Gefäß mit regelbarem Rührwerk und Rückflußkühler werden 500 ml Wasser vorgelegt und darin 20 g NaCl sowie 5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  aufgelöst. Dann wird durch Zugabe von 1,75 g NaOH eine  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Suspension hergestellt, zu der bei 338 K ein Gemisch aus 114,0 g Styren; 25,3 g eines technischen Divinylbenzens, das 54,2 Gew.-% Divinylbenzen und 38,5 Gew.-% Ethylvinylbenzen enthält; 112,5 g eines Gemisches aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen im Siedebereich von 443 bis 498 K und 0,75 g Azo- bis (isobuttersäurenitril) gegeben wird. Dieses Gemisch wird durch Rühren zu Tröpfchen von etwa 0,35 mm mittlerem Durchmesser verteilt. Unter fortgesetztem Rühren wird 4 Stunden bei 343 K und 4 Stunden bei 373 K polymerisiert. Dann wird das Polymerisat abgetrennt, mit verdünnter Säure und mit Wasser gewaschen und in ein Filterrohr mit Dampfmantel gebracht. Sowohl durch den Mantel, wie auch durch das Polymerisat werden Wasserdampf von etwa 0,12 MPa Druck geleitet, bis das Kondensat des Dampfes, der das Polymerisat durchströmt hatte, keine organischen Bestandteile mehr enthält. Das nun kreidig weiß aussehende Polymerisat wird bei 363 K getrocknet und die Kornfraktion von 0,2 bis 0,5 mm zur weiteren Verwendung abseibt.

50 g dieses Polymerisates werden mit 250 ml Monochlordimethylether und 10 g Zinntetrachlorid 6 Stunden unter Rückflußkühlung gerührt. Dann wird das chlormethylierte Polymerisat abgetrennt und mit Methanol gewaschen, bis der Ablauf säurefrei ist. Das lufttrockene Material wird dann in ein Gemisch von 360 ml Methanol und 60 g Hexamethylentetramin gegeben und 8 Stunden bei 303 K gerührt. Dann wird es wieder abgetrennt, mit Methanol gewaschen und mit 400 ml 25%iger Ammoniaklösung 6 Stunden bei 313 K gerührt. Nach erneutem Abfiltrieren und Waschen mit Wasser wird das Material schließlich mit einem Gemisch aus 360 ml Methanol und 40 ml konzentrierter Salzsäure (etwa 30%ig) 6 Stunden unter Rühren am Rückfluß gekocht. Dann wird es erneut abfiltriert und mit Wasser säurefrei gewaschen.

Das so erhaltene Polymermaterial enthält nach der IR-spektroskopischen Untersuchung einen Anteil an Aldehydgruppen, der mit dem an Aminomethylgruppen vergleichbar ist. Der Gehalt an ersteren wurde nach R. ULBRICH, A. SCHELENBERGER, Z. Chem. 19 (1979), 261 bestimmt. Der anteilige Gehalt an letzteren geht aus einer Bestimmung der Anionenaustauschkapazität, die zu einem Wert von 2,79 mol pro g Trockensubstanz führte und damit auswies, daß nur etwa  $\frac{2}{3}$  der nach dem elementaranalytisch gemessenen Umsetzungsgrad bei der Chlormethylierung bei vollständiger Zersetzung zu erwartenden Aminomethylgruppen entstanden waren, hervor.

Das aldehydgruppenhaltige Trägerpolymerisat wurde folgendermaßen mit Glucoamylase beladen:

400 mg des feuchten Trägermaterials wurden in 3 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 7,0 gegeben. Nach Hinzufügen von 50 µl Glucoamylase (Firma NOVO Industries) (EC 3.2.1.3.) — was einem Aktivitätsangebot von etwa 1500 U/g entsprach — wurde die Probe 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über eine Fritte kurz abgesaugt und fünfmal mit 25 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0/1 M NaCl gewaschen. Zum Schluß wurde kurz abgesaugt und die so vorbereitete Probe unter Wasser bei 277 K aufbewahrt.

Die Leistungsfähigkeit des so gewonnenen Enzym-Träger-Komplexes wurde in folgend beschriebener Weise geprüft:

##### a) Aktivitätstest

30 mg des mit Enzym beladenen feuchten Trägermaterials wurden in eine temperierbare, mit einem Glasrührer versehene Fritte gegeben. Nach Zugabe von 20 ml 1%iger Zulkowsky-Stärkelösung in 25 mM Natriumacetatpuffer pH 4,5 wurde bei 310 K 15 min schnell gerührt und dann abgesaugt. Von der Probe wurden 2 ml abgenommen und die Anzahl der reduzierenden Gruppen mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (P. BERNFELD, Methods Enzymol. 1 [1955], 145) bestimmt. Die Aktivität des Glucoamylase-Polystyren-Komplexes beträgt 210 U/g.

##### b) Stabilitätstest

Zum Zwecke der Ermittlung der Temperaturstabilität wurden Proben des Enzym-Träger-Komplexes nach obiger Beschreibung bei erhöhten Temperaturen (315–370 K) inkubiert und deren Aktivität gemessen. Außerdem erfolgte im batch-Versuch die Umsetzung einer Probe des Enzym-Träger-Komplexes mit Vorhydrolysat von säureaufgeschlossener Maisstärke. Anschließend wurde die Aktivität der Probe nach der oben beschriebenen Verfahrensweise bestimmt.

Die Stabilität ist besser, als die eines auf konventionellem Wege hergestellten Träger-Enzym-Komplexes.

Das gleiche, nebeneinander Aldehyd- und Aminomethylgruppen enthaltende Trägermaterial wurde folgendermaßen mit Invertase beladen:

500 g des feuchten Trägermaterials wurden in einer Lösung von 30 mg Invertase (EC 3.2.1.26) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Fa. Boehringer Mannheim, 140 U/mg Lyophilisat) in 6,0 ml SÖRENSEN-Phosphatpuffer pH 7,0 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Absaugen der Enzymlösung über eine Fritte wurde der Enzym-Träger-Komplex fünfmal mit 1 M NaCl/0,025 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 und dreimal mit 0,025 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 gewaschen und bei 277 K unter Wasser aufbewahrt. Die Aktivität des hergestellten Invertase-Polystyren-Komplexes beträgt 1130 U/g, wobei das einer relativen Aktivität von 99% entspricht.

Die Aktivität des erfindungsgemäß hergestellten Invertase-Polystyren-Komplexes wurde in einer 0,15 M Saccharoselösung in 0,025 M Natriumacetatpuffer pH 4,5 bei 297 K durch enzymatische Bestimmung der freigesetzten Glucosemenge mit Hilfe der GOD-POD-Methode ermittelt, wobei 1 U die Freisetzung von 1 µmol Glucose/min und 1 µmol Fructose/min unter den oben angegebenen Bedingungen katalysiert.

Das erfindungsgemäße aldehydgruppenhaltige Trägermaterial wurde wie folgt mit Aminoacylase beladen:  
500g feuchtes Trägermaterial wurden in einer Lösung von 50mg Aminoacylase (EC 3.4.1.14) aus Schweinenieren (Fa. Serva, Heidelberg, 15 U/mg) in 6,0ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 293K 4 Stunden gerührt. Nach dem Abtrennen der Enzymlösung vom Trägermaterial mit Hilfe einer Fritte wurde der Enzym-Träger-Komplex fünfmal mit 1 M NaCl/0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 und dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und anschließend bei 277 K unter Wasser aufbewahrt.  
Zur Aktivitätsbestimmung des Enzym-Träger-Komplexes diente eine 0,1 M N-Acetyl-L-alaninlösung mit 1 mM  $\text{CoCl}_2$  in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0 bei 310 K unter Ermittlung der Menge an freigesetztem L-Alanin mit Hilfe der Ninhydrin-Methode (S. MOORE, W. H. STEIN [1954], J. Biol. Chem. 211, 907), wobei 1 U die Freisetzung von 1  $\mu\text{Mol}$  L-Alanin unter den oben angegebenen Bedingungen katalysiert.  
Die Aktivität des erfindungsgemäß hergestellten Aminoacylase-Polystyren-Komplexes beträgt 85 U/g.