



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 11/14

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 329 380 7

(22) 08.06.89

(44) 21.11.90

(71) VE Kombinat Stärke und Kartoffelveredlung, Mansfelder Straße 58, Halle, 4020, DD

(72) Bergk, Karl-Heinz, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Janowski, Frank, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Fischer, Gunter, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Schirner, Rolf, Dr.-Ing. Dipl.-Ing.-Ök.; Kirstein, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(73) VE Kombinat Stärke und Kartoffelveredlung, Halle, 4020; Martin-Luther-Universität Halle, Halle, 4000, DD

(54) Verfahren zur Herstellung immobilisierter Biokatalysatoren

(55) Biokatalysatoren; Enzyme; Enzym-Trägerkomplexe

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung immobilisierter Biokatalysatoren. Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung preiswerter Biokatalysatoren zu entwickeln, die bei festphasenbiochemischen Prozessen effektiv angewendet werden können. Die Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung immobilisierter Biokatalysatoren auf der Basis von porösen kristallinen silicatischen Phasen enthaltenden Formkörpern. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß biologisch aktive Verbindungen adsorptiv oder koordinativ auf Formkörper aufgebracht werden, die aus konzentrisch angeordneten kristallinen Phasen bestehen, wobei die äußere Phase porös ist und eine Schichtdicke zwischen 1 und 500 µm besitzt. Bevorzugt werden als Formkörper Kugeln mit Teilchengrößen zwischen 0,1 und 1 mm, Oberflächen von 20 bis 100 m²/g, Porenvolumen von 0,4 bis 1,0 cm³/g und Porendurchmessern von 20 bis 100 nm verwendet.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung immobilisierter Biokatalysatoren, **gekennzeichnet dadurch**, daß biologisch aktive Verbindungen durch adsorptive oder koordinative Bindung auf Formkörper aufgebracht werden, die aus konzentrisch angeordneten kristallinen silicatischen Phasen bestehen, wobei die äußere Phase porös ist und eine Schichtdicke zwischen 1 und 500 µm besitzt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Formkörper Kugeln mit Teilchengrößen zwischen 0,1 und 1 mm, Oberflächen von 20 bis 100 m²/g, Porenvolumen von 0,4 bis 1,0 cm³/g und Porendurchmessern von 20 bis 100 nm verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biokatalysatoren für festphasenbiochemische Prozesse.

Charakteristik des Standes der Technik

Immobilisierte Biokatalysatoren haben bei der Durchführung industrieller biochemischer Prozesse eine zunehmende Bedeutung erlangt.

Als Trägermaterial für Biokatalysatoren wird neben organischem Material, zumeist Polymere, anorganisches Material verwendet. Eine Vielzahl von Biokatalysatoren wird unter der Verwendung von Kieselgelen, makroporösen Gläsern, Keramiken sowie anderen industriell hergestellten anorganischen Materialien, wie z. B. Zielgelsplitt, oder natürlich vorkommenden Materialien, wie z. B. Bentonit, Kieselgur o. a., hergestellt.

Alle verwendeten anorganischen Materialien verfügen in der Regel über innere Oberflächen von 30 bis 120 m²/g sowie Porenvolumen von 0,3 bis 1,5 cm³/g und vor allem Makroporen mit Porengrößen oberhalb 20 nm. Dabei verhalten sich Porengröße und innere Oberfläche umgekehrt proportional zueinander. Im allgemeinen muß die Porengröße so gewählt werden, daß noch eine genügend große Oberfläche für die Immobilisierung biologisch aktiver Komponenten zur Verfügung steht.

Ein weiteres Problem ist die Herstellung immobilisierter Biokatalysatoren in einer für technische Anwendungen in Reaktoren geeigneten Form. Da es hydrodynamisch ungünstig ist, Granulate einzusetzen, müssen die anorganischen Träger in der Regel verformt werden. Eine Ausnahme sind dabei sphärische makroporöse Gläser. Der relativ hohe Preis makroporöser Gläser und der unter der Anwendung makroporöser Gläser hergestellten Biokatalysatoren auf der Grundlage preiswert verfügbarer Enzyme schränkt deren breite industrielle Anwendung für biotechnologische Prozesse erheblich ein.

Bekannt ist weiterhin die Herstellung von Biokatalysatoren unter Verwendung von Sinterkeramiken. Auch Sinterkeramiken zählen zu den teuren Trägermaterialien, so daß eine breite industrielle Anwendung auch für diese Klasse von Enzym-Trägerkomplexen begrenzt wird.

Bekannt ist auch die Verwendung von weitporigen Kieselgelen (DD 141978, DE 2726188) für die kovalente Bindung von Enzymen zur Herstellung von Biokatalysatoren. Derartig hergestellte Biokatalysatoren haben eine geringe mechanische Festigkeit sowie chemische Stabilität und sind häufig nur als Granulate verfügbar, so daß leicht ein mechanischer Abrieb oder schlechte hydrodynamische Eigenschaften resultieren. Die technologischen Nachteile schränken die industrielle Nutzung derartiger Biokatalysatoren erheblich ein.

Bekannt sind weiterhin Vorschläge zur Herstellung von Biokatalysatoren auf der Basis von makroporösen Metalloxiden. Aufgrund ihrer begrenzten Stabilität in einem engen pH-Wertintervall sind Metalloxide nur für die Herstellung solcher Biokatalysatoren geeignet, bei denen das biokatalytische Aktivitätsoptimum im Stabilitätsbereich des Trägermaterials liegt. Andererseits würde das Arbeiten am pH-Aktivitätsoptimum zu einer auflösungsbedingten Verkürzung der Katalysatorstandzeiten führen, die für einen ökonomischen Einsatz nicht tragbar sind.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung preiswerter Biokatalysatoren zu entwickeln, die bei festphasenbiochemischen Prozessen effektiv angewendet werden können.

Darlegung des Wesens der erfindungsgemäßen Lösung

Die Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung immobilisierter Biokatalysatoren auf der Basis von porösen kristallinen silicatischen Phasen enthaltenden Formkörpern.

Erfindungsgemäß werden biologisch aktive Verbindungen durch adsorptive oder koordinative Bindung auf Formkörper aufgebracht, die aus konzentrisch angeordneten kristallinen silicatischen Phasen bestehen, wobei die äußere Phase porös ist und eine Schichtdicke zwischen 1 und 500 µm besitzt.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Formkörper werden nach DD hergestellt, indem Formkörper mit glatter Oberfläche (als Gegensatz zum Bruchstück) aus amorph erstarrten Natron-Kalk-Gläsern der Zusammensetzung 12 bis 17 Ma.-% Na₂O, 6 bis 14 Ma.-% CaO, 60 bis 80 Ma.-% SiO₂ neben Al₂O₃, MgO, K₂O und B₂O₃ in Konzentrationen unter 10 Ma.-% unter hydrothermalen Bedingungen bei 50 bis 250 °C in Gegenwart von Alkaliionen, Erdalkaliionen und Silizium enthaltenden Verbindungen im alkalischen Medium über 1 bis 500 Stunden umgesetzt werden, wobei die molare Zusammensetzung des Gesamtansatzes 0,5 bis 7,5 Alkalioxid, 1 bis 6 Erdalkalioxid, 8 SiO₂ und 150 bis 350 H₂O beträgt.

Unter Formkörpern der erfindungsgemäßen Lösung werden Kugeln, Rohre, Vollstäbe, Platten, Zylinder oder ähnliche geometrische Körper mit glatter Oberfläche verstanden.

Für die erfindungsgemäße Herstellung von Biokatalysatoren sind als Formkörper handelsübliche leicht zugängliche Vollglaskugeln oder Stäbe mit Teilchengrößen von 0,2 bis 1,2 mm nach einer Klassierung in engen Teilchengrößengrenzen besonders geeignet. Die Immobilisierung von biospezifischen Liganden, bevorzugt Enzyme, kann adsorptiv oder gegebenenfalls nach Funktionalisierung und Aktivierung der anorganischen Matrix in bekannter Weise (zum Beispiel nach M. Lynn: Inorganic Support Intermediates – Covalent Coupling of Inorganic Supports. In H. H. Weetall [Herausgeber] Immobilized Enzymes/ Antigens, Antibodies, and Peptides. M. Dekker, New York 1975) durch kovalente Bindung erfolgen.

Eine besonders bevorzugte Variante für die Immobilisierung katalytisch aktiver biologischer Komponenten ist die Bindung mit Glutardialdehyd über die mit γ -Aminopropyltriethoxysilan funktionalisierten porösen Formkörper.

Auf der Basis der erfindungsgemäß verwendeten porösen, kristalline silicatische Phasen enthaltenden Formkörper kann durch die Immobilisierung von Enzymen, z. B. Hydrolasen, Proteasen, Lipasen oder Racemasen u. a., ein weites Spektrum von Biokatalysatoren hergestellt werden.

Durch die Wahl einer geeigneten geometrischen Gestalt der verwendeten Formkörper können die entsprechenden Biokatalysatoren verfahrenstechnischen Bedingungen optimal angepaßt werden. Die erfindungsgemäß hergestellten Biokatalysatoren vereinen daher die Vorteile günstiger hydrodynamischer Eigenschaften mit kurzen Transportwegen, daß bekannt ist, daß Enzyme bevorzugt in der Nähe der äußeren Oberfläche immobilisiert werden (M. M. Hossain, D. D. Do: Fundamental Studies of Glucose Oxidase Immobilization on Controlled Pore Glass. Biotechnol. Bioeng. Vol. XXVII (1985) 842–851). Auf diese Weise wird die poröse kristalline Silicatschicht der eingesetzten Formkörper effektiv genutzt.

Beispiel 1

Funktionalisierung und Aktivierung

1 kg kugelförmige poröse, kristalline silicatische Phasen enthaltende Formkörper, hergestellt nach DD auf der Basis von Natron-Kalk-Glas mit einem Teilchendurchmesser von 0,8 bis 1 mm, einer spezifischen Oberfläche von $60 \text{ m}^2/\text{g}$, einem Porenvolumen von $0,8 \text{ cm}^3/\text{g}$ und einem mittleren Porendurchmesser von 50 nm werden mit 3 l einer 10%igen Lösung von γ -Aminopropyltriethoxysilan in Wasser versetzt und eine Stunde zur Entfernung von Lufteinschlüssen im porösen Träger unter Vakuum gehalten. Danach wird die Mischung für 3 Stunden bei einer Temperatur von 70°C gehalten. Das auf diese Weise behandelte Trägermaterial wird dann abdekantiert und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 2 Stunden bei 100°C getrocknet.

Zur Aktivierung wird der silanisierte Träger in einer 8%igen Lösung von Glutardialdehyd in Phosphatpuffer ($0,03 \text{ mol/l}$, pH 7,0) suspendiert und 1 Stunde unter Vakuum gehalten. Anschließend wird der suspendierte Träger noch 2 Stunden bei Raumtemperatur in der Lösung belassen. Danach wird der Feststoff abdekantiert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Der feuchte funktionalisierte und aktivierte Träger wird zur Bindung von biologisch aktiven Proteinen eingesetzt.

Beispiel 2

100 g des nach Beispiel 2 funktionalisierten und aktivierten Trägers werden mit 300 ml einer Lösung von Glucoamylase ($1,7 \text{ mkat/l}$) in Phosphatpuffer ($0,03 \text{ mol/l}$, pH 7,0) 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wird der erhaltene Biokatalysator mit Phosphatpuffer mehrmals mit destilliertem Wasser und zuletzt mit Acetatpuffer ($0,1 \text{ mol/l}$, pH 4,5) gewaschen und in diesem Puffer bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die erzielte Immobilisierungsausbeute beträgt $0,5 \text{ mkat/kg}$.

Beispiel 3

Zur Charakterisierung der Aktivität eines nach Beispiel 2 hergestellten Enzym-Träger-Komplexes werden 5 ml des Biokatalysators mit 115 cm^3 Maisstärkehydrolysat (30% Feststoffgehalt, säureverflüssigt) bei 323 K gerührt. Der Verzuckerungsgrad wird durch HPLC analysiert; die erhaltenen Ergebnisse zeigt die nachfolgende Übersicht.

Zeit [Stunden]	DP ₇	DP ₆	DP ₅	DP ₄	DP ₃	DP ₂	Glucose	DE
	[%]							
0	9,4	21,5	13,1	15,7	16,2	14,6	7,8	32,0
1	—	2,9	3,7	7,0	14,0	21,8	50,5	69,0
2	—	—	—	3,4	6,7	23,9	66,0	81,0
3	—	—	—	—	3,3	21,8	74,8	86,8
4	—	—	—	—	—	20,4	79,5	89,7
6	—	—	—	—	—	16,3	83,7	91,9
8	—	—	—	—	—	12,4	87,6	93,8
12	—	—	—	—	—	8,0	91,9	95,9

Beispiel 4

100 g des nach Beispiel 1 funktionalisierten Trägers werden mit 300 ml einer Invertaselösung ($3,33 \text{ mkat/l}$) analog zu Beispiel 2 umgesetzt. Die erreichte Aktivität des erhaltenen Enzym-Träger-Komplexes liegt bei $0,8 \text{ mkat/kg}$.

Beispiel 5

100 g des gemäß Beispiel 1 verwendeten Trägers werden mit einer Lösung von 15 g Glycidooxytriethoxysilan in 300 cm^3 Toluol unter Vakuum versetzt und die Mischung 3 Stunden auf Siedetemperatur erhitzt. Danach wird mehrfach mit Toluol, Aceton und destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend werden 300 cm^3 einer Lösung von β -Galaktosidase (2 mkat/l) in o. a. Phosphatpuffer zugegeben und die Mischung unter gelegentlichem Schütteln 24 Stunden bei 277 K zur Reaktion gebracht. Danach wird der erhaltene Biokatalysator je 3 mal mit dem Kupplungspuffer, destilliertem Wasser und mit Acetatpuffer (pH 4,0, $0,1 \text{ mol/l}$) gewaschen. Die Ausbeute beträgt $0,45 \text{ mkat/kg}$.