



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 149 679

Wirtschaftspatent

Ertellt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 149 679 (44) 22.07.81 3(51) C 12 N 11/08
(21) WP C 12 N / 219 993 (22) 28.03.80

-
- (71) Institut für Enzymologie und Technische Mikrobiologie,
Berlin, DD
- (72) Schellenberger, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Fischer, Jens,
Dr.rer.nat. Dipl.-Chem.; Häupke, Klaus, Dr.rer.nat.
Dipl.-Chem.; Schwachula, Gerhard, Dr.sc.nat. Dipl.-Chem., DD
- (73) siehe (72)
- (74) Dipl.-Chem. Brigitte Thomas, Institut für Enzymologie und
Technische Mikrobiologie, 1017 Berlin, Alt-Stralau 62
-

(54) Verfahren zur Herstellung poröser Enzym-Polystyrol-Komplexe

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung poröser Enzym-Polystyrol-Komplexe für den großtechnischen Einsatz in der Lebensmittelindustrie sowie in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Ziel der Erfindung ist es, ökonomisch günstig Enzym-Polystyrol-Komplexe mit hoher Aktivität herzustellen, die den Anforderungen beim Einsatz in großtechnischen Prozessen gerecht werden. Aufgabe der Erfindung ist es, den Prozeß der Copolymerenherstellung so zu beeinflussen, daß ohne zusätzliche Arbeitsschritte stark poröse Produkte entstehen. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß für die Herstellung des Copolymeren ein Verhältnis zwischen den Monomeren mit einer Vinylgruppe und den Monomeren mit mehreren Vinylgruppen von 8 : 2 bis 9,5 : 0,5 Gewichtsteilen eingesetzt und daß ein porenbildender Inertstoff in einer Menge von 0,75 bis 0,90 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil der Monomeren verwendet wird. Als Inertstoffe finden aliphatische Kohlenwasserstoffe oder ein Aliphatengemisch mit einem Siedebereich von 80 bis 300 °C, insbesondere von 170 bis 225 °C, Anwendung. Die Copolymerisation wird in wäßriger Phase durchgeführt. Nach Funktionalisierung der Copolymeren an den aromatischen Kernen und der Aktivierung erfolgt die Enzymbindung. Das erfindungsgemäß hergestellte poröse Copolymere ist für die Bindung von Glucoamylase besonders gut geeignet. Ihr Einsatz zur enzymatischen Hydrolyse von Stärke führt zu qualitativ hochwertiger Glucose.

a) Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung poröser Enzym-Polystyrol-Komplexe

b) Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung poröser Enzym-Polystyrol-Komplexe für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie sowie in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Das poröse Trägermaterial eignet sich besonders für die Herstellung von Glucoamylase-Polystyrol-Komplexen, die beim Einsatz in der Stärkeindustrie die Bildung qualitativ hochwertiger Glucose bewirken.

c) Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

In den DD-PS 141 977 und 142 131

ein Verfahren zur Bindung von Enzymen an hochpolymere Träger auf Basis von vernetztem Polystyrol beschrieben und nachgewiesen, daß die Anwendung von Enzymen in immobilisierter Form eine technologisch und ökonomisch günstige Art der Durchführung biochemischer Reaktionen ist. Die DD-PS 144 558 beinhaltet ein Verfahren zur Steigerung der Aktivität von Enzym-Polystyrol-Komplexen durch Ultraschallbehandlung des Trägermaterials vor der Beladung mit Enzym. Die genannten Verfahren haben den Nachteil, daß die erzeugten Produkte beim Einsatz in technischen Prozessen, z. B. bei der Stärkekonvertierung, noch nicht zu befriedigenden Ergebnissen führen.

Die Ultraschallbehandlung des Trägermaterials bewirkt zwar eine Aktivitätserhöhung der Enzym-Träger-Komplexe, wirkt sich aber durch den zusätzlichen Arbeitsschritt ökonomisch ungünstig auf den Herstellungsprozeß aus.

d) Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ökonomisch günstig Enzym-Polystyrol-Komplexe mit hoher Aktivität herzustellen, die den Anforderungen beim Einsatz in großtechnischen Prozessen gerecht werden.

e) Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, den Prozeß der Copolymerenherstellung so zu beeinflussen, daß ohne zusätzliche Arbeitsschritte stark poröse Produkte entstehen. Diese Produkte müssen hohe Enzymaktivitäten binden können und so abriebfest sein, daß sie auch in gepackten Säulenreaktoren im technischen Maßstab eingesetzt werden können.

Erfindungsgemäß lassen sich diese Copolymeren herstellen durch Umsetzung von Styrol und/oder einem substituierten Styrol und/oder anderen Monomeren mit einer Vinylgruppe mit einer Divinylverbindung, wie z. B. Divinylbenzol, und/oder einer anderen Verbindung mit zwei oder mehr Vinylgruppen in Gegenwart eines Hilfsstoffes, der unter den Bedingungen der Polymerisation nicht reagiert, mit den Monomeren mischbar ist, das Polymere aber nicht löst. Die Struktur (ausgewiesen z. B. durch die spezifische Oberfläche, das Gesamtporenvolumen und die Porengrößenverteilung) des Copolymeren läßt sich durch das gegenseitige Massenverhältnis der monofunktionellen Monomeren (z. B. Styrol), der polyfunktionellen Monomeren (z. B. Divinylbenzol) und des Hilfsstoffes (z. B. aliphatischer Kohlenwasserstoff oder Aliphatengemisch im Siedebereich 80 bis 300 °C, insbesondere 170 bis 225 °C), steuern. Das Verhältnis zwischen den Monomeren mit einer und den Monomeren

mit mehreren Vinylgruppen soll in den Grenzen 8 : 2 und 9,5 : 0,5 Gewichtsteilen liegen und der inerte, porenbildende Hilfsstoff soll in einer Menge von 0,75 bis 0,90 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil der Monomeren eingesetzt werden.

Das so hergestellte Copolymere ist charakterisierbar durch eine spezifische Oberfläche von $50 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$. Es läßt sich durch polymeranaloge Reaktionen an den aromatischen Kernen leicht funktionalisieren, wodurch sie als Träger für Enzyme geeignet werden. Durch die polymeranalogen Reaktionen bleibt der poröse Charakter prinzipiell erhalten, obwohl sich die einzelnen Meßwerte, durch die die Porosität charakterisiert wird, quantitativ in einer für Art und Umfang der Funktionalisierung charakteristischen Weise verändern.

Im Falle der als Beispiel herangezogenen Nutzung eines Trägerpolymeren auf Styrol-Divinylbenzol-Basis zur Immobilisierung von Glucoamylase kommen als polymeranaloge Reaktionen die Chlormethylierung des Copolymeren (z. B. mit Monochlordimethyläther) und die Aminierung mit Ammoniak oder verschiedenen Aminen in Frage. Bei der Aminierung sei als eine Variante die Umsetzung mit Hexamethylentetramin (Urotropin), die Nachaminierung mit Ammoniak und die Zersetzung mit methanolischer Salzsäure als Mittel zur Herstellung eines Trägerpolymeren mit Aminomethylgruppen aus einem chlormethylierten Styrol-Divinylbenzol-Copolymeren genannt. Bei diesen Reaktionen vermindert sich z. B. die spezifische Oberfläche des Ausgangspolymeren auf 50 %.

Es wurde festgestellt, daß auf dem erfindungsgemäß hergestellten Trägermaterial fixierte Glucoamylase bei der Hydrolyse einer mit Säure oder Alpha-Amylase vorhydrolysierten Stärke zu Glucose neben einem hohen Umsatz pro Zeiteinheit ein so reines Reaktionsprodukt erzeugt, daß keine Reinigungsoperationen (z. B. Umkristallisationen)

mehr nötig sind, bzw. der Umfang dieser Reinigungsoperationen geringer ist als bei einem Produkt, das durch Anwendung fixierter Glucoamylase auf einem bekannten Träger entstanden ist.

f) Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele demonstrieren die Herstellungsweise des Trägers und die Immobilisierung des Enzyms sowie die Prüfung der biokatalytischen Wirksamkeit des Träger-Enzym-Komplexes und geben die Konsequenzen an, die eine Abweichung von der erfindungsgemäßen Rezeptur für die Aktivität des Komplexes und andere anwendungstechnisch wichtige Eigenschaften hat.

Beispiel 1

Herstellung des erfindungsgemäßen Träger-Enzym-Komplexes:

Herstellung der Polymermatrix

In einem heizbaren 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 65 °C ein Gemisch aus 114,0 g Styrol; 25,3 g eines technischen Divinylbenzols, das 54,2 Gew.-% Divinylbenzol und 38,5 Gew.-% Äthylvinylbenzol enthält; 112,5 g eines Gemisches aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen im Siedebereich 170 bis 225 °C und 0,75 g Azobisisobutyronitril zugegeben wird. Dieses Gemisch wird durch Rühren zu Tröpfchen von etwa 0,35 mm mittlerem Durchmesser verteilt. Unter fortgesetztem Rühren wird 4 Stunden bei 70 °C und dann 4 Stunden bei 190 °C polymerisiert. Dann wird das Polymerisat durch Filtration abgetrennt, mit verdünnter Säure und mit Wasser gewaschen und in ein Filterrohr mit Dampfmantel gebracht. Sowohl der Mantel wie auch das Polymerisat werden dann so lange mit Wasserdampf von etwa 1,2 at Druck durchströmt, bis im Kondensat des Dampfes, der das Polymerisat durchströmt hatte, keine organischen Stoffe

fe mehr nachweisbar sind. Das nun kreidig weiß aussehende Polymerisat wird bei 90 °C getrocknet und die Kornfraktion 0,2 bis 0,5 mm zur weiteren Verwendung abgesiebt. Als Kontrolle für die Erreichung der gewünschten Struktur wird die spezifische Oberfläche des Polymerisats nach der von Haul und Dümbgen (Chem. Ing. Techn. 32, (1960), 349 und 35, (1963), 586) angegebenen Methode gemessen. Sie soll $50 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$ betragen.

Funktionalisierung der Polymermatrix

50 g des, wie oben beschrieben, hergestellten porösen Suspensionspolymerisats werden mit 250 ml Monochlordimethyläther und 10 g Zinntetrachlorid 6 Stunden bei 58 °C unter Rückflußkühlung gerührt. Dann wird das chlormethylierte Polymerisat abfiltriert und nacheinander mit Methanol und Aceton gewaschen. Das lufttrockene Material wird dann in ein Gemisch von 360 ml Methanol und 60 g Hexamethylentetramin (Urotropin) gegeben und 8 Stunden bei 30 °C gerührt. Dann wird es wieder abfiltriert, mit Methanol gewaschen und mit 400 ml 25 %iger Ammoniaklösung 6 Stunden unter Rückflußkühlung gerührt. Nach erneutem Abfiltrieren und Waschen mit Wasser wird das Material schließlich mit einem Gemisch von 300 ml Methanol und 150 ml konzentrierter (mindestens 30 %iger) Salzsäure 6 Stunden unter Rühren am Rückfluß gekocht. Es wird erneut abfiltriert und das nun mit Aminomethylgruppen substituierte Polymerisat mit Wasser säurefrei gewaschen.

Bindung des Enzyms an den Träger

1 g aminierte Polymerisat wird mit 100 mg Benzochinon in 8 ml Methanol 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend gewaschen (J. Fischer, R. Ulbrich, A. Schellenberger (1978), Acta Biol. Med. Germ. 37, 1413 - 1424). Das aktivierte Polymere wird dann 3 Stunden mit einer Glucoamylaselösung (580 U in 6 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0) gerührt und mit Phosphatpuffer - 1 M NaCl - solange gewaschen, bis im Waschwasser keine Enzymaktivität

mehr nachweisbar ist. Ausgewaschene Aktivität 17 U.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Träger-Enzym-Komplexes

Zur Aktivitätsbestimmung wird das Enzymharz mit 1 %iger Zulkowsky-Stärke in 25 mM Acetatpuffer, pH 4,5, bei 45 °C gerührt. Die Aktivität (286 U/g Enzymharz) wird aus der gebildeten Glucosemenge berechnet.

Reinheit des erzeugten Produktes

Der Endwert der Hydrolyse von 30 %iger säureverflüssigter Stärke in Glucose beträgt bei Verwendung der immobilisierten Glucoamylase 97 bis 99 DE (maximal erreichbar 100 DE) und bei Einsatz der Enzym-Träger-Komplexe gemäß den im Stand der Technik angegebenen Verfahren 89 bis 91 DE.

Tabelle 1 zeigt die Aktivitäten von Aminomethylpolystyrol-Glucoamylase-Komplexen (Benzochinonaktivierung der Träger).

Beispiel	Zusammensetzung		Aktivität (U/g)
	Divinylbenzol (Gew.-%)	Inertstoff (Gew.-%)	
2	50	30	11,5
3	50	50	12,1
4	15	50	63,3
5	21,5	53	144,0

Tabelle 2 zeigt die Aktivitäten von Äthylendiaminomethylpolystyrol-Glucoamylase-Komplexen (Benzochinonaktivierung der Träger).

Beispiel	Zusammensetzung		Aktivität (U/g)
	Divinylbenzol (Gew.-%)	Inertstoff (Gew.-%)	
7	50	30	8,0
8	50	50	15,2
9	15	50	51,0
10	21,5	53	130,4

Beispiele 2 bis 5

Die Beispiele 2 bis 5 (Tabelle 1) demonstrieren den Abfall der enzymatischen Aktivität des Träger-Enzym-Komplexes bei Abweichungen von der erfindungsgemäßen Rezeptur für die Polymermatrix.

In der gleichen Weise, wie im Beispiel 1 beschrieben, werden Polymerisate aus den in Tabelle 1 angegebenen Gemischen von Divinylbenzol und Hilfsstoffen hergestellt, unter den ebenfalls dort angegebenen Bedingungen funktionalisiert, mit Enzym beladen und auf ihre Aktivität geprüft. Die Angaben der enzymatischen Aktivität in Tabelle 1 beweisen, daß alle anderen Rezepturen zu schlechteren Ergebnissen als die Rezeptur gemäß Beispiel 1 führen. Das nach Beispiel 5 hergestellte Trägermaterial ist so porös, daß es zwischen den Fingern zerreibbar, also für praktische Zwecke nicht anwendbar ist.

Beispiel 6

Eine gemäß Beispiel 1 hergestellte Polymermatrix wird, wie dort beschrieben, chlormethyliert, aber dann folgendermaßen mit Äthylendiaminomethylgruppen substituiert: Das gemäß Beispiel 1 hergestellte chlormethylierte Polymerisat wird bei 60 °C getrocknet und dann mit einem Gemisch von 375 g Äthylendiamin und 125 g Wasser 16 Stunden bei 95 °C unter Rückflußkühlung gerührt. Dann wird es abfiltriert, nacheinander mit Wasser und mit Methanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Beladung mit dem Enzym erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben. Die ebenfalls gemäß Beispiel 1 durchgeführte Aktivitätsprüfung ergibt einen Wert von 230 U/g. Die Reinheit des erhaltenen Produktes bei der Hydrolyse von 30 %iger säureverflüssigter Stärke beträgt 98 bis 99 DE.

Beispiele 7 bis 10

Polymermatrices gemäß den Beispielen 7, 8, 9 und 10 werden

in der in Beispiel 6 beschriebenen Weise mit Äthylendiaminomethylgruppen substituiert und mit Enzym beladen. Tabelle 2 zeigt, daß auch bei diesem Trägertyp die Rezeptur für die Polymermatrix gemäß Beispiel 1 zu der höchsten enzymatischen Aktivität des Träger-Enzym-Komplexes und zu einem Produkt hoher Reinheit führt. Die mechanisch unzulängliche Variante gemäß Beispiel 10 bleibt für den praktischen Einsatz ausgeschlossen (Tabelle 2).

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung poröser Enzym-Polystyrol-Komplexe durch Copolymerisation von Monomeren mit einer und Monomeren mit mehreren Vinylgruppen in Gegenwart eines Inertstoffes, Funktionalisierung des Copolymeren an den aromatischen Kernen, Aktivierung und Enzymbindung, dadurch gekennzeichnet, daß für die Herstellung des Copolymeren ein Verhältnis zwischen den Monomeren mit einer und den Monomeren mit mehreren Vinylgruppen von 8 : 2 bis 9,5 : 0,5 Gewichtsteilen gewählt und der Inertstoff in einer Menge von 0,75 bis 0,90 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil der Monomeren verwendet wird, die Funktionalisierung des porösen Copolymeren mittels polymeranaloger Reaktionen und Aktivierung sowie Enzymbindung auf bekannte Weise erfolgen.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Copolymerisat aus Styrol, Äthylvinylbenzol und Divinylbenzol verwendet wird.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Inertstoff ein aliphatischer Kohlenwasserstoff oder ein Aliphatengemisch mit einem Siedebereich von 80 bis 300 °C, insbesondere von 170 bis 225 °C, verwendet wird.
4. Verfahren nach den Punkten 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Copolymerisation in wäßriger Suspension durchgeführt wird.
5. Verfahren nach den Punkten 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß durch polymeranaloge Reaktionen in das Copolymer Aminomethylgruppen oder Äthylendiaminomethylgruppen oder andere Polyalkylenpolyaminomethylgruppen eingeführt werden.

6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das mit Glucoamylase beladene funktionalisierte Copolymere zur enzymatischen Hydrolyse von Stärke oder deren Teilhydrolysaten verwendet wird.