(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 297 837 A5

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 11/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 325 283 1	(22)	27.01.89	(44)	23.01.92

(71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Kirstein, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Seidel, Steffen, , Dr. rer. nat. Dipl.-Päd.; Müller, Hans-Georg, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Schülke, Ulrich, Dr. sc. Dipl.-Chem., DE
(73) Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin; Zentralinstitut für Anorganische Chemie, O - 1199 Berlin, DE
(74) Zentralinstitut für Molekularbiologie, Robert-Rößle-Straße 10, O - 1115 Berlin, DE

(54) Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen

(55) Immobilisierung; Enzyme; Träger; Ankersubstanz; Metallionen; Chelatbildner; Reagenzien, bifunktionell; Nachbehandlung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen. Anwendungsgebiet ist die Biotechnologie. Erfindungsgemäß werden Enzyme direkt oder über eine Ankersubstanz an ein schwerlösliches Trägermaterial gebunden, das mehrwertige Metallionen an der Oberfläche enthält. Die Bindung erfolgt über heterobifunktionelle Verbindungen, in denen eine Gruppe direkt oder nach Aktivierung mit dem Enzym oder gegebenenfalls einer Ankersubstanz und eine zweite Gruppe unter Chelatbildung mit den Metallionen des Trägermaterials reagiert. Durch eventuelle Nachbehandlung des Immobilisates mit anderen bifunktionellen Verbindungen wird die Oberfläche weiterhin modifiziert.

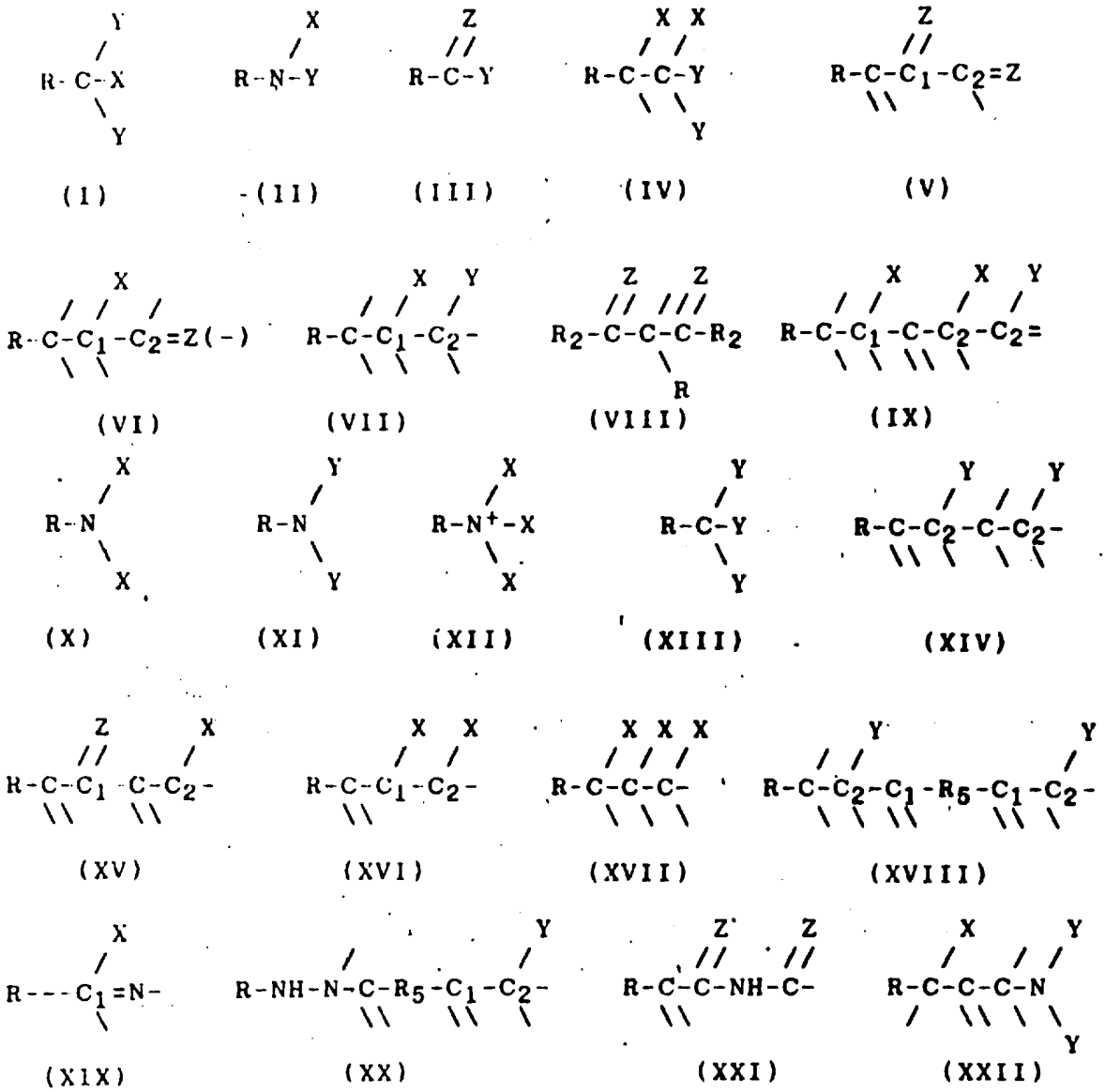
ISSN 0433-6461

9 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen an schwerlösliche Trägermaterialien, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bindung des Enzyms, gegebenenfalls über eine Ankersubstanz, an Trägermaterialien erfolgt, die an inneren oder äußeren Oberflächen Ionen mehrwertiger Metalle enthalten, wobei die Bindung der Enzyme oder gegebenenfalls der Ankersubstanz, mittels heterobifunktioneller Reagenzien erfolgt, in denen eine funktionelle Gruppe, gegebenenfalls unter Verwendung eines Aktivierungsreagenz, mit dem zu immobilisierenden Enzym oder gegebenenfalls der Ankersubstanz und die zweite Gruppierung mit den Metallionen der Matrix reagiert und daß gegebenenfalls die Oberfläche des Trägers durch Nachbehandlung mit einer weiteren bifunktionellen Verbindung modifiziert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die verwendeten Trägermaterialien anorganische Materialien, organische Materialien oder Composite aus beiden sind, bei denen sich an der äußeren Oberfläche und/oder an der Oberfläche von Poren im Innern des Materials, gegebenenfalls als nachträglich aufgebrachte Überzugsschicht, Ionen mehrwertiger Metalle befinden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die metallionenhaltige Überzugsschicht auf dem Trägermaterial durch dessen Umsetzung mit einer metallorganischen Verbindung einem Metallsalz, einem Metallkomplex, einem Metallhalogenid, einem Oxy- oder Hydroxysalz erzeugt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die anorganischen Trägermaterialien schwer lösliche natürliche oder synthetisch hergestellte Oxide, Salze, Mineralien, Gläser oder Keramiken sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Trägermaterial ein ferromagnetisches Material ist oder ferromagnetische Bereiche enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als organische Trägermaterialien Polymere eingesetzt werden, die mit Metallverbindungen nach Anspruch 3 unter Bildung einer metallionenhaltigen Überzugsschicht reagieren.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägermaterialien anorganisch-organische Composite sind, in denen die Eigenschaften der anorganischen Träger, wie Abriebfestigkeit oder Verformbarkeit durch das organische Material, insbesondere durch Polymere verbessert werden, wobei dieses organische Material ein Trägermaterial nach Anspruch 6 oder ein nicht reaktives Material oder ein Material ist, in dem oder an dem nach bekannten Verfahren Enzyme oder andere Biomaterialien immobilisiert sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägermaterialien anorganisch-organische Composite sind, in denen ein organisches Trägermaterial nach Anspruch 6 durch Zusätze von anorganischem Material in seinen Eigenschaften, wie zum Beispiel Druckfestigkeit verbessert wird, wobei das organische Material nach Anspruch 6 zur Immobilisierung von Enzymen genutzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die mehrwertigen Metallionen an der Oberfläche der Träger Ionen von Elementen der zweiten bis fünften Haupt- oder der Nebengruppen des Periodensystems, einschließlich der Lanthaniden sind.
10. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein heterobifunktionelles Reagenz verwendet wird, das als eine funktionelle Gruppe, die mit dem Enzym oder der Ankersubstanz direkt reagiert, eine Säureazid-, eine Säurehalogenid-, eine Säureanhydrid-, eine Isocyanat-, eine Isothiocyanat-, eine aktivierte Ester-, eine Disulfid-, eine Aldehyd- oder eine Diazogruppe enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein heterobifunktionelles Reagenz verwendet wird, das als eine funktionelle Gruppe, die nach Reaktion mit einem Aktivierungsreagenz mit dem Enzym oder gegebenenfalls der Ankersubstanz reagiert, eine Amino-, Hydrazino-, Säureamid-, -hydrazid-, -halogenid-, -anhydrid-, -thioamid-, -imid-, Ester-, Lactam-, Lacton-, Carboxyl-, Carbonyl-, Nitril-, Oxim-, Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Halogen-, Alken-, Alkin- oder eine CH-acide Gruppe enthält.
12. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein heterobifunktionelle Reagenz verwendet wird, das als zweite funktionelle Gruppierung eine chelatbildende Gruppierung enthält, die aus einer oder mehreren Gruppen mit der Fähigkeit zur Bildung von Hauptvalenzbindungen und mindestens einer Gruppe mit der Fähigkeit zur Bildung von Nebenvalenzbindungen besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 12, **dadurch gekennzeichnet, daß die chelatbildende Gruppierung** Molekülbereiche mit Strukturen nach Formel I–XXII im heterobifunktionellen Reagenz besitzt,



wobei R den Molekülteil darstellt, an dem sich über aliphatische, aromatische oder heterocyclische, gegebenenfalls substituierte oder Heteroatome enthaltende Gruppierungen gebunden, die zur kovalenten Enzymbindung notwendige funktionelle Gruppe befindet, und

X: $-OR_1$, $-SR_1$, $-NR_1R_2$, $-NO$, $-NR_1OH$, $-R_4OH$,

Y: $-COOR_1$, $-R_4-COOR_1$, $-O-R_4-COOR_1$, $-NH-R_4-COOR_1$, $-S-R_4COOR_1$, $-CONR_1R_2$, $-CONHOH$, $-PO_3H_2$, $-R_4-PO_3H_2$, $-NHOH$, $-SO_3H$, $-OH$, $-H$,

Z: $=O$, $=S$, $=NH$, $=NOH$, $=N-$ in einem heterocyclischen Ring,

R_1: $-H$, ein Alkylrest,

R_2: $-H$, $-NH_2$, ein Alkylrest, ein cyclischer Molekülrest,

R_3: ein aromatischer oder heterocyclischer Molekülrest,

R_4: ein Alkylen-, Arylen- oder Aralkylenrest,

R_5: eine $-N=N-$ oder eine $-CH=N-$ Gruppe und

C_1 und C_2 Teile eines Kettenmoleküls, eines Ringes oder Ringsystems sein können.

14. Verfahren nach Anspruch 1, 12 und 13, **dadurch gekennzeichnet, daß als chelatbildende** Gruppierungen Molekülstrukturen genutzt werden, bei denen die Ausbildung von Haupt- und Nebenvalenzen zwischen der chelatbildenden Gruppierung, gegebenenfalls chelatbildender Gruppen im Enzymmolekül und Metallionen des Trägers zu einer fünf- oder sechsgliedrigen Ringstruktur führt.

15. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst über die Chelatbildung mit dem Träger reagiert und dann mit dem Enzym zur Reaktion gebracht wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst an das Enzym gebunden wird und anschließend durch In-Berührung-Bringen des Trägers mit dem so modifizierten Enzym die Immobilisierung vollzogen wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zunächst Ankermoleküle an den Träger immobilisiert werden und daß die Enzymmoleküle anschließend in bekannter Weise durch intermolekulare Wechselwirkungen oder kovalente Bindung an diese Ankermoleküle gebunden werden.
18. Verfahren nach Anspruch 1 und 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Ankermoleküle Moleküle von Substanzen benutzt werden, die in affinitätschromatographischen Trennprozessen an Festphasen gebunden zur Isolierung oder Reinigung von Enzymen eingesetzt werden.
19. Verfahren nach Anspruch 1 und 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Ankermoleküle natürliche oder synthetische Polymere eingesetzt werden, an die in bekannter Weise das Enzym gebunden wird, die gegebenenfalls durch Wechselwirkung mit Substraten oder dem Enzym die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen und/oder durch Wechselwirkung mit dem Reaktionsmedium zu einer bevorzugten Anreicherung des Biokatalysators in einer Phase flüssiger Mehrphasensysteme führen.
20. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die bifunktionelle Verbindung zur Nachbehandlung des Trägers eine chelatbildende Gruppierung nach Anspruch 12–14 und eine Gruppierung enthält, die die Löslichkeit des Trägers im Reaktionsmedium verringert, die das Verteilungsgleichgewicht feinverteilter Trägerpartikel in flüssigen Zweiphasensystemen beeinflußt und/oder durch Wechselwirkungen mit dem Enzym oder mit Substratmolekülen die Reaktionsgeschwindigkeit und/oder Selektivität des Biokatalysators beeinflußt.
21. Verfahren nach Anspruch 1 und 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß die bifunktionelle Verbindung zur Nachbehandlung des Trägers neben der Chelatgruppe nach Anspruch 12–14 einen aliphatischen oder einen aromatischen Kohlenwasserstoffrest, einen heterocyclischen Rest, eine ionenaustauschende Gruppe, eine chelatbildende Gruppe, eine optisch aktive Gruppe, eine Gruppe, die Cofaktoren binden, reduzieren oder oxydieren kann, einen Kohlehydratrest, eine Ester- oder Amidgruppe enthält.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen an schwerlösliche Trägermaterialien. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Herstellung von Immobilisaten, die in der Biotechnologie (Stoffwandlung und Festphasendiagnostik) eingesetzt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Biomakromoleküle an schwerlösliche Feststoffe durch Adsorption, Ionenaustausch oder kovalente Bindung immobilisiert werden. Die letztere Methode ist besonders gut zur Erzeugung stabiler Bindungen geeignet. Kovalente Bindung erfolgt nach einer chemischen Modifizierung (Aktivierung) des Feststoffes und/oder der zu immobilisierenden Verbindung. Als Feststoffe werden natürliche Stoffe (Mineralien, Chitin, Zellulose u. a.) und synthetische anorganische Stoffe (Glas, Silikate u. a.) oder organische Polymere eingesetzt. Für kontinuierliche technisch durchgeführte Prozesse werden anorganische Feststoffe als Trägermaterialien aufgrund ihrer guten mechanischen Eigenschaften bevorzugt. Sie erfordern jedoch als ersten Schritt der Immobilisierung in der Regel eine Funktionalisierung durch reaktionsfähige Überzüge.
Es sind Verfahren zum Aufbringen organischer Beschichtungen auf organische oder anorganische Feststoffe bekannt, die unter Verwendung von bifunktionellen Silanen zu einer Funktionalisierung führen. Dabei wird ein Silan der allgemeinen Formel $(R_1O)_3SiR_2$ (mit R_1 einem Alkyl-, R_2 einem Vinyl-, γ-Aminopropyl-, Epoxi-, Alkyl-, SH- oder anderem Rest) in organischer oder wäßrig-organischer Lösung eingesetzt und das Primärprodukt unter Bildung von C–O–Si, Metall-O-Si- und/oder Si-O-Si-Bindungen bei erhöhter Temperatur kondensiert. Beides, die Verwendung organischer Lösungsmittel und Kondensation bei erhöhter Temperatur sind relativ kostenaufwendig ebenso wie die Herstellung der Silane (U. Deschler, P. Kleinschmitt und P. Panster Angew. Chem. 98 [1986] 237–253).
Die Immobilisierung von Biomakromolekülen an derart silanisierte Träger erfolgt durch direkte Kopplung (z. B. Reaktion von Aminogruppen des Biomakromoleküls mit Epoxisilan), nach Modifizierung der Überzugsschicht (z. B. γ-Aminopropylsilan durch bifunktionelle Verbindungen wie Dialdehyde, Carbodiimide, Chinone u. a.) oder nach Modifizierung des Biomakromoleküls (z. B. Perjodatoxidation von Glycoproteinen zu aldehydhaltigen Proteinen, Einführung von polymerisierbaren Doppelbindungen u. a.). Nachteil dieses Verfahrens ist der mehrstufige Prozeß der Silanisierung und Kondensation.

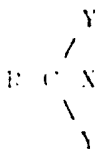
Weiterhin sind seit einigen Jahren Verfahren zum Patent angemeldet worden, in denen die Silanisierung durch Anwendung heterobifunktioneller Verbindungen ersetzt wird (EP 218506, EP 273756, DDR-Pat. WP c 12 N/3045800 und WP c 12 N/3045786). Diese heterobifunktionellen Verbindungen enthalten im Molekül mindestens eine reaktive Gruppe, die direkt oder nach Aktivierung mit dem Enzym reagiert sowie eine oder mehrere phosphorhaltige Gruppen, die mit einem metallionenhaltigen Trägermaterial wenig dissoziierende Verbindungen ergeben (Chelate). Mit diesem Verfahren sind gute Immobilisierungsausbeuten erzielt worden. Die Auswaschstabilität der immobilisierten Enzyme ist aber nicht ausreichend. Darüber hinaus ist es gelungen (EP 273756) durch kurzkettige Phosphonsäurederivate einen nachträglichen Oberflächenschutz von oxidischen Oberflächen zu erzielen, der die Auflösung von Trägermaterialien bei niedrigen und hohen *p*H-Werten weitgehend unterdrückt.
Bei Chelatbildnern, die keinen Phosphor enthalten, ist bekannt, daß besonders stabile Komplexe entstehen, wenn die Bildung der Komplexe unter Ausbildung von 5- und 6-Ringstrukturen verläuft. Dieser Effekt wird in der Färberei genutzt, wo durch Nachbehandlung gefärbter Textilien mit Metallsalzen, vorwiegend Aluminiumsalzen, schwerlösliche und stabile „Farblacke" erzeugt werden.
Zur Immobilisierung von Biokatalysatoren wurden derartige Verbindungen nicht eingesetzt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen zu entwickeln, das zu wiederverwendbaren Biokatalysatoren mit hohen Fixierungsausbeuten und Auswaschstabilitäten führt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

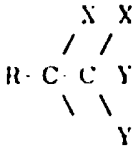
Aufgabe der Erfindung ist es, die Auswaschbeständigkeit der immobilisierten Enzyme durch geeignete Kombination chelatbildender Gruppen im Kopplungsreagenz bei gleichzeitig hohen Immobilisierungsausbeuten zu verbessern.
Erfindungsgemäß wird ein Enzym oder gegebenenfalls eine Ankersubstanz zur nachträglichen Bindung des Enzyms, über heterobifunktionelle Verbindungen an schwerlösliche Trägermaterialien gebunden, die an inneren oder äußeren Oberflächen Ionen mehrwertiger Metalle enthalten. Als heterobifunktionelle Verbindungen werden Verbindungen benutzt, bei denen eine funktionelle Gruppe, gegebenenfalls unter Verwendung eines Aktivierungsreagenz, mit dem zu immobilisierenden Enzym oder gegebenenfalls der Ankersubstanz und eine zweite Gruppierung mit den Metallionen der Matrix reagiert. Gegebenenfalls wird die Oberfläche des Trägers durch Nachbehandlung mit einer weiteren bifunktionellen Verbindung modifiziert.
Als Trägermaterialien werden anorganische Materialien, organische Materialien oder Composite aus beiden verwandt, bei denen sich an der äußeren Oberfläche und/oder an der Oberfläche von Poren im Innern des Materials, gegebenenfalls als nachträglich aufgebrachte Überzugsschicht, Ionen mehrwertiger Metalle befinden.
Metallionenhaltige Überzugsschichten auf dem Trägermaterial werden durch dessen Umsetzung mit einer metallorganischen Verbindung (z.B. Tetraethoxyzirkonat), einem Metallsalz (z.B. Ammoniummolybdat), einem Metallkomplex (z.B. Eisen-(III)-hexacyanoferrat-(II)), einem Metallhalogenid (z.B. Titantetrachlorid), einem Oxy- oder Hydroxysalz (z.B. Zirkonoxychlorid) erzeugt.
Anorganische Trägermaterialien sind schwer lösliche natürliche oder synthetisch hergestellte Oxide, Salze, Mineralien, Gläser oder Keramiken, die gegebenenfalls aus einem ferromagnetischen Material bestehen oder ferromagnetische Bereiche enthalten.
Als organische Trägermaterialien werden Polymere eingesetzt, die mit den beschriebenen Metallverbindungen unter Bildung einer metallionenhaltigen Überzugsschicht reagieren.
Bei Trägermaterialien aus anorganisch-organischen Compositen werden erstens Composite benutzt, bei denen die Eigenschaften der anorganischen Träger, wie Abriebfestigkeit oder Verformbarkeit durch das organische Material verbessert werden, wobei dieses organische Material einen metallionenhaltigen Überzug zur Immobilisierung von Enzymen besitzt oder ein nicht reaktives Material ist, das lediglich als Füllstoff dient oder ein Material ist, in dem oder an dem nach bekannten Verfahren Enzyme oder andere Biomaterialien (z.B. Zellen, Proteine, Polysaccharide u.a.) immobilisiert sind.
Als Trägermaterialien werden zweitens anorganisch-organische Composite benutzt, in denen ein organisches Material einen Metallionenüberzug erhält, der zur Immobilisierung von Enzymen benutzt wird. Durch Zusatz der anorganischen Komponente wird der Composit in seinen Eigenschaften, zum Beispiel der Druckfestigkeit, verbessert.
Metallionen an der Oberfläche der Trägermaterialien sind Ionen von Elementen der zweiten bis fünften Haupt- oder der Nebengruppen des Periodensystems, einschließlich der Lanthaniden.
Das heterofunktionelle Reagenz enthält als funktionelle Gruppe, die mit dem Enzym oder der Ankersubstanz direkt reagiert, eine Säureazid-, eine Säurehalogenid-, eine Säureanhydrid-, eine Isocyanat-, eine Isothiocyanat-, eine aktivierte Ester-, eine Disulfid-, eine Aldehyd- oder eine Diazogruppe.
Das heterobifunktionelle Reagenz enthält als funktionelle Gruppe, die nach Reaktion mit einem Aktivierungsreagenz mit dem Enzym oder gegebenenfalls der Ankersubstanz reagiert, eine Amino-, Hydrazino-, Säureamid-, -hydrazid-, -halogenid-, -anhydrid-, -thioamid-, -imid-, Ester-, Lactam-, Lacton-, Carboxyl-, Carbonyl-, Nitril-, Oxim-, Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Halogen-, Alken-, Alkin- oder eine CH-acide Gruppe.
Das heterobifunktionelle Reagenz enthält als zweite funktionelle Gruppierung eine chelatbildende Gruppierung, die aus einer oder mehreren Gruppen mit der Fähigkeit zur Bildung von Hauptvalenzbindungen und mindestens einer Gruppe mit der Fähigkeit zur Bildung von Nebenvalenzbindungen besteht. Derartige chelatbildende Gruppierungen enthalten Molekülbereiche mit Strukturen nach Formel I–XXII der folgenden Abbildung:



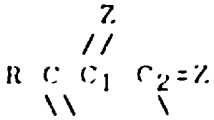
(I)

(II)

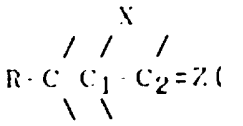
(III)



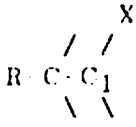
(IV)



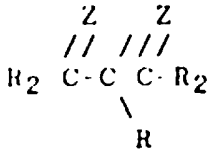
(V)



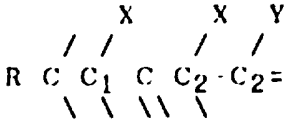
(VI)



(VII)

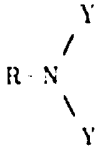


(VIII)

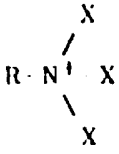


(IX)

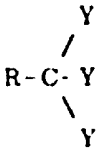
(X)



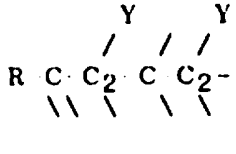
(XI)



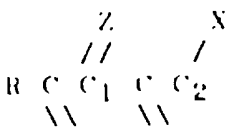
(XII)



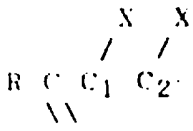
(XIII)



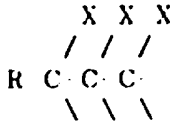
(XIV)



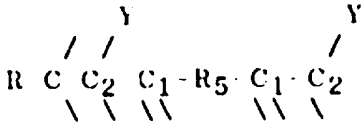
(XV)



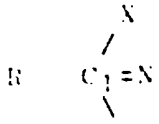
(XVI)



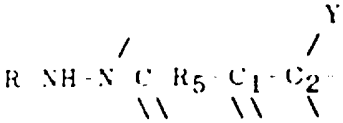
(XVII)



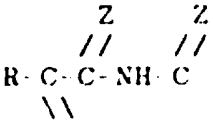
(XVIII)



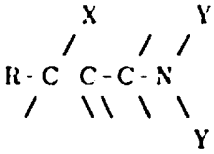
(XIX)



(XX)



(XXI)



(XXII)

wobei R den Molekülteil darstellt, an dem sich über aliphatische, aromatische oder heterocyclische, gegebenenfalls substituierte oder Heteroatome enthaltende Gruppierungen gebunden, die zur kovalenten Enzymbindung notwendige funktionelle Gruppe befindet, und

X: $-OR_1$, $-SR_1$, $-NR_1R_2$, $-NO$, $-NR_1OH$, $-R_4OH$,

Y: $-COOR_1$, $-R_4-COOR_1$, $-O-R_4-COOR_1$, $-NH-R_4-COOR_1$, $-S-R_4-COOR_1$, $-CONR_1R_2$, $-CONHOH$, $-PO_3H_2$, $-R_4-PO_3H_2$, $-NHOH$, $-SO_3H$, $-H$,

Z: $=O$, $=S$, $=NH$, $=NOH$, $=N-$ in einem heterocyclischen Ring,

R_1: $-H$, ein Alkylrest,

R_2: $-H$, $-NH_2$, ein Alkylrest, ein cyclischer Molekülrest,

R_3: ein aromatischer oder heterocyclischer Molekülrest,

R_4: ein Alkylen-, Arylen- oder Aralkylenrest,

R_5: eine $-N=N-$ oder eine $-CH=N-$ Gruppe und

C_1 und C_2 Teile eines Kettenmoleküls, eines Ringes oder Ringsystems sein können.

Wesentlich ist, daß als chelatbildende Gruppierungen Molekülstrukturen genutzt werden, bei denen die Ausbildung von Haupt- und Nebenvalenzen zwischen der chelatbildenden Gruppierung im heterobifunktionellen Reagenz, gegebenenfalls chelatbildender Gruppen im Enzymmolekül und Metallionen des Trägers zu einer fünf- oder sechsgliedrigen Ringstruktur führt. Bevorzugt werden als chelatbildende Gruppierungen eingesetzt: 1-Hydroxy- oder 1-Amino-1,1-bisphosphonsäuren, Malonsäurederivate (I), Sideramine (II), Alphaketocarbonsäuren, Dithiocarbamate (III), 2-Hydroxy-, 2-Sulfhydryl- oder 2-Aminosäuren nach Formel (I) (IV), Diketone oder Bis-chinone, deren Mono- oder Dioxime (V), Alphahydroxyketone, -ketoxime, Heterocyclen mit zum Ringstickstoff benachbarten Hydroxylgruppen, z. B. 8-Hydroxychinolin (VI), 2-Nitrosonaphthol, Salicylate, Sulfosalicylate, Aluminon, Eriochromcyanin R (VII), Acetessigester-, Acetylaceton- oder Malonesterderivate (VIII), Chromotropsäure, Hydroxynaphthoesäure, Eriochromschwarz T (IX), Aminoalkohole (X: $-R_4OH$) (X), Iminoessigsäuren oder Iminobisphosphonsäuren (XI), quartäre Ammoniumverbindungen (XII), Tricarbon- oder Triphosphonsäurederivate, gegebenenfalls über Ether- oder Thioetherbrücken gebunden (XIII), aromatische Dicarbonsäuren, z. B. 2-Nitro-4,3',5'-

diphenylethertricarbonsäure (XIV), Alizarin S, Gallocyanin (XV), Brenzkatechin, -violett, Pyrogallol oder -rot (XVI), BAL- (Britisch Anti Lewisit) derivate (XVII), Benztriazol, 2-(o-Hydroxyphenyl)benzoxazol, o-substituierte Diazoverbindungen oder Schiffsche Basen (XVIII), Mercaptobenzthiazol, Mercaptophenylthiodiazolon oder Cyanursäurederivate (XIX), Formazane, Dithizon- oder Cyanessigsäurederivate (XX), p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin (XXI) oder o-Hydroxybenzyliminodiessigsäurederivate (XXII).
Die Durchführung der Immobilisierung der Enzyme oder gegebenenfalls einer Ankersubstanz erfolgt entweder in der Weise, daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst mit dem Träger reagiert und dann mit dem Enzym oder der Ankersubstanz zur Reaktion gebracht wird oder daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst an das Enzym oder die Ankersubstanz gebunden wird und anschließend durch Inberührung bringen des Trägers mit dem so modifizierten Enzym oder der Ankersubstanz die Immobilisierung vollzogen wird.
Wenn zunächst Ankermoleküle an den Träger immobilisiert werden, lassen sich die Enzymmoleküle anschließend in bekannter Weise durch intermolekulare Wechselwirkungen oder kovalente Bindung an diese Ankermoleküle binden. Als Ankermoleküle für die Enzymbindung über intermolekulare Wechselwirkungen werden Moleküle von Substanzen benutzt, die in affinitätschromatographischen Trennprozessen, an Festphasen gebunden, zur Isolierung oder Reinigung von Enzymen eingesetzt werden. Bevorzugt werden Lektine für Glycoenzyme, hydrophobe Moleküle für membranständige Enzyme und Cyanursäurefarbstoffe (z.B. Cibachronblau) für Dehydrogenasen eingesetzt. Weiterhin werden als Ankermoleküle natürliche oder synthetische Polymere eingesetzt, die gegebenenfalls durch Wechselwirkung mit Substraten oder dem Enzym die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen und/oder durch Wechselwirkung mit dem Reaktionsmedium zu einer bevorzugten Anreicherung des Biokatalysators in einer Phase flüssiger Mehrphasensysteme führen.
Als bifunktionelle Verbindungen zur Nachbehandlung des Trägers werden Substanzen eingesetzt, die eine chelatbildende Gruppierung und eine Gruppierung enthalten, die die Löslichkeit des Trägers im Reaktionsmedium verringern, die das Verteilungsgleichgewicht feinverteilter Trägerpartikel in flüssigen Zweiphasensystemen beeinflussen und/oder durch Wechselwirkungen mit dem Enzym oder mit Substratmolekülen die Reaktionsgeschwindigkeit und/oder Selektivität des Biokatalysators beeinflussen. Derartige Gruppierungen sind aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffreste, heterocyclische Reste, ionenaustauschende Gruppen, chelatbildende Gruppen, optisch aktive Gruppen, Gruppen, die Cofaktoren binden, reduzieren oder oxydieren können, Kohlehydratreste, Ester- oder Amidgruppen sowie Cofaktoren oder analoge Strukturen.
Die erfindungsgemäß hergestellten Enzymimmobilisate werden in sehr guten Ausbeuten (bei eingesetzten Enzymmengen die unterhalb der Grenze für eine monomolekulare Belegung der zur Verfügung stehenden Trägeroberfläche liegen: 100%) und bei hoher Auswaschstabilität in den gebräuchlichen Substratlösungen (abhängig von der Komplexbildungskonstante zwischen Chelatgruppe und Metallion des Trägers) erhalten.
Sie werden in der präparativen Biotransformation z.B. bei der Penicillinspaltung oder bei Umesterungen, als Hilfskatalysatoren, z.B. bei der Sauerstoffversorgung in Bioreaktoren mit immobilisierter Katalase/Wasserstoffperoxid und in der Analytik, z.B. in Durchflußreaktoren zur Harnstoffbestimmung mit immobilisierter Urease eingesetzt.
Nachfolgend soll die beanspruchte Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
10g einer makroporösen Zirkondioxid enthaltenden Keramik werden mit 50ml einer wäßrigen Lösung von 6-Amino-1-hydroxy-1,1-bisphosphonsäure (50mM, Formel I, Y: $-PO_3H_2$, X: –OH) 1h in einem rotierenden Gefäß behandelt. Das Produkt wird solange mit Wasser gewaschen, bis die Leitfähigkeit in der Waschlösung konstant bleibt. Danach werden 20ml einer 5%igen Glutaraldehydlösung in Natriumhydrogenkarbonatpuffer (*p*H = 7,5) zu dem abfiltrierten Träger gegeben und 48h bei Raumtemperatur (unter Rotation) gehalten. Der aktivierte Träger wird gründlich mit Wasser gewaschen und dann zu 30ml einer Lösung von Trypsin (100IE/ml = 100 internationale Einheiten/ml) in Karbonatpuffer (*p*H = 7,5) gegeben. Nach 24stündiger Rotation wird das Produkt gewaschen und zur kontinuierlichen Peptidhydrolyse eingesetzt. Die Fixierungsausbeute beträgt 30%.
Technische Einzelheiten, wie sorgfältige Entgasung der Träger unter Vakuum, nach Möglichkeit im Ultraschallfeld, sowie Behandlungsschritte unter „Überkopfrotation" und intensive Waschvorgänge, d.h. mindestens 10x 20min, gelten für alle Beispiele gemeinsam.

Beispiel 2
500mg Glucoamylase werden in Acetatpuffer (50mM, *p*H 4,5) mit Perjodat oxydiert (s. M. Marek et al., Biotech. Bioeng. 26 1223 (1984)) und dialysiert. Der Rückstand wird mit 20mg Desferrioxamin B (Formel II, X: –OH, Y: $-COR_1$, R enthält eine primäre Aminogruppe) versetzt und über 48h bei 4°C zur Reaktion gebracht. Gleichzeitig wird aus äquimolaren Mengen von Eisen-II- und Eisen-III-sulfat in einer 1%igen Dextranlösung mit Ammoniaküberschuß ein magnetisches Eisenoxid (Fe_3O_4) gefällt, das durch Dextran als Schutzkolloid stabilisiert ist. Dieses Eisenoxidsol wird mit dem modifizierten Enzym versetzt und 1h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach mehreren Waschungen mit magnetischer Abtrennung wird das Produkt in einem wäßrigen 2-Phasensystem (Stärke-Polyethylenglycol) zur Stärkehydrolyse eingesetzt, wobei sich der Katalysator in der Stärkelösung anreichert und die entstehende Glucose in beiden Phasen gleich verteilt ist und aus der PEG-Phase durch Ultrafiltration abgetrennt werden kann.

Beispiel 3
500mg N-(4-Hydroxyphenyl)-dithiocarbamat (Formel III, X: –SH, Z: =S) werden in wäßriger Lösung mit 10g einer Eisen-III-oxid enthaltenden Keramik geschüttelt. Das Produkt wird gewaschen und sorgfältig getrocknet. Anschließend wird es mit 30ml einer 2%igen Lösung von Toluendiisocyanat in trockenem Toluen aktiviert und mit getrockneten Lösungsmitteln (Toluen, Aceton) reagenzienfrei gewaschen und getrocknet. Die abschließende Enzymkopplung erfolgt durch Eintragen des aktivierten Trägers in eine wäßrige Lösung von Leucinaminopeptidase (3000IE/30ml).

Beispiel 4
400 mg 3,4-Epoxy-1,2-dihydroxybutan-1,1-bisphosphonsäure werden an 10 g Aluminiumsilikat adsorbiert und anschließend mit einer Lösung von Uricase (300 IE/50 ml Karbonatpuffer, 100 mmol/l, pH: 8,5) umgesetzt. Nach 5 d bei 4 °C wird die Immobilisierung abgebrochen und das Produkt gewaschen und für die Harnsäurebestimmung genutzt.

Beispiel 5
10 g einer porösen Keramik mit 20 % Nickeloxid werden mit 200 ml einer Lösung von 20 mmol/l Cyclohexan-1,2-diondioxim-4-essigsäure (Formel V, Z: =NOH) in Citratpuffer (10 mmol/l, pH: 6,0) 1 h geschüttelt. Danach werden 3000 IE Katalase in 50 ml salzsaure Natriumchloridlösung (0,1 mol/l, pH: 4,5) zu dem abfiltrierten Träger gegeben. Nach 24 h werden 200 mg N-Ethyl-N'-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Produkt wird zur Sauerstofferzeugung aus Wasserstoffperoxid in Enzymreaktoren eingesetzt.

Beispiel 6
5 ml Invertase in einer Glycerol-Acetatpuffermischung (20 % Glycerol, 0,1 mol/l Acetatpuffer, pH: 4,5) werden mit 30 ml einer wäßrigen Lösung von 5-Diazo-8-hydroxychinolin (10 mmol/l) umgesetzt und der Reagenzüberschuß in einer Epidexsäule abgetrennt.
10 g makroporöses Aluminiumoxidpulver werden mit dem aktivierten Enzym 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, abfiltriert und gewaschen. Dann werden 2 g Bäckerhefe in 20 ml 3%iger Natriumalginatlösung suspendiert, mit dem feuchten Trägermaterial versetzt und die Mischung tropfenweise in eine Calciumchloridlösung gepreßt. Die entstehenden Kugeln werden vorsichtig getrocknet und anschließend in einem Säulenreaktor zur kontinuierlichen Vergärung von Saccharose eingesetzt.

Beispiel 7
10 g Schaumbeton werden nacheinander mit Lösungen von Eisen-III-hexacyanoferrat und Eisen-II-ammoniumsulfat (jeweils 20 mmol/l, pH: 6,5) behandelt. Das tiefblaue Produkt wird gewaschen und anschließend mit 30 ml einer Lösung von 3-Hydroxy-4-carboxy-benzoesäureazid (10 mg/ml, pH: 4,0, Formel VII, Y: –COOH, X: –OH) 10 min bei 0 °C geschüttelt und anschließend sofort mit einer Lösung von β-Galactosidase in Acetatpuffer (3000 IE Enzym, Ionenstärke: 0,1 mol/l, pH: 4,5) versetzt. Nach 2 h wird der Träger gewaschen und bis zur Verwendung in o.g. Puffer aufbewahrt.

Beispiel 8
10 g Schaumglas werden mit einer 5%igen Lösung von Acrylamid-Methylenbisacrylamid-Riboflavin (zur Gelherstellung) getränkt und durch UV-Bestrahlung mit einem Überzug von Polyacrylamid versehen. Das getrocknete Produkt wird mit einer Lösung von Titantetrachlorid in Tetrachlorkohlenstoff 2 h geschüttelt, mit Aceton und Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 50 mg N-(2-Hydroxyethyl)aminomalonsäure (Formel VIII, Z.: =O, R_2: –OH) in 30 ml Wasser versetzt. Nach 2stündiger Rotation der Mischung wird der funktionalisierte Träger mit Wasser gewaschen, unter Vakuum getrocknet und mit Chlorameisensäurenorbornylester in bekannter Weise die endständige Hydroxylgruppe in den aktivierten Ester überführt. Abschließend wird die Kopplung von Glutamatdehydrogenase (3000 IE in Karbonatpuffer, 50 mmol/l, pH: 8,0) durch Zugabe von 30 ml Enzymlösung zu dem getrockneten Träger vollzogen. Das Produkt wird in Durchflußanalysatoren eingesetzt.

Beispiel 9
300 mg Penicillinacylase und 50 mg 1,8-Dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure werden bei pH 8,5 in Karbonatpuffer mit 25 mg Bisdiazobenzidinhydrochlorid versetzt und unter schwacher Rührung 1 h bei Raumtemperatur gehalten. Das entstehende Enzymderivat (Formel IX, X: –OH, Y: –N=N–) wird mit 5 ml 10%iger Polyacrylsäure und 3 g fein verteiltem Eisen-II,III-oxid versetzt und in eine Lösung von 2 g Chromammoniumalaun in 30 ml Wasser getropft. Das Produkt wird getrocknet und bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Beispiel 10
10 g Poly-vinylalkohol-divinylbenzen (98:2) werden mit einer wäßrigen Lösung von Zirkonoxychlorid (2 g in 50 ml, pH: 3,5) 1 h auf 60 °C erwärmt, anschließend gründlich gewaschen und mit einer Lösung von 200 mg Triethanolamin in 50 ml Wasser weitere 3 h auf 60 °C erwärmt. Das Produkt (Formel X, R = X: $-CH_2-CH_2-OH$) wird mit Cibachronblau (50 ml, 2 mmol/l, Karbonatpuffer, 50 mmol/l, pH: 8) als Ankersubstanz umgesetzt (4 h, 20 °C, Rotation), gewaschen und zur Immobilisierung von Lactatdehydrogenase eingesetzt, die an den modifizierten Träger ohne weitere Reagentien koppelt.

Beispiel 11
10 g poröses Glas („Trisoperl") werden 5 h unter Rückfluß in einer Ammoniummolybdatlösung (10 mmol/l, pH = 5,0) gekocht. Danach wird abfiltriert und mit 100 ml einer 1%igen Lösung von 2-(N,N-diethylphosphonsäure)-aminoacetaldehyd (R: $-CH_2-CHO$, Y: $-CH_2-CH_2-PO_3H_2$, Formel XI) in Karbonatpuffer (pH = 7,5) versetzt. Nach 1 h wird abfiltriert und gewaschen. Der Träger wird dann mit 30 ml einer Lösung von Invertase (100 IE/ml) in Acetatpuffer (10 mmol/l, pH = 5,6) 24 h bei Raumtemperatur behandelt, anschließend gewaschen und in Acetatpuffer aufbewahrt.

Beispiel 12
10 g eines Composites aus 8 g Ton und 2 g Polyethylen werden mit 50 ml einer neutralen wäßrigen Lösung von 500 mg Cetyltrimethylammoniumbromid (Formel XII, X: $-CH_3$) 48 h unter Rotation bei 45 °C inkubiert. Die Cetylkette wirkt als Ankersubstanz für hydrophobe Enzyme. Die Immobilisierung von Lipase erfolgt durch Behandlung des Trägers mit einer neutralen Lösung von 3000 IE Pankreaslipase in verdünntem Karbonatpuffer (1 mmol/l, pH: 8,0) bei 30 °C über 48 h sowie nachfolgenden Waschschritten.

Beispiel 13
10 g poröses Titandioxid werden mit 20 ml einer Lösung von 10 mM N,N',N"-Tris-(2-phosphonatoethylamino)-acetaldehyd (Formel XIII, Y: $-N-CH_2-CH_2-PO_3H_2$) in destilliertem Wasser 1 h rotiert, gewaschen und in die Lösung von 3000 IE Chymotrypsin in 30 ml Karbonatpuffer (0,1 mol/l, *p*H: 8,0) gebracht. Nach 2stündiger Rotation ist die Immobilisierung beendet und das Produkt wird abfiltriert, in Hexan überführt und in dieser Lösung zur Umesterung von niedermolekularen Fettsäureestern eingesetzt.

Beispiel 14
10 g poröse Pericellulose werden 4 h mit einer alkoholischen Lösung von Zirkontetraethylat (2 g in 50 ml) unter Rückfluß auf Siedetemperatur erhitzt, anschließend mit Ethanol und Wasser gewaschen. Zu dem feuchten Träger werden 200 mg 2-Aminodiphenylether-4,3',5'-tricarbonsäure (Formel XIV, Y: –COOH) in neutraler wäßriger Lösung gegeben und unter Rotation im Verlauf einer Stunde adsorbiert. 50 mg Linsenlektin als Ankersubstanz werden wie in Beispiel 2 mit Perjodat oxidiert und anschließend bei *p*H 7,0 (neutralisiert mit Hydrogenkarbonat) an den funktionalisierten Träger gebunden. Abschließend werden 30 mg Meerrettichperoxidase in 20 ml Wasser gelöst und zu dem Lektinimmobilisat gegeben. Nach den üblichen Waschschritten ist das Produkt zum Wasserstoffperoxidnachweis geeignet.

Beispiel 15
10 g Aluminiumsilikat werden mit einer Lösung von 2 g Alizarin S in 30 ml Natronlauge (1 mmol/l) 2 h unter Rotation umgesetzt, der Träger gewaschen und getrocknet. Zu dem trockenen Träger wird eine Mischung von 20 mmol Terephtaloylchlorid und 20 mmol Pyridin in 30 ml Toluen gegeben und innerhalb von 2 h bei 50 °C in β-OH-Gruppe des Alizarins verestert. Der funktionalisierte Träger wird mit Toluen, Aceton und Wasser gewaschen und sofort danach mit 3000 IE Hexokinase in Karbonatpuffer (10 mmol/l, *p*H: 8,0) versetzt. Nach 3 h ist die Immobilisierung beendet.

Beispiel 16
Penicillinacylase (3000 IE) wird in Karbonatpuffer (s. o.) mit 20 ml o-Chinon (3 mmol/l) und nach 4 h mit 10 ml Hydrazinsulfat (10 mmol/l, *p*H 6,5) umgesetzt, wobei ein Brenzkatechinderivat (Formel XVI, X: –OH) entsteht. 10 g poröses Aluminiumoxid werden 4 h mit der Reaktionslösung behandelt, gewaschen und zur Spaltung von Penicillin eingesetzt.

Beispiel 17
10 g poröses Nickeloxid werden mit einem Überschuß von 2,3-Dimercaptopropanol in Form einer 2%igen wäßrigen Lösung umgesetzt (Formel XVII, X: –SH, –OH). Nach Auswaschen des Überschusses werden 30 ml einer Lösung von Dipyridin-2,2'-disulfid (3 mmol/l) in Wasser zugegeben und damit ein Teil der SH-Gruppen am Träger in Disulfidgruppen umgewandelt. Nach Entfernen des Reagenzüberschusses wird der aktivierte Träger mit der Lösung von 500 mg Urease in 30 ml Karbonatpuffer nach Beispiel 15 4 h behandelt und abschließend gewaschen. Das Produkt wird in der Harnstoffanalytik eingesetzt.

Beispiel 18
100 mmol o-Phenylenbisdiazoniumchlorid werden bei *p*H 9,0 mit 200 mmol p-Aminophenol gekuppelt und das Produkt (Formel XVIII, Y: –OH, R_5: $-N=N-C_6H_4-N=N-$) wird erneut diazotiert, danach an 10 g poröses Aluminiumsilikat adsorbiert und sofort mit einer Lösung von 3000 IE Penicillinacylase in o. g. Karbonatpuffer umgesetzt.

Beispiel 19
500 mg Lipase aus Candida Cylindracea werden mit einer Lösung von 20 mmol Cyanursäurechlorid in 3 ml Aceton umgesetzt, danach wird das Produkt getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die restlichen Chloridatome werden in Karbonatpuffer abhydrolysiert und das Produkt (Formel XIX, X: –OH) wird an 10 g eines porösen Titansilikates adsorbiert. Der entstandene Katalysator wird zur Fettsynthese eingesetzt.

Beispiel 20
Aus o-Hydrazinobenzoesäure und p-Chlormethylbenzaldehyd wird ein Formazan hergestellt (Formel XX, R_5: –N=N–, Y: –COOH), an ein Eisen-III-silikat adsorbiert und das Chlor durch NH_4OH in eine Aminogruppe überführt. Der Träger wird dann durch Behandlung mit einem Überschuß von Benzochinon in Karbonatpuffer (3 mmol/l) aktiviert. Die abschließende Enzymimmobilisierung erfolgt durch Zugabe von 3000 IE Glucoseoxidase in 25 ml Acetatpuffer, *p*H: 5,6.

Beispiel 21
8-Chlorchinolin-3-carbonsäuremethylester wird mit Glycin zu der N-substituierten Aminoessigsäure umgesetzt und anschließend mit Hydrazin und Nitrit in das Azid überführt. 0,1 g dieser Verbindung (Formel XXI, Z: =N– im Ring, =O) werden mit 1 g alkalischer Protease bei *p*H 8,0 in Karbonatpuffer umgesetzt und anschließend an 10 g Zirkondioxid adsorbiert.

Beispiel 22
200 mg N-(2-Hydroxy-5-aminobenzyl)iminodiessigsäure (Formel XXII, X: –OH, Y: $-CH_2-COOH$) werden diazotiert und nach Neutralisation zu einer Mischung aus Glucoamylase und Glucoseoxidase (jeweils 3000 IE) in 20 ml Karbonatpuffer *p*H: 8,0 gegeben. Nach 4 h bei 0 °C ist die Kopplung beendet und das Produkt wird mit 10 g Eisen-II,III-oxid versetzt. Unter Rotation werden die modifizierten Enzyme adsorbiert (12 h), das Produkt wird gewaschen und magnetisch abgetrennt. Der Katalysator wird mit 10 ml einer 10%igen Polyvinylalkohollösung vermischt und auf einer Glasplatte zu einer Membran ausgestrichen. Nach Trocknung wird die Membran vor die Platinspitze einer amperometrischen Elektrode gespannt. Die entstehende Enzymelektrode ist zur Bestimmung von Glucose und Maltose einsetzbar.