



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 266 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
C 12 N 9/34

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 325 278 4 (22) 27.01.89 (44) 13.02.92

- (71) Zentralinstitut für Molekularbiologie, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin, DE
- (72) Kirstein, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Müller, Hans-Georg, Prof. sc. nat. Dipl.-Biol.; Seidel, Steffen, Dr. rer. nat. Dipl.-Päd.; Büchting, Horst, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Güntherberg, Horst, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Sens, Helga; Schirner, Rolf, Dr.-Ing. Dipl.-Ing.; Janowski, Frank, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Meyer, Hans, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Lehmann, Angelika; Schülke, Ullrich, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Geißler, Werner, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Kraft, Manfred, Dipl.-Chem.; Frieße, Hans-Georg; Schmuck, Rudi, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Nau, Paul-Erich, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys., DE
- (73) Zentralinstitut für Molekularbiologie, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin; Institut für Anorganische Chemie, O - 1199 Berlin; Martin-Luther-Universität Halle, O - 4020 Halle; Stärke, O - 4020 Halle; Maisan-Werk, O - 3302 Barby; Leuna-Werke AG, O - 4220 Leuna, DE
- (74) siehe (71)

(54) Verfahren zur Immobilisierung von Glucoamylase

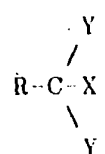
(55) Immobilisierung; Glucoamylase; Träger; Ankersubstanz; Metallionen; Chelatbildner; Reagenzien, bifunktionell; Nachbehandlung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Glucoamylase. Anwendungsgebiet ist die biotechnologische Stärkeverzuckerung. Erfindungsgemäß wird Glucoamylase 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 der Glucoamylase 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.

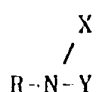
Patentansprüche:

1. Verfahren zur Immobilisierung von Glucoamylase an schwerlösliche Trägermaterialien, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bindung der Glucoamylase, gegebenenfalls über eine Ankersubstanz, an Trägermaterialien erfolgt, die an inneren oder äußeren Oberflächen Ionen mehrwertiger Metalle enthalten, wobei die Bindung der Glucoamylase oder gegebenenfalls der Ankersubstanz, mittels heterobifunktioneller Reagenzien erfolgt, in denen eine funktionelle Gruppe, gegebenenfalls unter Verwendung eines Aktivierungsreagenz, mit der zu immobilisierenden Glucoamylase 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 der Glucoamylase 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 der Glucoamylase 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 heterobifunktionelles 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 Nebervalenzbindungen besteht.

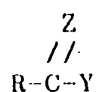
13. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die chelatbildende Gruppierung Molekülbereiche mit Strukturen nach Formel I-XXII im heterobifunktionellen Reagenz besitzt.



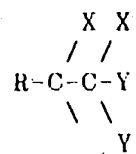
(I)



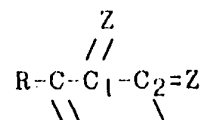
(II)



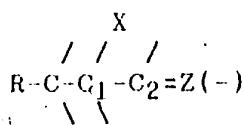
(III)



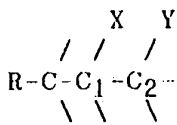
(IV)



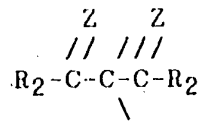
(V)



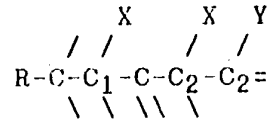
(VI)



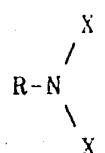
(VII)



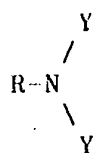
(VIII)



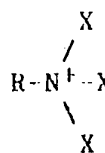
(IX)



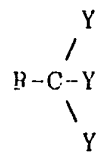
(X)



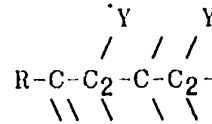
(XI)



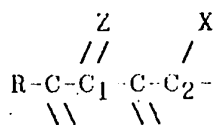
(XII)



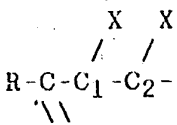
(XIII)



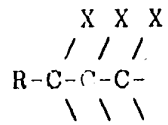
(XIV)



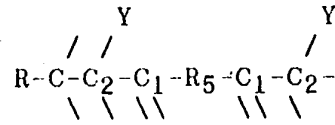
(XV)



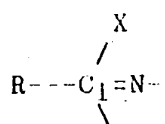
(XVI)



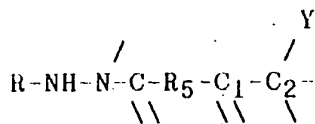
(XVII)



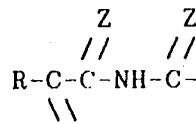
(XVIII)



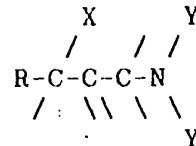
(XIX)



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

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

R₁: $-H$, ein Alkylrest,

R₂: $-H$, $-NH_2$, ein Alkylrest, ein cyclischer Molekülrest,

R₃: ein aromatischer oder heterocyclischer Molekülrest,

R₄: ein Alkyl-, Aryl- oder Aralkylrest,

R₅: eine $-N=N-$ oder eine $-CH=N-$ Gruppe und

C₁ und C₂ 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 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 der Glucoamylase zur Reaktion gebracht wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst an die Glucoamylase gebunden wird und anschließend durch In-Berührung-Bringen des Trägers mit der so modifizierten Glucoamylase die Immobilisierung vollzogen wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zunächst Ankermoleküle an den Träger immobilisiert werden und daß die Glucoamylase anschließend in bekannter Weise durch intermolekulare Wechselwirkungen oder kovalente Bindung an diese Ankermoleküle gebunden wird.
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 Glucoamylase 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 Glucoamylase an schwerlösliche Trägermaterialien. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Herstellung von Immobilisaten, die in der Biotechnologie (Stärkeverzuckerung und Enzymelektroden) eingesetzt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Glucoamylase an schwerlösliche Feststoffe durch Adsorption, Ionenaustausch oder kovalente Bindung immobilisiert werden kann. 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 Glucoamylase. 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 Epoxysilan), nach Modifizierung der Überzugsschicht (z. B. γ -Aminopropylsilan durch bifunktionelle Verbindungen wie Dialdehyde, Carbodiimide, Chinone u. a.) oder nach Modifizierung der Glucoamylase (z. B. durch Perjodatoxidation der Kohlehydratanteile des Enzyms, durch 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-Patentanmeldungen: WP c 12 N/3045800 und -5786). Diese heterobifunktionellen Verbindungen enthalten im Molekül mindestens eine reaktive Gruppe, die direkt oder nach Aktivierung mit der Glucoamylase 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 Glucoamylase 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 pH-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 Glucoamylase wurden derartige Verbindungen nicht eingesetzt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Immobilisierung von Glucoamylase 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 Glucoamylase durch geeignete Kombination chelatbildender Gruppen im Kopplungsreagenz bei gleichzeitig hohen Immobilisierungsausbeuten zu verbessern.

Erfindungsgemäß wird Glucoamylase oder gegebenenfalls eine Ankersubstanz zur nachträglichen Bindung der Glucoamylase, 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 der zu immobilisierenden Glucoamylase 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 verwendet, 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-(III)), einem Metallhalogenid (z. B. Titanatetrachlorid), 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 Glucoamylase 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.

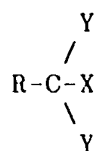
Als Trägermaterialien werden zweitens anorganisch-organische Composite benutzt, in denen ein organisches Material einen Metallionenüberzug erhält, der zur Immobilisierung von Glucoamylase benutzt wird. Durch Zusatz der anorganischen Komponente wird der Komposit in seinen Eigenschaften, zum Beispiel der 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 heterobifunktionelle Reagenz enthält als funktionelle Gruppe, die mit der Glucoamylase 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 der Glucoamylase oder gegebenenfalls der Ankersubstanz reagiert, eine Amino-, Hydrazino-, Säureamid-, -hydrazid-, -halogenid-, -anhydrid-, -thioamid-, -imid-, Ester-, 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 Nebenvaleanzbindungen besteht. Derartige chelatbildende Gruppierungen enthalten Molekülbereiche mit Strukturen nach Formel I-XXII der folgenden Abbildung:



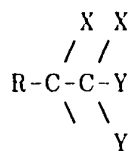
(I)



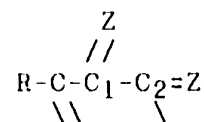
(II)



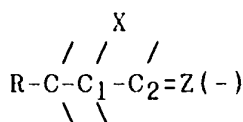
(III)



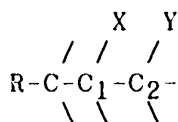
(IV)



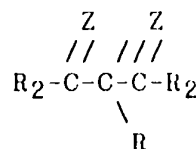
(V)



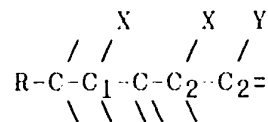
(VI)



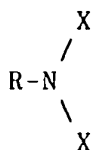
(VII)



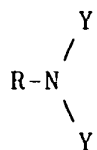
(VIII)



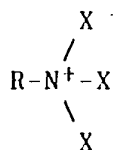
(IX)



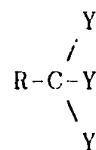
(X)



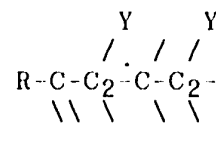
(XI)



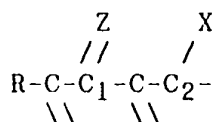
(XII)



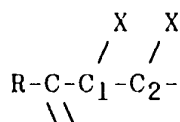
(XIII)



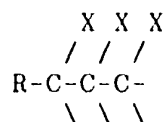
(XIV)



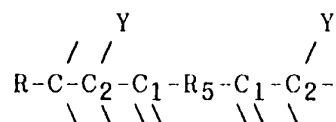
(XV)



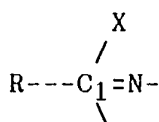
(XVI)



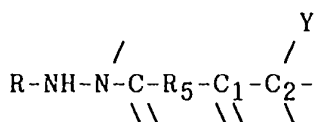
(XVII)



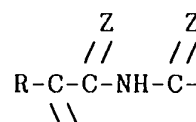
(XVIII)



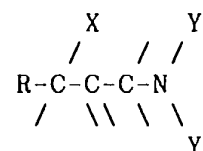
(XIX)



(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: $-\text{OR}_1, -\text{SR}_1, -\text{NR}_1\text{R}_2, -\text{NO}, -\text{NR}_1\text{OH}, -\text{R}_4\text{OH}$,

Y: $-\text{COOR}_1, -\text{R}_4-\text{COOR}_1, -\text{O}-\text{R}_4-\text{COOR}_1, -\text{NH}-\text{R}_4-\text{COOR}_1, -\text{S}-\text{R}_4-\text{COOR}_1, -\text{CONR}_1\text{R}_2, -\text{CONHOH}, -\text{PO}_3\text{H}_2, -\text{R}_4-\text{PO}_3\text{H}_2, -\text{NHOH}, -\text{SO}_3\text{H}, -\text{OH}, -\text{H}$,

Z: $=\text{O}, =\text{S}, =\text{NH}, =\text{NOH}, =\text{N}-$ in einem heterocyclischen Ring,

R₁: $-\text{H}$, ein Alkylrest,

R₂: $-\text{H}, -\text{NH}_2$, ein Alkylrest, ein cyclischer Molekülrest,

R₃: ein aromatischer oder heterocyclischer Molekülrest,

R₄: ein Alkyl-, Aryl- oder Aralkylrest,

R₅: eine $-\text{N}=\text{N}-$ oder eine $-\text{CH}=\text{N}-$ Gruppe und

C₁ und C₂ 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-Nitrosanaphthol, Salicylate, Sulfosalicylate, Aluminon, Eriochromcyanin R (VII), Acetessigester-, Acetylaceton- oder Malonesterderivate (VIII),

Chromotropsäure, Hydroxynaphtoesäure, 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), Benzotriazol, 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 Glucoamylase oder gegebenenfalls einer Ankersubstanz erfolgt entweder in der Weise, daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst mit dem Träger reagiert und dann mit der Glucoamylase oder der Ankersubstanz zur Reaktion gebracht wird oder daß das heterobifunktionelle Reagenz zunächst an die Glucoamylase oder die Ankersubstanz gebunden wird und anschließend durch In-Berührung-Bringen des Trägers mit der so modifizierten Glucoamylase oder der Ankersubstanz die Immobilisierung vollzogen wird.

Wenn zunächst Ankermoleküle an den Träger immobilisiert werden, lassen sich die Glucoamylasemoleküle anschließend in bekannter Weise durch intermolekulare Wechselwirkungen oder kovalente Bindung an diese Ankermoleküle binden. Als Ankermoleküle für die Glucoamylasebindung über intermolekulare Wechselwirkungen werden Moleküle von Substanzen benutzt, die in affinitätschromatographischen Trennprozessen, an Festphasen gebunden, zur Isolierung oder Reinigung von Glucoamylase eingesetzt werden. Bevorzugt werden Lektine, Mono-, Di- oder Polysaccharide sowie basische Gruppen eingesetzt. Weiterhin werden als Ankermoleküle natürliche oder synthetische Polymere (z. B. Dextrane, Polyole) eingesetzt, die gegebenenfalls durch Wechselwirkung mit Substraten oder der Glucoamylase 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 der Glucoamylase oder mit Substratmolekülen die Reaktionsgeschwindigkeit und/oder Selektivität des Biokatalysators beeinflussen. Derartige Gruppierungen sind Ionenaustauschende Gruppen, chelatbildende Gruppen, optisch aktive Gruppen, Borverbindungen Kohlenwasserstoff- oder Kohlehydratreste.

Die erfindungsgemäß hergestellten Glucoamylaseimmobilisate werden in sehr guten Ausbeuten (bei eingesetzten Glucoamylasemengen 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 kontinuierlichen Stärkehydrolyse z. B. in Säulen- oder Tankreaktoren und in der Analytik, z. B. in Durchflußreaktoren oder in Enzymelektroden 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 (pH = 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 Glucoamylase (100IE/ml = 100 internationale Einheiten/ml) in Karbonatpuffer (pH = 7,5) gegeben. Nach 24stündiger Rotation wird das Produkt gewaschen und zur kontinuierlichen Stärkehydrolyse 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 10×20 min, gelten für alle Beispiele gemeinsam.

Beispiel 2

500mg Glucoamylase werden in Acetatpuffer (50mM, pH4,5) 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 der modifizierten Glucoamylase versetzt und 1h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach mehreren Waschungen mit magnetischer Abtrennung wird das Produkt in einem wäßrigen 2-Phasen-System (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 Toluol aktiviert und mit getrockneten Lösungsmitteln (Toluol, Aceton) reagenzienfrei gewaschen und getrocknet. Die abschließende Glucoamylasekopplung erfolgt durch Eintragen des aktivierten Trägers in eine wäßrige Lösung von Glucoamylase (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 Glucoamylase (300 IE/50 ml Karbonatpuffer, 100 mmol/l, pH: 8,5) umgesetzt. Nach 5 h bei 4°C wird die Immobilisierung abgebrochen und das Produkt gewaschen und für die Maltosebestimmung genutzt.

Beispiel 5

5 ml Glucoamylase 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 der aktivierten Glucoamylase 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 Stärkevorhydrolysat eingesetzt.

Beispiel 6

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 Glucoamylase in Acetatpuffer (3000 IE/50 ml 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 7

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 Titanatetrachlorid 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, R₂: -OH) in 30 ml Wasser versetzt. Nach 2stündiger Rotation 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 Glucoamylase (3000 IE in Karbonatpuffer, 50 mmol/l, pH: 7,0) durch Zugabe von 30 ml Glucoamylaselösung zu dem getrockneten Träger vollzogen. Das Produkt wird in Durchflußanalysatoren eingesetzt.

Beispiel 8

300 mg Glucoamylase und 50 mg 1,8-Dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure werden bei pH 7,5 in Karbonatpuffer mit 25 mg Bis-diazobenzidinhydrochlorid versetzt und unter schwacher Rührung 1 h bei Raumtemperatur gehalten. Das entstehende Glucoamylasederivat (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 9

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: -CH₂-CH₂-OH) wird mit Cyanurchlorid (50 ml, 50 mmol/l, Acetonlösung) 5 h bei Siedetemperatur aktiviert, mit Aceton und Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 50 mmol Glucose in Karbonatpuffer (50 ml, 50 mmol/l, pH: 8,0) 3 h bei Zimmertemperatur behandelt. Der Träger wird gewaschen und an die immobilisierte Ankersubstanz werden 3000 IE Glucoamylase aus Acetatpuffer (50 ml, 0,1 mol/l, pH: 4,5) adsorptiv immobilisiert.

Beispiel 10

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: -CH₂-CHO, Y: -CH₂-CH₂-PO₃H₂, 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 Glucoamylase (100 IE/ml) in Acetatpuffer (10 mmol/l, pH = 5,6) 24 h bei Raumtemperatur behandelt, anschließend gewaschen und in Acetatpuffer aufbewahrt.

Beispiel 11

10 g poröses Titandioxid werden mit 20 ml einer Lösung von 10 mM N,N',N"-Tris-(2-phosphonatoethylamino)-acetaldehyd (Formel XIII, Y: -N-CH₂-CH₂-PO₃H₂) in destilliertem Wasser 1 h rotiert, gewaschen und in die Lösung von 3000 IE Glucoamylase in 30 ml Karbonatpuffer (0,1 mol/l, pH: 7,0) gebracht. Nach 2stündiger Rotation ist die Immobilisierung beendet. Das Produkt wird abfiltriert, gewaschen und in Acetatpuffer bei pH 4,5 aufbewahrt.

Beispiel 12

10 g poröse Perzellulose 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 pH 7,0 (neutralisiert mit Hydrogencarbonat) an den funktionalisierten Träger gebunden. Abschließend werden 30 mg Glucoamylase in 20 ml Wasser gelöst und zu dem Lektinimmobilisat gegeben. Nach den üblichen Waschrufen ist das Produkt zum Einsatz in analytischen Reaktoren geeignet.

Beispiel 13

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 Terephthaloylchlorid und 20 mmol Pyridin in 30 ml Toluol gegeben und innerhalb von 2 h bei 50°C die β -OH-Gruppe des Alizarin S verestert. Der funktionalisierte Träger wird mit Toluol, Aceton und Wasser gewaschen und sofort danach mit 3000 IE Glucoamylase in Karbonatpuffer (10 mmol/l, pH: 7,0) versetzt. Nach 3 h ist die Immobilisierung beendet.

Beispiel 14

Glucoamylase (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, pH 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 Kartoffelstärke eingesetzt.

Beispiel 15

100 mmol o-Phenylbisdiazoniumchlorid werden bei pH 9,0 mit 200 mmol p-Aminophenol gekuppelt und das Produkt (Formel XVIII, Y: -OH, R₅: -N=N-C₆H₄-N=N-) wird erneut diazotiert, danach an 10 g poröses Aluminiumsilikat adsorbiert und sofort mit einer Lösung von 3000 IE Glucoamylase in o.g. Karbonatpuffer umgesetzt. Das Produkt wird mit Wasser und Acetatpuffer gewaschen.

Beispiel 16

500 mg Glucoamylase aus Asp.-niger 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 Stärkespaltung eingesetzt.

Beispiel 17

Aus o-Hydrazinobenzoesäure und p-Chlormethylbenzaldehyd wird ein Formazan hergestellt (Formel XX, R₆: -N=N-, Y: -COOH), an ein Eisen-III-silikat adsorbiert und das Chlor durch NH₄OH in eine Aminogruppe überführt. Der Träger wird dann durch Behandlung mit einem Überschuß von Benzochinon in Karbonatpuffer (3 mmol/l) aktiviert. Die abschließende Glucoamylaseimmobilisierung erfolgt durch Zugabe von 3000 IE Glucoamylase in 25 ml Acetatpuffer, pH: 5,6.

Beispiel 18

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 Glucoamylase bei pH 7,0 in Karbonatpuffer umgesetzt und anschließend an 10 g Zirkondioxid adsorbiert.

Beispiel 19

200 mg N-(2-hydroxy-5-aminobenzyl)iminodiessigsäure (Formel XXII, X: -OH, Y: -CH₂-COOH) werden diazotiert und nach Neutralisation zu einer Mischung aus Glucoamylase und Glucoseoxidase (jeweils 3000 IE) in 20 ml Karbonatpuffer pH: 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.