

Immobilisierte Enzyme und Prinzipien für ihre Anwendung bei analytischen und präparativen Verfahren*

Von M. Nelboeck und D. Jaworek

Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica Werk Tutzing, D-8132 Tutzing, BRD

Summary

On the basis of the physical and chemical properties of the catalytically active protein some selected methods for the covalent binding of enzymes to natural and synthetic polymers are presented.

Only a limited number of functional groups are able to react with the enzyme protein without destroying its catalytic activity. On the other hand there are many ways to build matrices bearing these groups. Some aspects referring to the kinetical characterisation of immobilized enzymes are discussed.

In most cases the application of insolubilized enzymes is still in its experimental stage. In the case of the glucose oxidase reaction the use of enzyme reactors as analytical tools is compared with their application for preparative reactions.

Considering basic economical aspects, some examples are presented in which the immobilized enzyme may be used more profitable than the soluble one. Reactions providing the isomers of optically active molecules are of special interest.

Die Erhaltung der nativen Struktur als Aufgabe bei der Immobilisierung von Enzymen

Damit ein Enzym seine Aktivität auch außerhalb der Zelle bewahrt, muß dafür Sorge getragen werden, daß seine native Struktur möglichst intakt bleibt.

* Vorgetragen am Symposium über Enzymreaktoren, veranstaltet von der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft und der Schweizerischen Gesellschaft für Biochemie am 5. Schweizerischen Treffen für Chemie, 10. September 1974 in Basel.

Für diese native Struktur ist in erster Linie die Aminosäuresequenz oder Primärstruktur der Peptidketten verantwortlich. Von Sekundärstruktur spricht man bei Kettenteilen mit einer regelmäßigen Konformation. Die wichtigsten Sekundärstrukturen sind die α -Helix und die Faltblattstruktur. Sie werden durch Wasserstoffbindungen stabilisiert. Bei globulären Proteinen, zu denen die Enzyme gehören, wechseln relativ kurze α -Helix-Bereiche mit Kettenstücken ab, die zwar nicht willkürlich, aber unregelmäßig konformiert sind; sie ermöglichen ein Zurückbiegen der Ketten, so daß eine ziemlich dichte Raumstruktur resultiert. Wenn man die Raumstruktur der gesamten Kette im Auge hat, spricht man von Tertiärstruktur. Bei der Ausbildung der Tertiärstruktur ordnet sich die Peptidkette so, daß hydrophobe Aminosäurereste überwiegend im Inneren des Proteins placiert sind und diesen Raum weitgehend wasserfrei halten. Hydrophile, d. h. polare und ionisierbare Reste sind vornehmlich an der Oberfläche angeordnet und binden dort eine Wasserhülle. Hydrophober Innenraum und hydrophile Hülle bedingen eine relative Stabilität dieser globulären Tertiärstruktur. Drastische Bedingungen wie er-

höhte Temperatur, extreme pH, gewisse Salze und andere Lösungsgeossen in höherer Konzentration können zur Denaturierung des Proteins führen; dabei geht die native, in sich gefaltete Kette unter Verlust der katalytisch aktiven Zentren in einen seine Form statistisch ändernden Knäuel ("random coil") über. Abb.1 veranschaulicht diesen Vorgang. Bei Wiederherstellung der

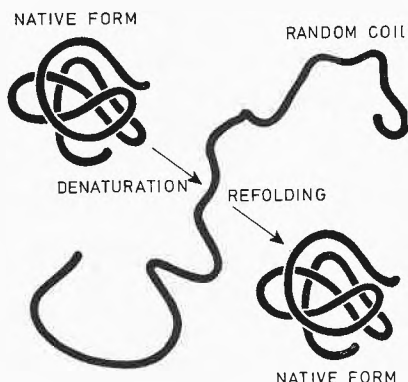


Abb.1. Denaturierung und Renaturierung eines globulären Proteins. Nach A.L.Lehninger, *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York 1970

Ausgangsbedingungen kann der Knäuel eventuell in die aktive Form zurückgefaltet werden. Es gibt aber so viele Störfaktoren, daß eine solche Renaturierung im allgemeinen nicht erwartet werden kann.

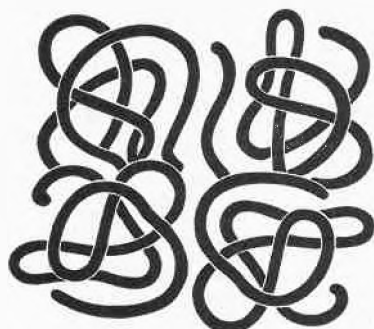


Abb.2 Quartärstruktur von Enzymen (globuläre Proteine mit Untereinheiten). Nach A. L. Lehninger, *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York 1970

Indem zwei oder mehr Untereinheiten mit Tertiärstruktur aggregieren, kommt dem Enzym oft noch eine Quartärstruktur zu. Abb.2 zeigt die Schemazeichnung eines aus vier Untereinheiten bestehenden Enzyms. Erst die Vereinigung der identischen Untereinheiten (z. B. über Disulfidbrücken) bildet die aktive Form des Enzyms. Der katalytische Vorgang selbst spielt sich in aktiven Zentren ab, in denen oft ein Metallatom und (oder) ein

Cofaktor mehr oder weniger fest gebunden sind. Ein Cofaktor erfährt während der Umsetzung meist eine Umwandlung und muß regeneriert werden.

Das Problem, dem man sich bei der Immobilisierung von Enzymen gegenüber sieht, ist also die Erhaltung dieser komplizierten nativen Struktur mit ihren aktiven Zentren und gegebenenfalls die Berücksichtigung von Cofaktoren im Reaktionsablauf.

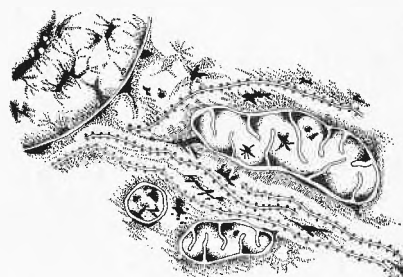


Abb.3. Subzelluläre Strukturen. Kompartimentierte Enzymgruppen, teilweise an Membranen immobilisiert, bilden die zellulären Reaktoren

Auch die Quartärstruktur ist nicht die Endstufe der Strukturierung. Die Natur hat das Enzymprotein als zellulären Katalysator konstruiert. In der Zelle ist das Enzym lokalisiert und in vielen Fällen immobilisiert. Die entsprechenden Matrices nennt man die Biomembran; sie unterscheidet sich von den bislang verwendeten synthetischen oder natürlichen Matrix-Materialien in wesentlichen Punkten. Abb.3 zeigt den Ausschnitt aus einer kernhaltigen, einer sogenannten Eukaryoten-Zelle. Die einzelnen Kompartimente sind Orte verschiedener metabolischer Reaktionsfolgen und damit Träger verschiedener Enzymgruppen, im Sinn unserer Betrachtungen also Enzymreaktoren. An der Leistung zellulärer Reaktoren gemessen, sind alle bisherigen synthetischen Reaktoren noch sehr unbefriedigend.

Methoden der Immobilisierung von Enzymen

Eine Übersicht über Methoden und Nomenklatur der Immobilisierung von Enzymen zeigt Abb.4¹: jeder Immobilisierung entspricht eine Modifizierung der nativen Form des Enzyms. Im einen Fall, beim Einschließen, wird lediglich der Reaktionsraum des Enzyms begrenzt, im anderen Fall erreicht man die Immobilisierung durch chemische Bindung an die Matrix. Wir werden uns in der Folge hauptsächlich mit den Verfahren zur kovalenten Bindung des Enzyms beschäftigen.

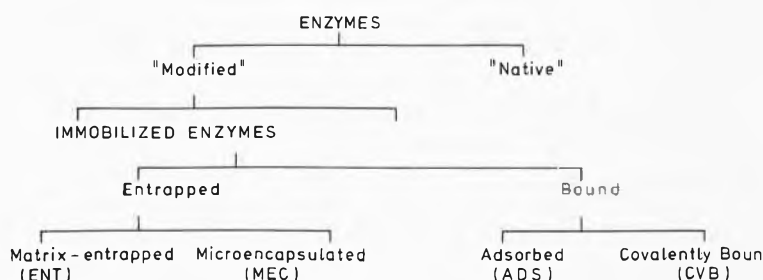


Abb.4. Zur Nomenklatur bei der Methodik zur Immobilisierung von Enzymen. Entsprechend den Empfehlungen des "Meeting on Enzyme Engineering" in Henniker, New Hampshire, USA, vom August 1971

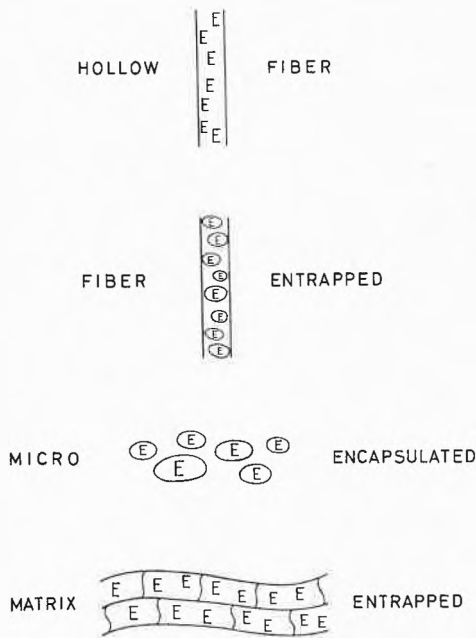


Abb. 5. Einschlußmethoden zur Immobilisierung von Enzymen

Zunächst aber ein Blick auf die Einschlußverfahren (Abb. 5): in der Fasertechnik ist der Reaktionsraum des Enzyms entweder in Kapillaren oder in Vakuolen, beim Mikroverkapseln in Vakuolen körnig-perlförmiger Kunstharze begrenzt. Zufuhr des Substrates und Abfuhr des Produktes erfolgen über semipermeable Membranen; dadurch ist die Enzymaktivität in hohem Maß diffusionslimitiert. Die Umsetzung hochmolekularer Substrate ist prinzipiell ausgeschlossen. Der Vorteil dieser Technik ist jedoch, daß sie im Prinzip für jedes Enzym anwendbar und relativ billig ist. Die letzte Schemazeichnung zeigt eine Methode, die möglicherweise größere Chancen haben wird: das Einsetzen des Enzyms oder bereits immobilisierter Formen desselben in molekularsiebartige oder gröbere Netzwerke.

Im folgenden wollen wir aber hauptsächlich Methoden besprechen, bei denen Enzyme an Matrices chemisch gebunden werden.

Die für die Strukturierung des Proteins verantwortlichen Restgruppen der Aminosäuren sind zum Teil auch die für die Bindung an eine Matrix kompetenten Funktionen. Aus dieser Tatsache resultiert eine Limitierung der Bindungsverfahren. Soll die Struktur erhalten bleiben, so können nur in begrenztem Umfang dieser Restgruppen zur Bindung aktiviert werden.

Abb. 6 zeigt einige typische Vertreter hydrophober und hydrophiler Aminosäuren: die stark hydrophoben, kaum polaren Reste beim Leucin bzw. Tryptophan sind für kovalente Bindungsreaktionen bedeutungslos. Sehr viel reaktionsfähiger ist die freie Carboxyl-Funktion der Glutaminsäure oder die nukleophilen, protonisierbaren Stickstoff-Funktionen beim Histidin und vor allem beim Lysin. Auch polare, aber ungeladene Restgruppen könn-

<p>Leucine</p> $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	<p>Lysine</p> $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3 \end{array}$
<p>Tryptophan</p> $\begin{array}{c} \text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ // \quad \\ \text{C}_6\text{H}_4 \quad \text{NH} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	<p>Serine</p> $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<p>Glutamic acid</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	<p>Cysteine</p> $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<p>Histidine (at pH 6.0)</p> $\begin{array}{c} \text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ // \quad \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	<p>Tyrosine</p> $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

Abb. 6. Aminosäuren mit hydrophoben und hydrophilen, polaren und unpolaren Restgruppen

ten bei Bindungsreaktionen eine Rolle spielen: Serin, Cystein und insbesondere Tyrosin sind Aminosäuren, die als funktionelle Einheit am Protein bindungsaktiv werden können.

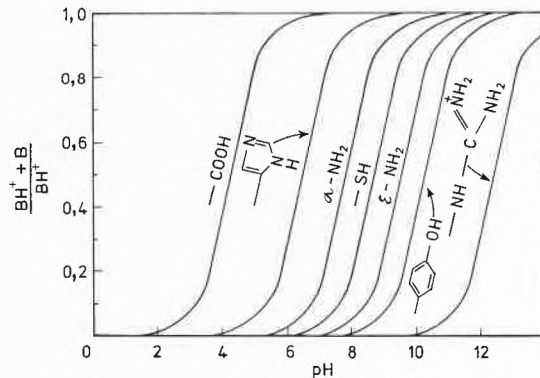


Abb. 7. Theoretischer Ionisierungszustand der Seitenketten von Aminosäuren als Funktion des pH. Nach G. E. Means und R. E. Feeney, *Chemical Modifications of Proteins*, Holden-Day Inc., San Francisco, Cal., 1971

Entscheidend für die Reaktionsfähigkeit ist der durch den pH des Milieus gegebene Ladungszustand der aktiven Restgruppen. Abb. 7 zeigt die Ionisierung funktioneller Gruppen von Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH. Im Protein kann allerdings die Kette den hier für die isolierte Aminosäure wiedergegebenen Säure/Basen-Charakter beeinflussen, meist im Sinn einer Nivellierung der pK-Werte. Das Verhältnis dieser Ladungszentren bestimmt den Ladungszustand des Proteins bei einem gegebenen pH.

Ionogene Bindungsmethoden, also die Immobilisierung des Enzyms an einem Ionenaustauscher, basieren auf dem Ladungsunterschied zwischen Protein und Matrix. Im allgemeinen wird man den Katalysator beim pH-

Optimum arbeiten lassen. Je weiter dasselbe vom isoelektrischen Punkt des Proteins entfernt ist, um so stärker ist dessen Ladungszustand, und um so stärker sind ionische Bindungskräfte an eine entgegengesetzt geladene Matrix.

Der Nachteil ionischer Bindungen ist, daß das Enzymprotein oder seine Untereinheiten mehr oder weniger leicht ausgewaschen werden. Teure Enzyme werden sich daher auf diese Weise nicht rentabel binden lassen. Der Vorteil ist die Regenerierbarkeit der Matrix. Ionisch gebundene Enzyme scheinen immerhin erste technologische Prüfungen bestanden zu haben.

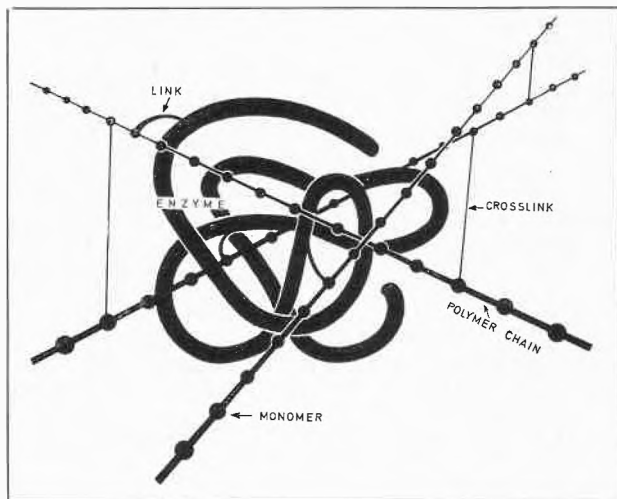





Abb. 8. Immobilisierte Enzyme durch kovalente Bindung an die Matrix

Schon früh haben Bemühungen eingesetzt, Proteine kovalent an eine Matrix zu binden; Abb. 8 zeigt das Prinzip schematisch: das Protein ist an bestimmten Stellen über sogenannte «Links» an die Matrix kovalent gebunden. Die Komponenten, die ein kovalent immobilisiertes Enzym charakterisieren, sind, abgesehen vom Enzym, das Monomer, die Polymerkette, der Vernetzer und vor allem das sogenannte «Link». Das Problem besteht im Funktionalisieren des Systems, um eine chemische Reaktion zur Bindung des Proteins zu ermöglichen. Das «Link» ist Träger dieser funktionellen Gruppen. Je nachdem, ob man diese funktionelle Gruppe über das Polymer, das Monomer, das Enzym, den Vernetzer oder über kombinierte Methoden in das System einführt, werden immer neue Formen kovalent gebundener Enzyme beschrieben (s. z. B. die in dieser Zeitschrift kürzlich erschienene Übersicht von Manecke²⁾).

Tabelle 1 zeigt einige typische funktionelle Gruppen eines solchen «Links» und Restgruppen von Aminosäuren, mit denen sie in Reaktion treten können. Die Zahl der Pluszeichen zeigt die relative Reaktivität, die oft stark mit den Bindungen variiert. Eingeklammerte Symbole zeigen leicht reversible Bindungen unter Rückbildung des Ausgangsproduktes an. Wie man sieht, kom-

men den primären Aminogruppen des Enzymproteins (ϵ -Amino beim Lysin und α -Amino am N-terminalen Ende) eine besondere Bedeutung zu: sie reagieren mit den meisten der heute zur kovalenten Bindung üblichen funktionellen Gruppen. Reaktiv sind auch Tyrosin- und Histidin-Reste, die insbesondere mit der Diazoniumgruppe, einer beliebten Bindungsfunktion, kuppeln. Den meisten der hier aufgelisteten funktionellen Reagentien werden wir bei der Besprechung einiger wichtiger Fixierungsmethoden begegnen.

Tabelle 1. Reaktivität von Aminosäure-Seitenresten gegenüber verschiedenen Reagentien

Reagens	-NH ₂	-SH			-COOH	
Aktive Säure-Derivate	+++	(+++)	(+++)	(+++)	-	-
Aldehyd	+++	-	-	-	-	-
Diazonium-salze	+++	+	+++	+++	-	+
Isocyanate, Isothio-cyanate	+++	(+++)	(++)	(+)	(+)	-
Sulfonyl-Halogenide	+++	+++	+++	+++	-	-
Carbo-Diimid	±	±	±	-	+++	-
Triazin-Derivate	+++	(+)	-	-	-	-
BrCN-aktivierte Polyole	+++	(+)	(+)	(+)	-	-
Halogenacycle und Alkyle	+	+++	-	-	-	-

+, + + +: relative Reaktivitäten

±: reaktiv je nach Bedingungen

(): leicht reversibel unter Rückbildung der Ausgangsgruppe

Nach G. E. Means und R. E. Feeney, *Chemical Modifications of Proteins*, Holden-Day Inc., San Francisco, Cal., 1971, ergänzt und verändert

Die Tatsache, daß Proteine im allgemeinen alle diese Aminosäuren, wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen, enthalten, und ferner die Tatsache, daß verschiedene Restgruppen mit ein und demselben Reagens reagieren können, zeigt, wie schwierig es ist, selektive Bindungsreaktionen zu erhalten.

Viele der reaktiven Seitenketten von Aminosäuren in Proteinen können – wie gezeigt – in Abhängigkeit vom pH protoniert oder nicht protoniert vorliegen. Diese Formen zeigen stark unterschiedliche Nucleophilität: Amino- oder Imidazolgruppen werden durch Protonierung gegen die meisten Reagentien unempfindlich. Diese Abhängigkeit der Reaktivität vom pH ist ein möglicher Weg, den Verlauf einer Verknüpfungsreaktion bei gegebenem Reagens zu beeinflussen.

Wie oben erwähnt, sind hydrophile Gruppen des Proteins im allgemeinen an der Oberfläche konzentriert.

Stark hydrophobe, also schlecht benetzbare Träger sind daher im allgemeinen problematisch; solche Träger können aber bei partikulären, in der Zelle an lipophilen Matrices gebundenen Enzymen von Bedeutung werden. Zum Schutz der Konformation und damit der Aktivität des Enzyms und zur optimalen Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für das Substrat sollte das Protein nur an wenigen Stellen mit dem Träger und dort nur an seiner Oberfläche verbunden sein. Sterische, elektrostatische und Diffusions-Einflüsse können sonst entscheidenden Einfluß auf die Aktivität des Biokatalysators gewinnen. Zum Schutz des aktiven Zentrums bewährt es sich oft, Bindungsreaktionen in Anwesenheit von Substrat oder Cofaktor vorzunehmen.

Methoden zur kovalenten Fixierung durch Funktionalisieren der Matrix zeigt Abb. 9a. Sie setzen Polyole, meist Polysaccharide natürlichen Ursprungs, voraus. Die als erstes angeführte Aktivierung mit Bromcyan^{3,4} ist eine der häufigsten bei Laborversuchen angewendeten Immobilisierungsmethoden. Die aktive Form, vermutlich ein Iminocarbonat – an Sepharose gebunden heute be-

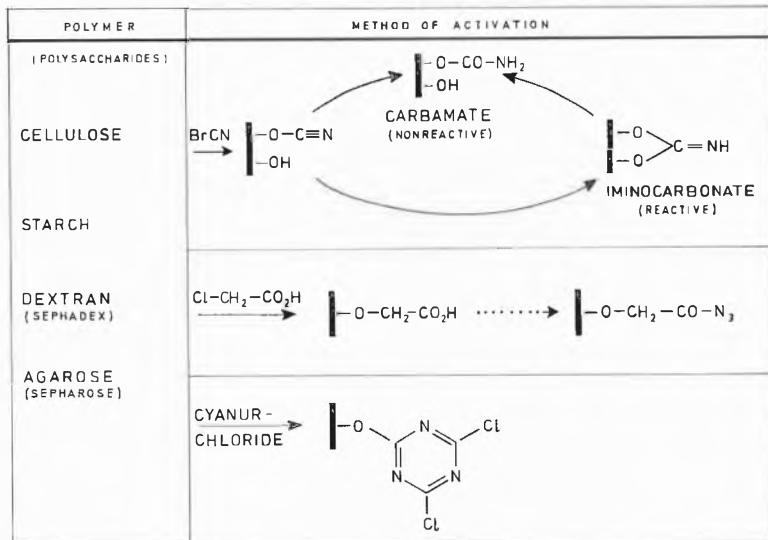
reits im Handel erhältlich⁵ – reagiert bevorzugt mit primären Aminogruppen des Proteins.

Zum Azid aktivierte Carboxymethylcellulose⁶ ist ein weiteres, häufig angewendetes Verfahren zur Aktivierung einer Matrix (Abb. 9a). Über das Azid werden nicht nur NH₂-Gruppen, sondern ebenso –SH-, –OH- und Histidyl-Reste acyliert.

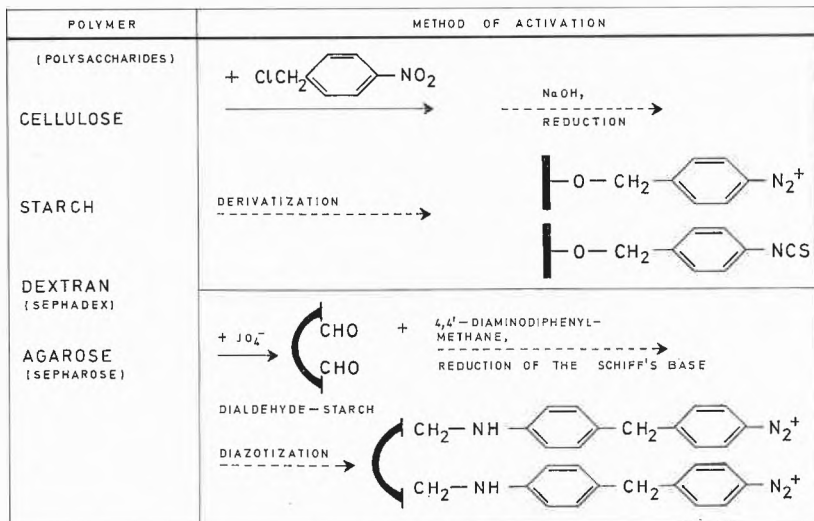
Die Aktivierung von Polysacchariden über Triazin-Derivate (Abb. 9a) führt zu alkylierenden «Links». Durch Ersatz der Halogenatome durch andere funktionelle «Links» ist die Methode sehr variabel^{7,8}.

Die Aminoarylierung von Polysacchariden ist ein weiteres Beispiel für ein Funktionalisieren des Polymers (Abb. 9b). Die Überführung der Aminofunktionen in eine Diazonium- bzw. Thiocyanat-Funktion führt zu recht aktiven «Links»^{9,10,11,12,13,14}.

Die Aldehyd-Stärke ist ein weiteres, im Handel erhältliches Ausgangsprodukt zur Derivatisierung: durch Überführung mit Methyldianilin in die Schiffsche Base und deren Reduktion erhält man wieder ein diazotierbares Ausgangsprodukt (Abb. 9b). Die Diazoniumfor-



9a



9b

Abb. 9
Kovalente Immobilisierung von Enzymen durch Funktionalisieren einer polymeren Matrix

men sind gegenüber Proteinen sehr reaktionsfreudig und kuppeln nicht nur mit Aminogruppen, sondern auch mit den Resten von Tyrosin und Histidin, weniger gut mit SH-Gruppen und mit Tryptophan¹⁴.

Trotz des Vorzugs der Hydrophilie scheinen sich Polysaccharid-Matrices, vermutlich wegen ihrer schlechten hydrodynamischen und mechanischen Eigenschaften, ihres starken Quellvermögens und schließlich wegen ihrer Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, für technische Reaktoren wenig zu eignen. Gut brauchbar sind sie jedoch in der Laboratoriumsdimension.

Interessante Möglichkeiten bringt das Funktionalisieren silicatischer Materialien (Abb. 10). Das bei Corning Glass entwickelte poröse Glas läßt sich z. B. mit 3-Aminopropyltriäthoxysilan silylieren und mit *p*-Nitrobenzoylchlorid und nachfolgender Reduktion aminoarylieren. Man erhält so wieder das Ausgangspräparat zu einer Diazotierung, diesmal an Glas^{15, 16}. Spezielle Vorbehandlung der Glasoberfläche ermöglicht eine beträchtliche Variation der primär reaktiven Zentren. Durch Verwendung modifizierter Organosilane kann das Spektrum funktioneller Gruppen, die auf den anorganischen Träger bin-

den, erheblich erweitert werden. Dem Vorteil der hohen mechanischen Stabilität der Matrix steht der Nachteil eines relativ teuren Bindungsverfahrens gegenüber.

Eine völlig andere Matrix, deren Funktionalisierung insbesondere von Hornby untersucht wurde, ist Nylon^{17, 18}. Das Prinzip ist in Abb. 11 dargestellt: die Polycaprolactam-Kette wird durch kontrollierte Säureeinwirkung partiell hydrolysiert; man spricht vom "Etched-Nylon". Sowohl die freien Carboxyl- als auch die freien Aminogruppen können derivatisiert werden. Im Fall der Carboxylgruppe wird die korrelierende Aminogruppe mit salpetriger Säure abgespalten. Die Aktivierung der Carboxylgruppe erfolgt über das Azid, das Säurehalogenid oder durch Überführung in das Benzidinamid und nachfolgende Diazotierung. Bei der Aminogruppe bewährt sich die Aktivierung mit Glutaraldehyd: als Reaktionsmechanismus formuliert man die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aminogruppe der Matrix einerseits und den primären Aminogruppen des Proteins andererseits.

Völlig andere Wege geht man bei der Funktionalisierung des Monomeren. Die Bildung einer solchen Matrix setzt

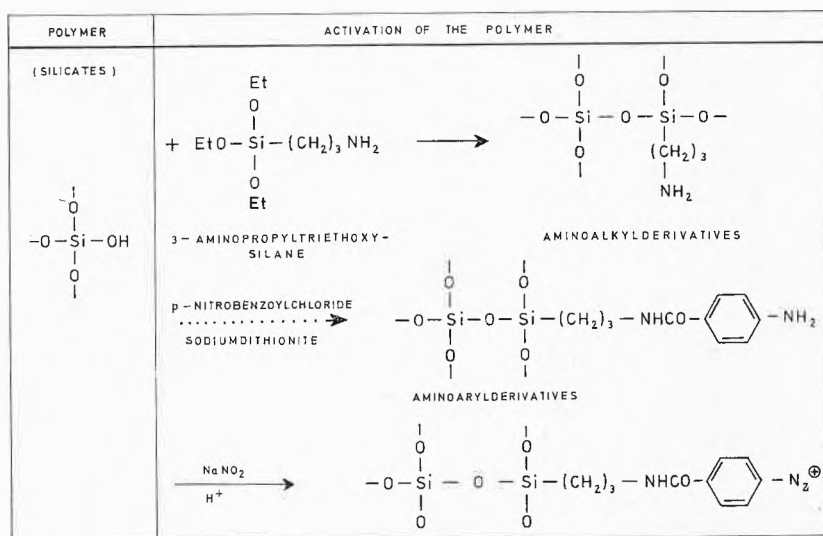


Abb. 10
Kovalente Immobilisierung von Enzymen durch Funktionalisieren einer polymeren Matrix: III

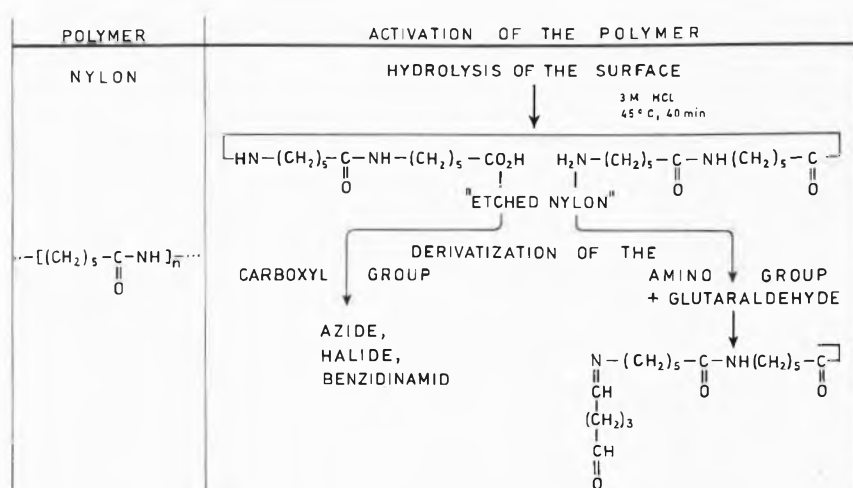


Abb. 11
Kovalente Immobilisierung von Enzymen durch Funktionalisieren einer polymeren Matrix: IV

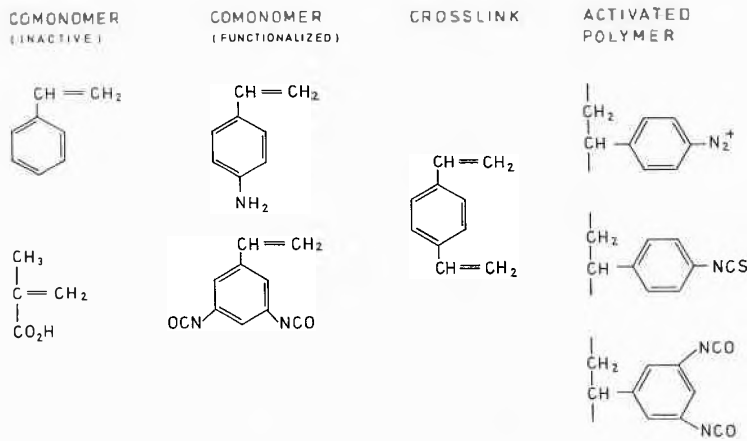


Abb. 12
Kovalente Immobilisierung von Enzymen durch
Funktionalisieren von Monomeren: I

die Copolymerisation eines inaktiven und eines funktionalisierten copolymerisierbaren Monomeren sowie einen Vernetzer voraus. Die außerordentliche Variationsfähigkeit dieser Methoden zeigen die Abbildungen 12 mit 15. Sie haben den Vorteil, die Eigenschaften der Matrix in weiten Grenzen variierbar zu gestalten. In der in Abb. 12 dargestellten Ausführungsform sieht man die Copolymerisation von Styrol mit Aminostyrol bzw. Metaisocyanatostyrol unter Verwendung von Divinylbenzyl als Vernetzer. Die Aktivierung der Aminogruppe erfolgt in üblicher Weise zur Diazo-, Isocyanato- und Thiocyanato-Gruppe, soweit sie nicht schon im Comonomeren vorgebildet sind. Diese Verfahren zählen zu den ersten Immobilisierungsmethoden für Enzyme überhaupt¹⁹. Durch Copolymerisation der Acrylsäure mit ihrem *m*-Fluor-anilid erhielt Manecke eine Matrix, die sich nitrieren und so das Fluor in eine gegenüber Proteinen reaktive Form bringen läßt^{20, 2}.

Die hier dargestellten Matrices haben relativ hohe mechanische Stabilität und lassen sich in sphärischen Partikeln herstellen, wodurch sie gute hydrodynamische Eigenschaften haben. Sie sind gegenüber bakteriellen Befall völlig inert. Von gewissem Nachteil ist die Hydrophobie der Matrix, was zu einer relativ hohen adsorptiven Bindung des Enzyms führen kann.

Das Prinzip, die kupplungsfähige Gruppe über das Comonomere in die Matrix einzuführen, wurde auf der Basis von Acrylamid-Polymeren von Barker variiert (Abb. 13): Acrylamid wird mit seinen N-substituierten Derivaten, die Träger einer funktionellen oder in der Matrix nachträglich funktionalisierbaren Gruppe sind, copolymerisiert^{21, 22}. Abb. 13 zeigt einige dieser Substituenten: der *p*-Aminophylrest, der in der Matrix diazotiert – oder in die Cyanato- bzw. Thiocyanato-Form übergeführt werden kann; die Hydrazidgruppe, Ausgangsprodukt für die Azidfunktion; die Thiol- bzw. Thiolactonfunktion, die an sich bereits kupplungsaktiv gegenüber dem Protein sind; eine Acetalfunktion, die vor der Reaktion mit dem Protein zur Carbonylfunktion hydrolysiert werden muß*.

Katchalski, Goldstein und Mitarbeiter waren Pioniere der Methodik der kovalenten Bindung von Enzymen an Anhydridgruppen-haltige Copolymere. Das funktionelle Monomere war Maleinsäure, das inaktive Comonomere war Maleinsäure, das inaktive Comonomere Äthylen^{24, 25}. Einpolymerisierte Maleinsäure läßt sich

* Diese vorgefertigten Matrices werden nebst einer Handhabungsvorschrift unter dem Warenzeichen «Enzacryl» von der Firma Koch Light angeboten²³. Diese Immobilisierungsmethoden bieten, zumindest für Laboratoriumsmethoden, eine interessante Ergänzung zum Bromcyanverfahren.

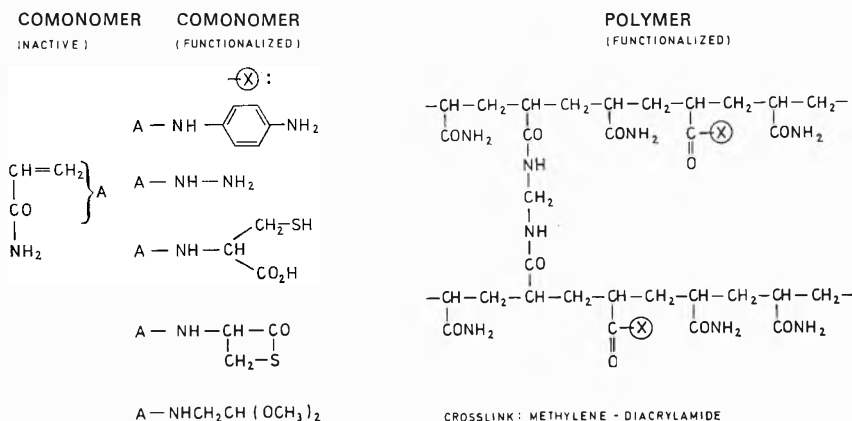


Abb. 13
Kovalente Immobilisierung von Enzymen
durch Funktionalisieren von Monomeren: II

COMONOMER (INACTIVE)	COMONOMER (FUNCTIONALIZED)	CROSSLINK	ACTIVATED POLYMER
$\text{CH}_2 = \text{CH}_2$	$\text{HC} - \text{CO}_2\text{H}$ \parallel $\text{HC} - \text{CO}_2\text{H}$	$\text{COCH} = \text{CH}_2$ \parallel NH CH_2 \parallel NH $\text{COCH} = \text{CH}_2$	$\text{CH} - \text{CON}_3$ $\text{CH} - \text{CON}_3$
$\text{CH}_2 = \text{CHCONH}_2$ $\text{CH}_2 = \text{C} - \text{CONH}_2$ $\quad \quad \quad \mid$ $\quad \quad \quad \text{CH}_3$	$\text{HC} - \text{CO}$ \parallel $\text{HC} - \text{CO}$ $\quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown$ $\quad \quad \quad \text{O}$	$\text{CH} = \text{CH}_2$ \mid O \mid CH_2 \mid CH_2 \mid O \mid $\text{CH} = \text{CH}_2$	$\text{CH} - \text{CO}$ $\quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup$ $\quad \quad \quad \text{O}$
$\text{CH} = \text{CH}_2$ \mid O \mid CH_3	$\text{H}_2\text{C} = \text{C} - \text{CO}$ $\quad \quad \quad \mid$ $\quad \quad \quad \text{H}_3\text{C}$ $\text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{CO}$ $\quad \quad \quad \mid$ $\quad \quad \quad \text{H}_2\text{C}$	$\text{CO} - \text{C} = \text{CH}_2$ $\quad \quad \quad \mid$ $\quad \quad \quad \text{CH}_3$ O \mid CH_2 \mid CH_2 \mid O \mid CH_3 $\text{CO} - \text{C} = \text{CH}_2$	$\text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{CO}$ $\quad \quad \quad \mid$ $\quad \quad \quad \text{CH}_2$ $\text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{CO}$ $\quad \quad \quad \mid$ $\quad \quad \quad \text{CH}_2$
$\text{CH} = \text{CH}_2$ \mid O \mid CH_2CH_3			

Abb. 14
Kovalente Immobilisierung von Enzymen durch Funktionalisieren von Monomeren: III

leicht in ihr Anhydrid überführen, Anhydride zum Azid, Säurechlorid, Hydrazid usw. weiter funktionalisieren. Dieses Prinzip hat eine große Zahl insbesondere industrieller Weiterentwicklungen gebracht, die in etwa in Abb. 14 zusammengefaßt sind und ihren Niederschlag in zahlreichen Patentanmeldungen gefunden haben⁽²⁶⁻³³⁾. Sie unterscheiden sich im inaktiven Comonomer – hier wird statt Äthylen Acrylamid oder Vinyläther verwendet – im Anhydrid und im Crosslink. Durch Kombination dieser Komponenten konnten die Eigenschaften der Matrix erheblich variiert werden.

Interessante Patentanmeldungen betreffen Copolymerisation von oligo- bzw. monomeres Acrolein, bei dem die Carbonylfunktion als Sulfit oder Acetal geschützt ist. Erst im fertigen Harz wird sie durch Hydrolyse reaktiviert³⁴.

Einen beachtlichen Fortschritt gegenüber diesem Verfahren brachte eine Idee von Jaworek^{35, 36}: hier wird

das Enzymprotein funktionalisiert und so in die Form eines Comonomeren gebracht. Das geschieht durch Vorinkubation mit heterobifunktionalen «Links». Die eine Funktion ist der Vinylrest zum Copolymerisieren, die andere eine Funktion, die mit dem Protein reagiert. Typische Beispiele sind Epoxypropylacrylat und Acryloylchlorid. Comonomer und Crosslink bleiben dieselben (Abb. 15).

Ein Vergleich des Verfahrens der Copolymerisation des funktionalisierten Proteins mit anderen Immobilisierungsverfahren auf der Basis der Katalysatoraktivität zeigt Tabelle 2 am Beispiel der Glucoseoxidase. Um Einflüsse des Polymeren möglichst auszuschalten, wurden nur Matrices auf Acrylamid-Basis verglichen. Die deutlich höheren Aktivitäten bei der Copolymerisation mit dem aktivierten Protein ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß dieses Verfahren besonders schonend für die Quartärstruktur ist.

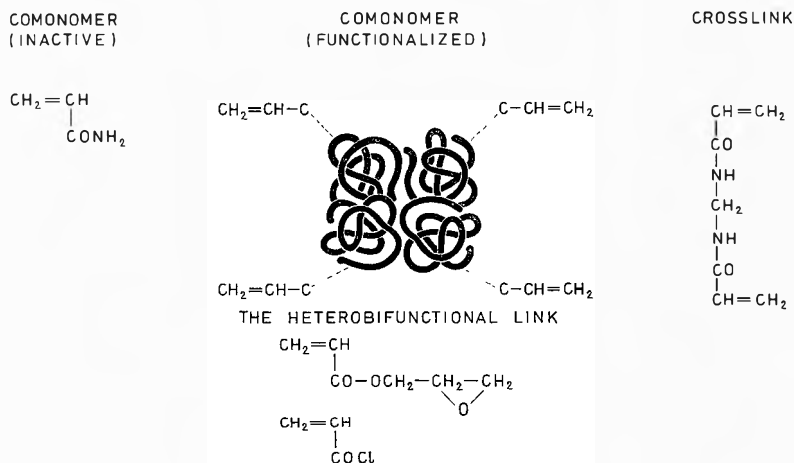


Abb. 15
Kovalente Immobilisierung von Enzymen durch Funktionalisieren des Enzyms

Tabelle 2. Immobilisierung von Glucose-Oxidase an Polyacrylamid-Matrix nach verschiedenen Fixierungsmethoden

carrier	method	spec. act. (U/g)
acrylamide-maleic acid copolymer	azide	8
acrylamide-maleic acid copolymer	anhydride	10
polyacrylamide	mechanically entrapped	80
polyacrylamide	copolymerization	500-1000

Zur Anwendung immobilisierter Enzyme sind bestimmte Formen, mechanische Stabilität und hydrodynamische Vorteile erwünscht. Diese Forderungen können bei den bisher besprochenen Matrices oft nicht erfüllt werden. Die meisten der bekannten Enzymträger auf der Basis natürlicher Polysaccharide haben aufgrund ihrer hohen Hydrophilie ausgesprochenen Gel-Charakter. Beim Einsatz dieser Gele in Kolonnen klumpen sie zusammen, die Durchflußgeschwindigkeiten werden geringer, und der Druckabfall steigt an. Verwendet man hydrophobe oder silicatische Matrices, so läßt sich oft nur wenig Enzym fixieren. Eine bisher noch wenig praktizierte Möglichkeit ist die Stabilisierung der Enzymträgerpartikel durch eine inerte, für Substrate noch gut durchlässige Hülle. Man spricht von "entrapped carrier fixed enzymes".

So wurden in offenporigem Polyurethanschaum enzymaktive Trägerpartikel eingearbeitet³⁵. Man kann zu den enzymaktiven Trägerpartikeln auch wäßrige Emulsionen von kolloidalem Teflon zufügen³⁶; rührt man diese Aufschlammung, so wird die kolloidale Suspension gebrochen, das Teflon koaguliert faserig und umhüllt die Trägerenzympartikel. Die Verwendung dieser Materialien in Kolonnen soll sehr konstant bleibende Umsatzraten ergeben.

Bei anderen Verfahren bemüht man sich, durch Fixierung an inerte Formkörper während des Immobilisierungsvorganges des Enzyms zu technischen Trägern zu gelangen. So versucht man z.B. auf inerte, stabile Polymere eine Hydrogelschicht aufzupropfen und anschließend das Enzym zu fixieren³⁷, oder man adsorbiert an polymere Träger und stabilisiert das Protein durch Quervernetzung³⁸.

Die Aktivität von immobilisierten Enzymen

Bei der Definition und der experimentellen Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Enzyme hat sich bislang keine einheitliche Auffassung durchgesetzt. Es wurde empfohlen¹, sich an die Definition der International

Units von Aktivitäten freier Enzyme anzulehnen: auch für das immobilisierte Enzym soll nun demnach die Anfangsgeschwindigkeit in μMol Substratumsatz pro Minute und Milligramm (hier Trockengewicht des Katalysators) bei 25°C angegeben werden. Wenn darüber hinaus empfohlen wird, auch den Proteingehalt des Trägers anzugeben, so hat das zwar für die Aktivität des Trägers nur sekundäre Bedeutung, charakterisiert aber die Ausbeute und damit die Qualität des Fixierungsverfahrens und der Matrix. Die experimentelle Ausführung der Bestimmung des gebundenen Proteins ist jedoch aufwendig. Man begnügt sich daher meist mit dem indirekten Wert, indem man von dem leichter zu bestimmenden, nicht gebundenem Restprotein auf das fixierte rückschließt.

Die bei immobilisierten Enzymen erhaltenen kinetischen Daten sind wesentlich anders zu interpretieren als bei löslichen Enzymen, wo sie in homogener Reaktion ermittelt werden. Sie sind von der Art des Trägers und des Bindungsverfahrens abhängig, durch die z.B. Ionenstärke und Ladung im Mikroenvironment, aber auch die Diffusionsverhältnisse beeinflusst werden. Die kinetischen Daten von immobilisierten Enzymen hängen daher wesentlich von der Rührgeschwindigkeit beim Batch-Verfahren bzw. von der Durchlaufgeschwindigkeit bei Säulenreaktoren ab. Deshalb sind Aktivitätsangaben hier nur bei Definition der Strömungsverhältnisse (sprich Rührgeschwindigkeit) charakteristisch.

Für feinkörnige Materialien hat Kaplan eine einfache Meßanordnung beschrieben³⁹ (Abb. 16): im temperierten Systemgefäß A, das mit einer Gummikappe H verschlossen ist, wird der Reaktionsansatz mit dem suspendierten Katalysator gerührt. Mit Hilfe einer Mikroliter-Luftpumpe wird über eine Nylonkapillare zu bestimmten

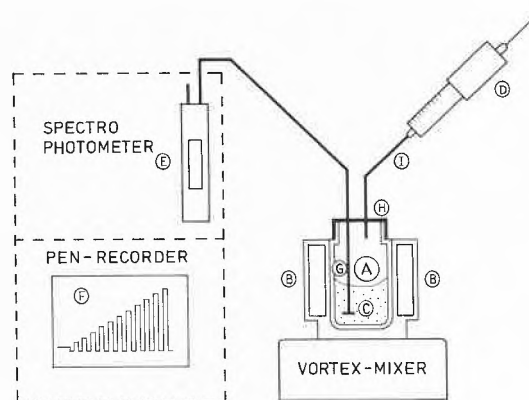


Abb.16. Gerät zur Bestimmung kinetischer Daten immobilisierter Enzyme

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| A Systemgefäß | B Temperiermantel |
| C Reaktionsmedium | D Mikroliter-Luftpumpen |
| E Durchflußküvette | F Schreiber |
| G Nylon-Kapillare | H Gummikappe |
| I Plastikschlauch | |

Nach F. Widmer et al., *Anal. Biochem.* 55 (1973) 282

Zeiten ein Aliquot im Photometer gemessen und automatisch registriert. Ein besonderer Vorteil dieser Anordnung besteht darin, daß man die Aktivität des freilöslichen und des gebundenen Enzyms in ein und derselben Versuchsanordnung bestimmen und daher unmittelbar vergleichen kann.

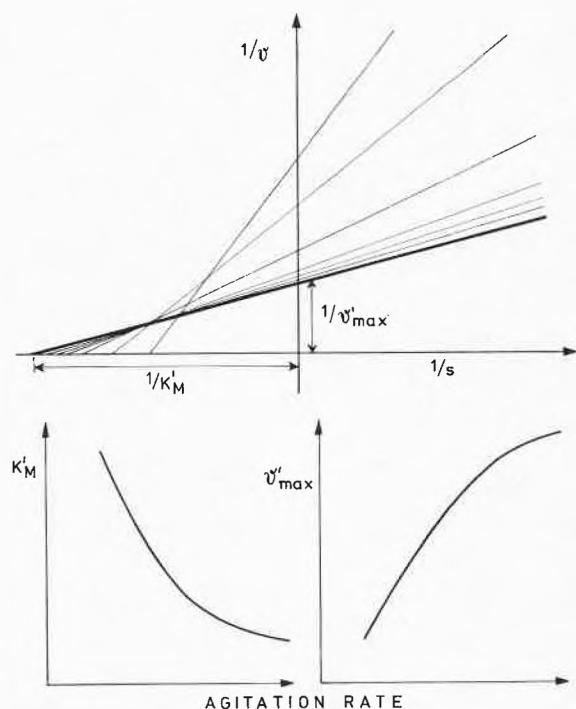


Abb. 17 a bis c. K'_M und v'_{max} als Funktion der Rückgeschwindigkeit (schematisch)

- a) in Abhängigkeit der Enzymkonzentration
b) in Abhängigkeit der Substratkonzentration

Abb. 17 a bis c zeigt allgemeine Aspekte dieses Vergleiches. Es soll betont werden, daß es sich hier nur um die schematische Darstellung von Funktionen handelt, von denen der Einzelfall mehr oder weniger stark abweichen kann. Die Darstellung ist ein Versuch, aus den zahlreichen Einzelpublikationen leicht verständliche Prinzipien zu formulieren.

Im Schemadiagramm der Abb. 17 a sind reziproke Reaktionsgeschwindigkeiten gegen reziproke Konzentrationen aufgetragen; die zugrunde liegende Funktion nach Lineweaver und Burk ist aus der Homogenkinetik des freien Enzyms durch Linearisierung der Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Gleichung) abgeleitet. Der Abszissenschnittpunkt definiert reziproke scheinbare Affinitäten des Substrates zum Enzym (scheinbare Michaelis-Konstante der Homogenkinetik); der Ordinatenschnittpunkt reziproke Maximalgeschwindigkeiten. In der Homogenkinetik führt diese Auftragung für ein gegebenes Enzym im allgemeinen zu eindeutigen Konstanten, hier verdeutlicht durch die stark gezogene Gerade. Für immobilisierte Enzyme sind diese Konstanten zuzüglich von der Matrix, vom Bindungsverfahren, für

ein gegebenes Trägerenzym jedoch besonders von hydrodynamischen Parametern abhängig: jede der dünn gezogenen Geraden entspricht z. B. einer bestimmten Rührgeschwindigkeit. Die gegen die Ordinatenachse konvergierenden, steiler werdenden Geraden entsprechen geringer Rührgeschwindigkeit, die gegen die stark gezogene, dem löslichen Enzym entsprechende Gerade konvergierenden Linien, hohen Rührgeschwindigkeiten. Der physikalische Hintergrund ist die Abnahme der Nernst'schen Diffusionsschicht mit zunehmender Rührgeschwindigkeit. Diese vereinfachte Darstellung berücksichtigt nicht Transportphänomene im Mikroenvironment.

In den Kurven der Abb. 17 b und c sind die nach Lineweaver und Burk (Abb. 17 a) ermittelten Abhängigkeiten dieser kinetischen Konstanten von hydrodynamischen Parametern schematisch wiedergegeben. Abb. 17 b zeigt die Abhängigkeit der scheinbaren Michaelis-Konstante von der Rührgeschwindigkeit. Ein inverser Kurvenverlauf ist für die Maximalgeschwindigkeit zu erwarten, wie aus den Schnittpunkten der Kurvenscharen mit den Ordinatenabschnitten in der Abb. 17 a zu entnehmen ist. Bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten beobachtet man im allgemeinen eine lineare Abhängigkeit. Die Neigungswinkel der linearen Abschnitte sind Charakteristika für die Matrix und das Bindungsverfahren und können Hinweise für die Entwicklung des Reaktors geben.

Die Affinität des Substrates zum immobilisierten Enzym muß nicht notwendigerweise – wie hier dargestellt – kleiner sein als für das lösliche Enzym. So können Ladungszentren der Matrix durch Einflüsse auf das Ionenmilieu in Ausnahmefällen höhere Substratkonzentrationen in der Nähe des gebundenen Enzyms bewirken; dadurch werden höhere scheinbare Affinitätskonstanten und Maximalgeschwindigkeiten vorgetäuscht. Der vorgegebene Rahmen erlaubt keine detaillierten Ausführungen, so daß wir uns auf diese Hinweise zur kinetischen Problematik beschränken müssen.

Anwendung von Trägerenzymen

Groß ist die Zahl der Versuche, Enzym-katalysierbare Reaktionen mit immobilisierten Enzymen praktikabel und wirtschaftlich zu gestalten. Ihre Aufzählung oder gar Wertung ist hier nicht möglich. Wir wollen uns daher auf den Versuch beschränken, einige Wegweiser zu dem nach dem Stand der Technik Möglichen zu geben.

Anwendungstechnische Versuche mit immobilisierten Enzymen kann man in zwei Gruppen einteilen: die einen betreffen das Gebiet der Analytik, insbesondere die automatisierbare Serienanalytik, die anderen präparative Verfahren. Die Forderungen an die Methodik sind hier grundverschieden. Während beiden gemeinsam die Forderung nach möglichst vollständigem Produktumsatz in möglichst kurzer Zeit gilt, ist im Fall des technologischen Prozesses die hohe Volumenausbeute eine Voraussetzung der Wirtschaftlichkeit; im analytischen Prozeß spielt das eine untergeordnete Rolle.

Im analytischen Prozeß ist das Enzym im allgemeinen im beträchtlichen Überschuß, die Reaktionsgeschwindigkeit ist von seiten des Enzyms her nicht limitiert; wir befinden uns im Gebiet der linearen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration (Abb. 18a).

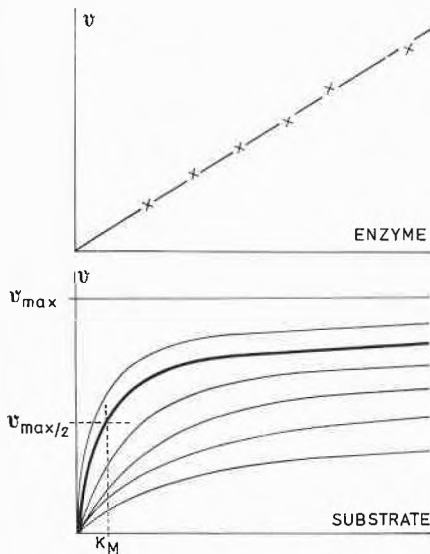


Abb. 18 a und b. Die Reaktionsgeschwindigkeit Enzym-katalysierter Reaktoren (schematisch)

Im technologischen Prozeß wird im allgemeinen unter Substratsättigung gearbeitet, und eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Steigerung der Katalysatormenge kann nur in den Grenzen der Wirtschaftlichkeit erreicht werden. Abb. 18b zeigt idealisierte Kurvenscharen für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratmenge. Die einzelnen Kurven gelten für verschiedene Enzymmengen. Wenn man auch im technologischen Prozeß im allgemeinen nicht bei Maximalgeschwindigkeit arbeiten kann, wird man doch bestrebt sein, diese Bedingungen durch Optimierung des Reaktors zu erreichen.

Jedes Verfahren mit immobilisierten Enzymen steht in Konkurrenz mit demselben Verfahren auf der Basis des frei löslichen Enzyms.

Bei analytischen Verfahren arbeitet man unter Enzymüberschuß. Das System ist dadurch im allgemeinen unempfindlich gegenüber Produkt- bzw. Substrathemmung. Darüber hinaus ist man meist gezwungen, mit hochgereinigten, also teuren Enzymen zu arbeiten (der Handelswert eines Enzyms wird im allgemeinen wesentlich stärker von seinem Reinheitsgrad als von seinem Rohstoff bestimmt). Beim Einmal-Test mit dem löslichen Enzym geht dieses verloren. Analytische Reaktoren mit immobilisierten Enzymen (z. B. in Analysenautomaten) könnten daher im Prinzip zu einer Alternative zum löslichen Enzym werden. Enzymreaktoren bei präparativen Prozessen befinden sich gegenüber dem löslichen Enzym in einer ungünstigeren Vergleichssitua-

tion. Hier wird im Prinzip bei Substratüberschuß gearbeitet; Produkt- oder Substrathemmung des Enzyms sind daher oft ein Problem. Beim Verfahren mit dem löslichen Enzym geht dieses zwar im Batch-Ansatz ebenfalls verloren, durch die Möglichkeit der Verwendung von Rohenzymen erspart man sich jedoch die meist kostenentscheidende Anreicherung zum Reinenzym. Immobilisierte Enzyme werden daher insbesondere für Analysenautomaten immer interessanter.

Dies soll am Beispiel der Blutzuckerbestimmung, einer im klinischen Labor durchgeführten Serienbestimmung von hohem diagnostischen Stellenwert, gezeigt werden. Die Konzentration der Glucose im Blut ist etwa 0,1%, also etwa $5 \cdot 10^{-3}$ M. Die der Bestimmung zugrunde liegende Reaktion wird vom Enzym Glucose-Oxidase katalysiert, wobei das entstehende H_2O_2 mit Katalase zerersetzt wird. Das komplette Reaktionsschema zeigt Abb. 19.

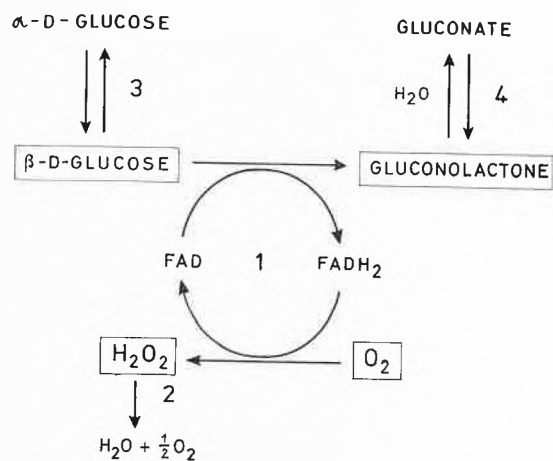


Abb. 19. Enzymatische Reaktionen bei der Glucose-Oxidation. 1 Glucose-Oxidase, 2 Katalase, 3 Mutarotase, 4 Lactonase

Auf dieser Basis wurde in unserem Laboratorium ein neuartiges Prinzip, das sogenannte «Permanentsystem», entwickelt⁴⁰ (Abb. 20): in einem kreisenden System befindet sich ein Vorratsgefäß für Puffer, der mit Luft gesättigt wird, ein Probenapplikator, der – ohne Unterbrechung der Strömungsgeschwindigkeit – die zu untersuchende Glucose-Probe aufnimmt. Beim Passieren der mit immobilisierter Glucose-Oxidase gefüllten Säule wird bei der Oxidation von Glucose Sauerstoff verbraucht und dieser Verlust mit einer Elektrode gemessen. Mit einem solchen analytischen Reaktor konnten mit einer Aktivität von 6 U Glucose-Oxidase 10000 Bestimmungen durchgeführt werden; dieselbe Aktivität ist nach dem herkömmlichen Küvettestest für eine einzige Bestimmung erforderlich. Es ist verständlich, daß dieses Verfahrensprinzip nicht auf die Messung von Glucosekonzentrationen beschränkt ist. Bleibt man beim Meßprinzip der O_2 -Elektrode, so kann man alle Sauerstoffumsetzenden Reaktionen messen, sofern man geeignete Oxidasen immobilisiert hat.

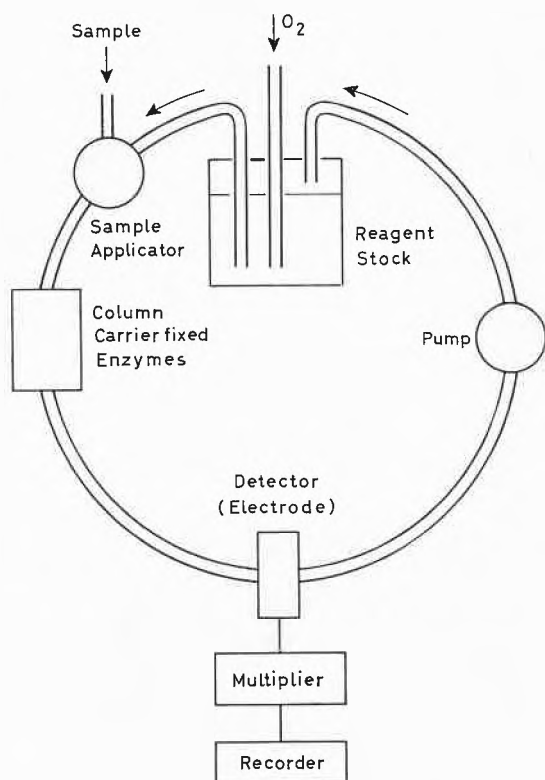


Abb. 20. Enzymreaktoren in Analysenautomaten. Fließdiagramm des Permanentensystems

Während hier beim Permanentensystem eine mit Granulat gefüllte Säule zum Einsatz kommt, sind für die bekannten Auto-Analyser-Systeme schlauchartige, oberflächlich mit Enzymen besetzte Reaktoren besser geeignet. Abb. 21 zeigt das Fließdiagramm für die Substratbestimmung in einem solchen System: die Schlauchpumpe fördert bestimmte Mengen von Verdünnungslösung (im einfachsten Fall Wasser) und die zu bestimmende Probe vom Probenappikator. Nach Einstellung einer homogenen Mischung werden die niedermolekularen Bestandteile zur Vermessung abdialysiert. Auf der Gegenseite der Dialyse dient ein Reagensgemisch, das alle Komponenten bis auf die Enzyme enthält, als Aufnahme Flüssigkeit für die durch die Membran diffundierenden Substratmoleküle, im vorliegenden Fall also für Glucose.

Nach Zumischen der Enzyme findet in einem Heizbad die Umsetzung statt. Die Extinktion der Indikatorkomponenten wird in einer Durchflußzelle im Photometer gemessen und auf einem Schreiber aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgt über einen Standard. Arbeitet man bei diesem Analysensystem mit trägergebundenen Enzymen, so entfallen die strichliert gezeichneten Bestandteile des Fließschemas; dafür befindet sich an der Stelle der Mischschlange der vorerwähnte Schlauchreaktor (SR).

Die analytischen Möglichkeiten mit immobilisierten Enzymen sind nicht auf Analysenautomaten beschränkt. So erfährt derzeit die Entwicklung von ionenselektiven Elektroden durch Kombination mit (Membran-) immo-

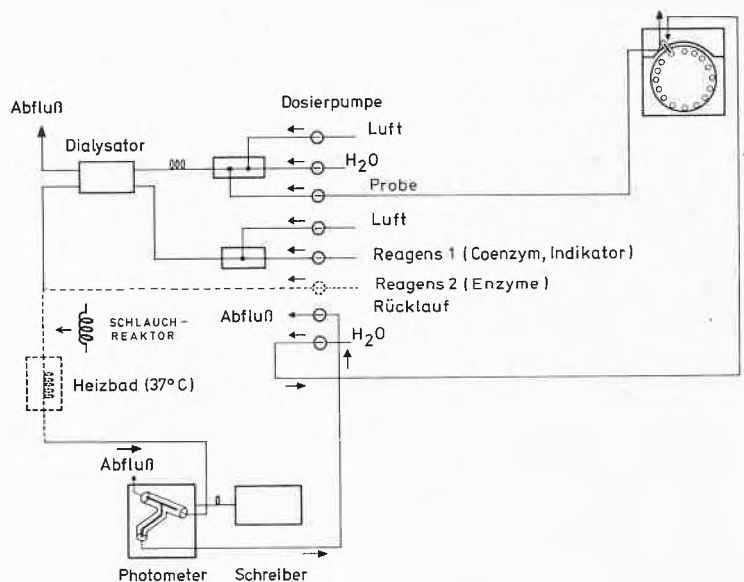


Abb. 21. Auto-Analyser. Fließdiagramm für den Einsatz löslicher und immobilisierter Enzyme

bilisierten Enzymen neue Impulse. Der Anwendungsbereich dieser Elektroden läßt sich nämlich auf die Bestimmung solcher Substrate ausdehnen, die durch Umsatz mit dem fixierten Enzym dasjenige Produkt freisetzen, welches über die Elektrode meßbar ist. Man spricht von Enzymelektroden^{41, 42}.

Zur Lösung bestimmter strukturanalytischer Fragen von Makromolekülen eröffnen immobilisierte Enzyme vermutlich neue Wege. Dazu gehört die Totalhydrolyse von Proteinen zur Aminosäureanalyse mit einem immobilisierten Proteasenmix, wie er kürzlich von Bennett et al.⁴³ vorgeschlagen wurde.

Nun zu Fragen präparativer Anwendungen: So hätte ein auf der Glucose-Oxidase-Reaktion basierender biotechnologischer Prozeß zur Gewinnung von Gluconat unter Umständen wirtschaftliche Bedeutung. Hier steht die Forderung nach hoher Volumenausbeute im Vordergrund. Bei einer z. B. 20prozentigen Glucose-Lösung würde man etwa 200 mal konzentrierter arbeiten als der analytische Reaktor. Das entstehende H_2O_2 führt rasch zur Inaktivierung der Enzyme; man erhält kaum Gluconat-Bildung. In Abb. 22 sind diese Verhältnisse in der untersten Kurve dieser in unserem Laboratorium ermittelten Gluconat-Zeitfunktion wiedergegeben.

Erst die Cofixierung von Katalase, wodurch das H_2O_2 am Ort der Entstehung zersetzt wird, kann eine gewisse Stabilisierung des Enzymes bei befriedigender Gluconat-Bildung erreichen. Ein Trägerenzymverfahren muß hier mit dem heute üblichen mikrobiologischen Verfahren konkurrieren, bei dem die Biomasse bis zu 5 mal wieder verwendet wird; man kann hier und heute noch die Zelle als den rationelleren Bioreaktor betrachten.

Wie kann die Wirtschaftlichkeit eines Verfahrensschrittes mit einem immobilisierten Enzym vor der Entwicklung des Reaktors abgeschätzt werden?

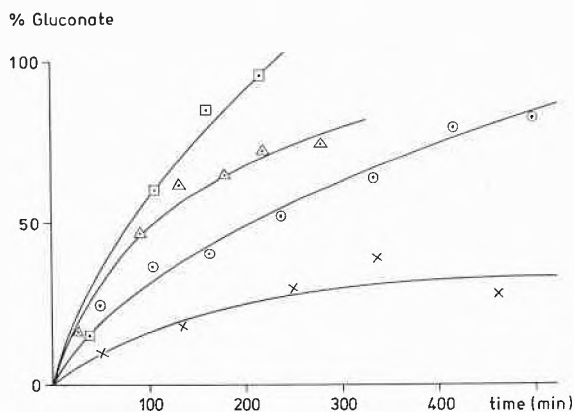


Abb. 22. Glucose-Oxidation durch Enzygel® Glucose-Oxidase/Katalase. Immobilisierte Enzymaktivität in U:

	GOD	KAT
×	73	—
○	73	80 · 10 ³ (gelöst)
△	70	150
□	60	1 · 10 ³

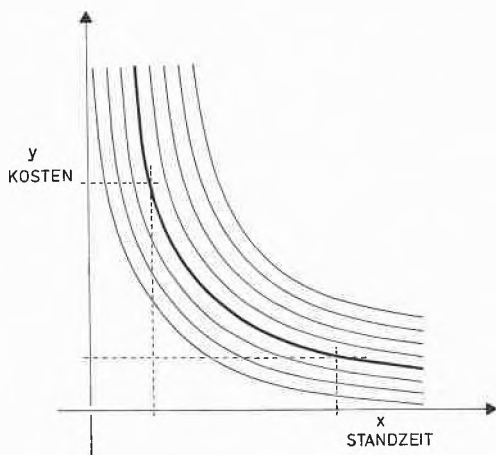


Abb. 23. Wirtschaftlichkeit von Verfahren mit immobilisierten Enzymen. Schematische Kurvenscharen nach

$$y = k \cdot \frac{a}{b} \cdot \frac{1}{x}$$

wobei:

- y die Kosten der enzymkatalysierten Teilreaktion,
- x die Standzeit,
- a die Herstellkosten,
- b den Wirkungsgrad des Biokatalysators und,
- k einen Umrechnungsfaktor bedeuten (Einzelheiten siehe den Text)

Abb. 23 zeigt in Form schematisierter, hyperbolischer Kurvenscharen die allgemeine Abhängigkeit der Kosten dieses Verfahrensschrittes von der Stabilität des Enzymkatalysators. In der zugrunde liegenden Funktion

$$y = k \cdot \frac{a}{b} \cdot \frac{1}{x}$$

bedeuten:

- y die Kosten des enzymkatalysierten Teilschrittes für die pro Katalysatormenge und Zeiteinheit hergestellte Produktmenge,
- x einen Ausdruck für die Stabilität des Katalysators, d.h. eine Standzeit bei kontinuierlichen Verfahren, oder eine Zahl von Einzelansätzen, multipliziert mit der Einsatzzeit bei diskontinuierlichen Verfahren,
- a die Herstellungskosten und
- b einen Ausdruck für den Wirkungsgrad des Katalysators. Er wird am besten durch $\frac{u}{K_M} \cdot \tau$ wiedergegeben; hier bedeuten
 - u den Substratumsatz pro Zeit und Reaktorvolumen,
 - K_M die scheinbare Affinitätskonstante und
 - τ die Verweilzeit,
- k ist ein Faktor zur Umrechnung der unterschiedlichen Zahlenwerte auf die gleiche Dimension.

(Der Ansatz enthält die nur sehr bedingt zutreffende Vereinfachung einer konstanten Umsatzgeschwindigkeit, also einer Reaktion nullter Ordnung. Er macht daher keine Aussagen zum Umsetzungsgrad des Substrates, d.h. zur Ausbeute. Verlässliche Daten hierüber sind erst aus Optimierungsexperimenten erhältlich.)

Die Lage der einzelnen Kurven ist durch den Quotienten $\frac{a}{b}$ bestimmt: außenliegende Kurven für teure Matrices oder wenig aktive Biokatalysatoren; innen die Kurven für die umgekehrte Situation. Der wirtschaftlich vertretbare Bereich von y ist bekannt, a und b kann in vielen Fällen geschätzt und in einem Computer-Programm die kompetenten Kurvenscharen ermittelt werden; man kann dann den zugehörigen x-Wert suchen und abschätzen, ob die erforderliche Stabilität realistisch ist. Natürlich gibt es auch andere Ansätze zur Wirtschaftlichkeitsrechnung.

Vor diesem Hintergrund scheinen bisher nur wenige der zahlreichen Laborexperimente mit immobilisierten Enzymen einer wirtschaftlichen Prüfung standzuhalten. Ein Anwendungsgebiet scheint sich bei der Hydrolyse niedermolekularer Substrate abzuzeichnen. So hat bei der Racematenspaltung optisch aktiver Verbindungen die hohe Stereospezifität mancher Hydrolasen eine Chance gegenüber chemischen und mikrobiologischen Verfahren, vorausgesetzt, daß man hier nicht zu teure Matrices und Bindungsverfahren entwickelt.

Ein typisches Beispiel ist der Einsatz von N-Acylasen zur stereospezifischen Hydrolyse racemischer N-Acyl-Aminosäuren: die Acylierung (i.a. Acetylierung) am α -Aminostickstoff von Aminosäuren führt zu Substratformen, bei denen durch N-Acylasen selektiv nur L-N-Acylformen hydrolysiert werden. Die Trennung von der unveränderten D-Form erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit. Die Methode, von Chibata zu einem Kreisprozeß entwickelt⁴⁴, zeigt Abb. 24 im Fließschema: der Reaktor ist eine Säule mit dem an DEAE-Cellulose ionogen gebundenen Enzym; ferner ein Aggregat zur Konzentrierung und fraktionierten Kristallisation. N-Acetylformen sind wieder racemisierbar und können dem Prozeß neuerlich zugeführt werden. Ein Nachteil ist die relativ teure Derivatisierung der Aminosäuren.

Eine spezielle N-Acylase ist die Penicillin-Acylase, ein vor allem in *E. coli* induzierbares Enzym: das natürliche Penicillin G wird hydrolytisch zu 6-Aminopenicillansäure (APA) gespalten. Eine Anwendung des Enzyms in immobilisierter Form (s. z. B. 45, 46) zur Herstellung des für synthetische Penicilline wichtigen Zwischenproduktes APA scheint bei einigen Antibiotika-Herstellern in Gang zu kommen.

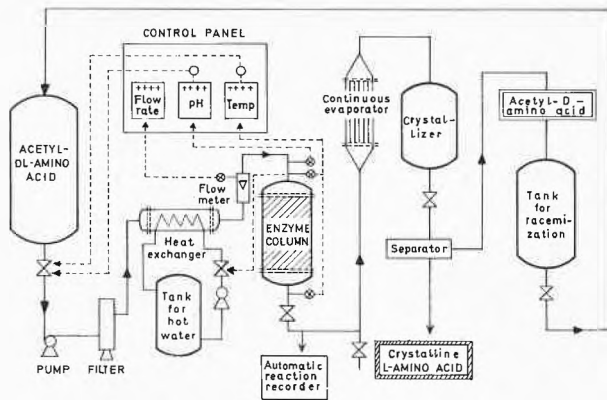


Abb. 24. Fließdiagramm einer kontinuierlichen Produktion von L-Aminosäuren mit immobilisierter N-Acylase (I. Chibata)⁴⁴. Siehe auch: *Ferment. Technol. To Day* 387 (1972)

Eine Technologie, bei der sich der Einsatz von immobilisierten Enzymen offenbar langsam durchsetzt, ist die Erzeugung eines Glucose/Fructose-Sirups aus Stärke, der in der Süßung von flüssigen und festen Nahrungsmitteln eine zunehmende Rolle spielt.

Stärke ist ein Gemisch aus linearen (Amylose) und verzweigten (Amylopektin) α -1,4-Glucanen (Verzweigung: α -1,6-Bindung). Für ihren vollständigen Abbau zu Glucose wird meist ein Gemisch von technischen Glycohydrolasen (Amylasen aus Bakterien, Amyloglucosidasen aus Pilzen) in löslicher Form eingesetzt. Ihre Spezifität zeigt Abb. 25 a. Für diese Stufe scheinen immobilisierte Enzyme nicht wirtschaftlich zu sein; vermutlich sind sie auch zu wenig aktiv, weil das makromolekulare Substrat aus sterischen oder Diffusionsgründen nur schwer an die aktiven Zentren des immobilisierten Enzyms gelangt.

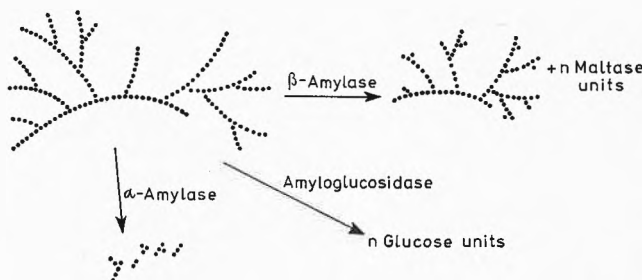


Abb. 25 a. Die Abbauprodukte von Stärke durch α - und β -Amylase sowie durch Amyloglucosidase. Nach W.M. Fogarty et al., *Process Biochem.* 9 (1974) 11

Anders liegt der Fall bei der nachfolgenden enzymatischen Isomerisierung der Glucose, bei der ein etwa äquimolekulares Gleichgewichtsgemisch der epimeren Zucker Glucose und Fructose erreicht wird (Abb. 25 b). Hier scheint der Einsatz immobilisierter Formen gegenüber dem löslichen Enzym wirtschaftliche Vorteile zu bringen. Aus den USA wird über einen kontinuierlichen Prozeß mit an Cellulose-Austauschern gebundener Glucose-Isomerase berichtet, nach dem bereits mehrere hunderttausend Tonnen eines Fructose-Glucose-Sirups produziert wurden, der unter der Bezeichnung «Isomerase» auf dem Markt ist.

Die Anwendungsmöglichkeiten immobilisierter Enzyme soll hier auf diese in der Technik heute bereits realisierten Beispiele begrenzt bleiben; viele einschlägige Übersichten haben inzwischen Prospekte weiterer Verfahren für die Zukunft entworfen^{47, 48, 49}. Die Entwicklung dürfte jedoch bisher nicht wesentlich über das Experiment hinaus gediehen sein. Ihr Stellenwert gegenüber konventioneller Methoden ist daher heute noch schwer abzuschätzen.

Literatur

- 1 *Biotechnol. Bioengng. Symposium* 3 (1973) 15, Interscience Publishers (Division of John Wiley & Sons), New York/London/Sydney/Toronto.
- 2 G. Manecke, *Chimia* 28 (1974) 467.
- 3 R. Axen, J. Porath und S. Ernback, *Nature* (London) 214 (1967) 1302.
- 4 J. Porath, R. Axen und S. Ernback, *Nature* (London) 215 (1967) 1491.
- 5 Pharmacia Fine Chemicals AG (Uppsala, Schweden), Firmenschrift (1974).
- 6 M. A. Mitz und L. J. Summaria, *Nature* (London) 189 (1961) 576.
- 7 G. Kay und E. M. Crook, *Nature* (London) 216 (1967) 514.
- 8 G. Kay, M. D. Lilly, A. K. Sharp und R. J. H. Wilson, *Nature* (London) 217 (1968) 641.
- 9 B. P. Surinov und S. E. Manoilov, *Biokhim.* (Engl. Transl.) 31 (1966) 337.
- 10 S. A. Barker, P. J. Somers und R. Epton, *Carbohydr. Res.* 8 (1968) 491.
- 11 W. M. Ledingham und W. E. Hornby, *Fed. Europ. Biochem. Soc. Lett.* 5 (1969) 118.
- 12 S. A. Barker, P. J. Somers und R. Epton, *Carbohydr. Res.* 9 (1969) 257.
- 13 R. Axen und J. Porath, *Nature* (London) 210 (1966) 367.
- 14 L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumenberg, D. Atlas und Y. Levin, *Biochem.* 9 (1970) 2322.

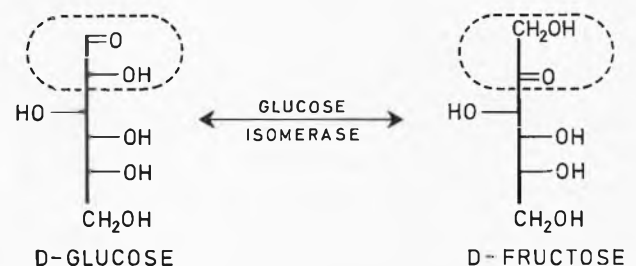


Abb. 25 b. Enzymatische Isomerisierung der Glucose

- 15 H. H. Weetall, *Science* 166 (1969) 615.
- 16 H. H. Weetall, *Nature* (London) 223 (1969) 959.
- 17 W. E. Hornby und H. Filippusson, *Biochim. Biophys. Acta* 220 (1970) 343.
- 18 P. V. Sundaram und W. E. Hornby, *Fed. Europ. Biochem. Soc. Lett.* 10 (1970) 325.
- 19 G. Manecke und S. Singer, *Makromol. Chem.* 36 (1959) 119.
- 20 G. Manecke und S. Singer, *Makromol. Chem.* 39 (1960) 13.
- 21 S. A. Barker, P. J. Somers, R. Epton und J. V. McLaren, *Carbohydr. Res.* 14 (1970) 287.
- 22 S. A. Barker und R. Epton, *Process Biochem.* 5 (1970) 14.
- 23 Koch-Lights Laboratories Ltd., Colnbrook, Bucks., England, Firmenschrift (1971).
- 24 Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein und E. Katchalski, *Biochem.* 3 (1964) 1905.
- 25 L. Goldstein, Y. Levin und E. Katchalski, *Biochem.* 3 (1964) 1913.
- 26 Deutsche Offenlegungsschrift 2062818, Merck Patent GmbH (1970).
- 27 Deutsche Offenlegungsschrift 2008990, Merck Patent GmbH (1970).
- 28 Deutsche Offenlegungsschrift 1695662, Roehm GmbH (1967).
- 29 Deutsche Offenlegungsschrift 2215687, Bayer AG (1972).
- 30 Deutsche Offenlegungsschrift 2215539, Bayer AG (1972).
- 31 Deutsche Offenlegungsschrift 2215509, Bayer AG (1972).
- 32 Deutsche Offenlegungsschrift 2215512, Bayer AG (1972).
- 33 Deutsche Offenlegungsschrift 1935711, Boehringer Mannheim GmbH (1969).
- 34 US Pat. 3753861, American Cyanamid Co. (1970).
- 35 US Pat. 3791927, American Cyanamid Co. (1971).
- 36 US Pat. 3766013, American Cyanamid Co. (1971).
- 37 Deutsche Offenlegungsschrift 2326863, US Atomic Energy Commission (1972).
- 38 Deutsche Offenlegungsschrift 2112740, Monsanto Co. (1971).
- 39 F. Widmer, J. E. Dixon und N. O. Kaplan, *Anal. Biochem.* 55 (1973) 282.
- 40 H. U. Bergmeyer und A. Hagen, *Z. anal. Chem.* 261 (1972) 333.
- 41 G. G. Guilbault, *Pure & Appl. Chem.* 25 (1971) 727.
- 42 H. Nilsson, A.-Ch. Akerlund und K. Mosbach, *Biochim. Biophys. Acta* 320 (1973) 529.
- 43 H. P. J. Bennett, D. F. Elliott, P. J. Lowry und C. McMartin, *Biochem. J.* 125 (1971) 80 p.
- 44 I. Chibata, *Proceedings of the IVth International Symposium on Food Microb.* 75 (1972).
- 45 Deutsche Offenlegungsschrift 2312824, Bayer AG (1974).
- 46 Deutsche Offenlegungsschrift 2336829, Beecham Group Ltd. (1972).
- 47 US Pat. 3788945, Standard Brands Inc., New York, N.Y. (1974).
- 48 O. Zaborisky, *Immobilized Enzymes*, CRC Press (Division of the Chemical Rubber Co.), Cleveland, Ohio (1973).
- 49 G. J. H. Melrose, *Rev. Pure & Appl. Chem.* 21 (1971) 83.