Verwendungsmöglichkeiten von PAG-Copolymer-immobilisierten Enzymen in der Stärkeindustrie*

Von V. Krasnobajew und R. Böniger

Givaudan Forschungsgesellschaft AG, Überlandstraße 138, CH-8600 Dübendorf

Summary

An easy way to immobilize enzymes to a copolymer (PAG-carrier) prepared from phenylene diamine and glutaraldehyde is described. The possibility of using immobilized enzymes promisses a more efficient, and more economic use of enzymes in processes employed especially by the starch industry. Studies on PAG-immobilized enzymes such as amyloglucosidase, glucose isomerase and glucose-oxidase/catalase are presented here, and their application experiments for the production of glucose, fructose and gluconic acid are described.

1 Einleitung

Die Herstellung von Glucose und Invertzucker sind heute die bedeutendsten industriellen Prozesse, die unter Verwendung von Enzymen durchgeführt werden.

Der Einsatz löslicher Enzyme zur Produktion von Dextrinen und Glucose aus Stärke und zur Isomerisierung von Glucose zu Fructose hat ein starkes Interesse an der Immobilisierung dazu geeigneter Enzyme an Trägermaterialien aufkommen lassen.

Die Verwendung von immobilisierten Enzymen dürfte der Stärkeindustrie bedeutende Vorteile bringen. Zum einen könnten die heute verwendeten «Batch»-Verfahren durch kontinuierliche ersetzt werden, und zum anderen sollte es möglich sein, die Enzymkosten herunterzusetzen durch Verwendung trägergebundener Enzyme, die über längere Zeit ohne bedeutende Aktivitätsverluste einsatzfähig bleiben. Auch dürften die Reinigungskosten der Produkte geringer sein, zumal praktisch keine Verunreinigung durch Proteine stattfindet.

Daß bis heute nur einige wenige Prozesse mit fixiertem Enzymen in die verschiedenen Industrien Eingang gefunden haben, liegt weitgehend an der Unzulänglichkeit der zur Enzymfixierung verwendeten Trägermaterialien. Besonders zur Herstellung von billigen Produkten wie Glucose und Invertzucker sind die Anforderungen an die trägerfixierten Enzyme außerordentlich hoch.

Unter den allgemeinen Anforderungen an einen industriegerechten Enzymträger können folgende angeführt werden:

1. Billige Herstellung und Aktivierung des Trägermaterials
2. Hohe Proteinbindungskapazität mit hoher Ausbeute an enzymatischer Aktivität (Units/g Träger)
3. Homogene, leicht abfiltrierbare und mechanisch stabile Partikel
4. Stabilität gegen Lösungsmittel und *p*H-Änderungen
5. Inertheit gegen Mikroorganismen

* 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.

6. Regenerierfähigkeit
7. Toxikologische Unbedenklichkeit

Bis heute kann man sagen, daß kein ideales Trägermaterial existiert, an das wahllos Enzyme fixiert werden können. Auch ist es fraglich, ob je ein solcher Träger gefunden wird, da sowohl jedes Enzym als auch der damit verbundene Prozeß seine Eigenarten haben.

Auf der Suche nach geeigneten Trägermaterialien zur Immobilisierung von Enzymen haben wir ein Polymeres aus Phenylendiamin und Glutaraldehyd hergestellt und seine Eignung zur Fixierung von Enzymen untersucht. Diesen Träger haben wir PAG-Träger (Abkürzung aus *P*henylendi*a*min-*G*lutaraldehyd) genannt[6].

Der PAG-Träger weist interessante Eigenschaften auf, die noch nicht in allen Einzelheiten geklärt sind. So erfolgt die Enzymfixierung an PAG ohne vorhergehende Aktivierung, d.h. nach der Herstellung der PAG-Polymerpartikel können diese direkt zur Enzymfixierung verwendet werden. Der PAG-Träger läßt sich mit Nitrit diazotieren. Die Diazotierung hat jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymfixierung. Die Enzymfixierung geschieht am effektivsten durch einfache Filtration der Enzymlösung durch eine mit PAG-Träger gefüllte Kolonne.

In Abb. 1 ist der Vorgang einer Enzymfixierung an PAG-Träger dargestellt.

Man füllt eine kleine Glaskolonne mit einer bestimmten Menge an PAG-Träger, wäscht mit einem Puffer, der für die nachfolgende Enzymfixierung verwendet werden soll, und läßt anschließend die gepufferte Enzymlösung durch die PAG-Säule laufen. Das Eluat wird photospektrometrisch bei der Absorption von 280 nm auf Protein geprüft. Der Anstieg der Absorption im Eluat zeigt, daß Protein durch die Säule läuft und folglich die Kopplungskapazität der PAG-Säule erschöpft ist. Hierauf wird mit Puffer gewaschen und anschließend mit 1 M KCl, um nicht gebundenes Enzym zu entfernen. Das KCl wird wieder mit der Pufferlösung entfernt. Zur Aktivitätsbestimmung wird ein Aliquot der Säule entnommen und dessen Aktivität unter den jeweiligen Bindungen bestimmt. Durch Trocknung der Probe kann man die spezifische Aktivität in Einheiten/g PAG angeben.

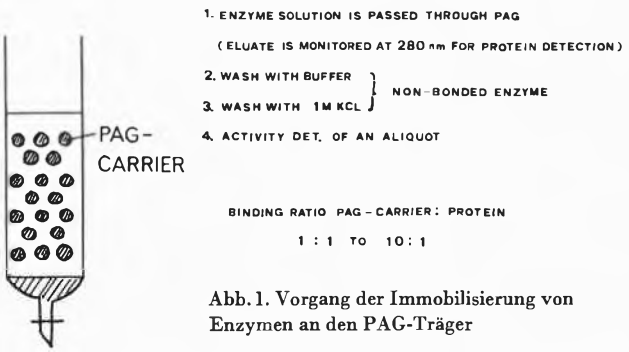


Abb. 1. Vorgang der Immobilisierung von Enzymen an den PAG-Träger

Welche Art von Bindung das Enzymprotein mit dem PAG-Träger eingeht, ist noch ungewiß. Da das PAG-Polymer freie Aldehyd-Gruppen aufweist, ist eine Bindung des Enzymproteins an diese möglich. Anderseits ist eine starke Adsorption von Proteinen an PAG nicht ausgeschlossen. Es ist zu sagen, daß der PAG-Träger sehr hohe Proteinbindungskapazität besitzt und hohe spezifische Enzymaktivitäten mit dieser einfachen Methode erreicht werden.

In Tabelle 1 sind einige PAG-fixierte Enzyme und ihre biologischen Aktivitäten in internationalen Einheiten, die für die Stärkeindustrie von Interesse sind, angegeben. Die spezifischen Aktivitäten (Units/g Träger) der PAG-gebundenen Enzyme hängen von der Partikelgröße des Trägers und von der Enzymquelle ab.

Tabelle 1. PAG-fixierte Enzyme

Enzym	Units/g PAG	Substrat	Produkt
α-Amylase	1000–17000	Stärke	Dextrine, Maltose
Amyloglucosidase	1000– 6000	Stärke	Glucose
Glucose-isomerase	30– 250	Glucose	Fructose
Glucoseoxidase	100– 1000	Glucose	Gluconsäure und H_2O_2
Katalase	bis 40000	H_2O_2	$O_2 + H_2O$

Die α-Amylase wird zur Verflüssigung von Stärke und zur Herstellung von Dextrinen verwendet. Mit der Amyloglucosidase wird aus verflüssigter Stärke Glucose hergestellt. Die Glucose kann weiter durch Isomerisation mit der Glucoseisomerase zu Fructose umgewandelt und damit zur Herstellung von Invertzucker verwendet werden. Zur Herstellung von Gluconsäure, geeigneterweise in Verbindung mit der Entfernung von Glucose aus Invertzuckersirup, und damit zur einfacheren Fructosegewinnung, kann Glucoseoxidase eingesetzt werden, wobei eine beigefügte Katalase das entstehende H_2O_2 zersetzt.

Im folgenden sollen die drei letztgenannten Prozesse mit den entsprechenden PAG-fixierten Enzymen dargelegt werden.

2 Herstellung von Glucose aus löslicher Stärke, mit PAG-fixierter Amyloglucosidase

Die heutigen großindustriellen Prozesse zur Herstellung von Glucose werden im Batch-Verfahren mit der löslichen Amyloglucosidase durchgeführt, hierbei wird verflüssigte Stärke bei 60 °C bis zu 97 % Glucose abgebaut.

Die lösliche Amyloglucosidase ist ein recht billiges Enzym und wird im Tonnenmaßstab verwendet. Damit eine trägergebundene Amyloglucosidase das lösliche Enzym in der Industrie ersetzen kann, muß das fixierte Enzym eindeutige ökonomische und technische Vorteile bieten.

Bei der amerikanischen Firma Corning Glass haben Weetall und Mitarbeiter[1] den Einsatz der Amyloglucosidase, gebunden an Zirkoniumoxid-beschichtetem porösem Glas, wohl am eingehendsten studiert. Weetall gibt folgende Faktoren an, die eine Wirtschaftlichkeit immobilisierter Amyloglucosidase zur Glucoseproduktion ergeben können.

Mit der gebundenen Amyloglucosidase können größere Mengen des Produktes zu geringeren Kosten kontinuierlich hergestellt werden. Die Substratverweilzeit ist günstig. Im herkömmlichen Batch-Verfahren mit löslichem Enzym beträgt die Zeit zur Herstellung von Glucosesirup mit einem Dextrose-Äquivalent von 95 etwa 75 Stunden, mit Weetalls Reaktionssäule nur 6 Minuten. Durch die kurze Substratverweilzeit gibt es weniger Nebenreaktionen, wie z.B. Bräunung, und damit weniger Reinigungskosten. Die immobilisierte Amyloglucosidase zeigt eine sehr lange Lebenszeit. Die Halbwertszeit des Enzyms bei einer Betriebstemperatur von 45 °C wurde auf 2 Jahre errechnet. Weetall rechnet mit einer Betriebszeit von über 3 Halbwertszeiten (5,3 Jahre), falls keine Aktivitätsverluste durch bakterielle Kontamination oder falsche Behandlung eintreten.

Bei Givaudan haben wir das Verhalten der Amyloglucosidase, fixiert an den PAG-Träger, sowie die «Efficiency» des trägergebundenen Enzyms für die Glucoseproduktion untersucht.

Die für unsere Versuche verwendete Amyloglucosidase war ein flüssiges Rohpräparat der Novo Industrie, welches ohne weitere Reinigung zur Immobilisierung eingesetzt wurde.

Das PAG-fixierte Enzym wies eine Aktivität von 2500 Units/g Träger auf, wobei eine Unit diejenige Enzymmenge ist, die aus 1% Stärkelösung (nach Zulkowsky) 1 μ Mol Glucose per min freisetzt, bei einem *p*H von 4,6 und 45 °C. Zunächst wurden einige Parameter des trägergebundenen Enzyms bestimmt und mit denen des nativen Enzyms verglichen.

1. Bestimmung des optimalen *p*H-Bereiches: In Abb. 2 ist die *p*H-Abhängigkeit der löslichen und der PAG-fixierten Amyloglucosidase dargestellt. Wie man der graphischen Darstellung entnehmen kann, weisen das lösliche und das fixierte Enzym sehr ähnliche *p*H-Abhängigkeit auf. Ein Maximum der Aktivitäten wird um den *p*H-Wert von 4,5 beobachtet. Höhere *p*H-Werte bewirken einen steilen Abfall der Enzymaktivitäten.

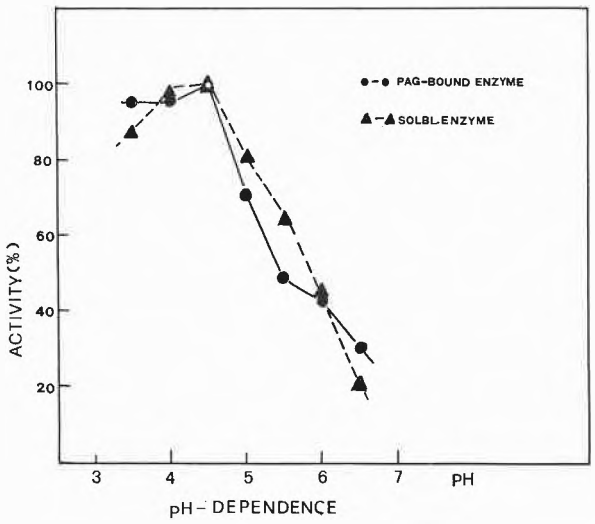


Abb. 2. Abhängigkeit der löslichen und der PAG-gebundenen Amyloglucosidase-Aktivität vom *p*H-Wert. *Bedingungen:* 10% lösliche Stärke nach Zulkowsky, Temperatur 45 °C. Die Aktivität wurde durch enzymatische Bestimmung der Glucose ermittelt

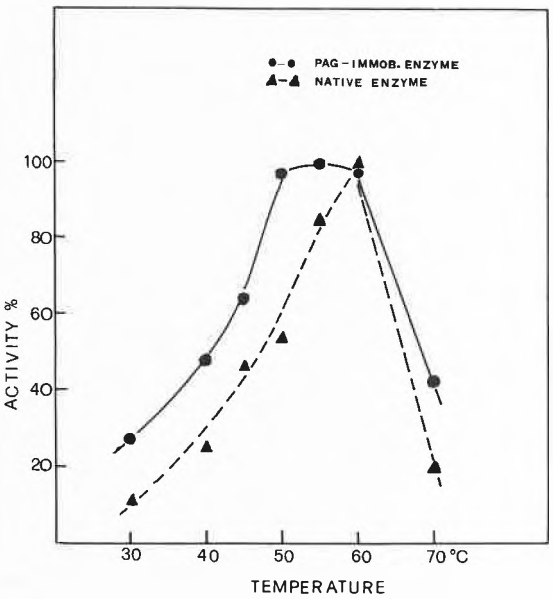


Abb. 3. Temperaturabhängigkeit der löslichen und der PAG-gebundenen Amyloglucosidase-Aktivität. *Bedingungen:* 10% lösliche Stärke nach Zulkowsky in 16 mM Acetatpuffer *p*H 4,6

2. Bestimmung der optimalen Temperatur: Abb. 3 zeigt die Temperaturabhängigkeit der löslichen und der PAG-fixierten Amyloglucosidase. Das lösliche Enzym zeigt ein Aktivitätsmaximum bei 60 °C. Das Aktivitätsmaximum des fixierten Enzyms liegt bei 55 °C. Zu bemerken ist jedoch, daß die Aktivität des fixierten Enzyms ein breites Reaktionsmaximum zwischen 50° und 60 °C aufweist, in diesem Bereich also nur wenig von der Reaktionstemperatur abhängt, im Gegensatz zum löslichen Enzym. Aus Stabilitätsgründen sollte jedoch der Stärkeabbau mit der PAG-fixierten Amyloglucosidase eine Reaktionstemperatur von 50 °C nicht übersteigen.
3. Optimale Substratkonzentration: Von weiterem Interesse ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration. In Abb. 4 ist die Abhängigkeit der PAG-fixierten Amyloglucosidase von der Konzentration löslicher Stärke dargestellt. Die optimale Substratkonzentration liegt bei 20% (Gew/Gew). Bei der Verwendung von 30prozentiger löslicher Stärke, einer bereits recht viskösen Lösung, ist eine Inhibition der fixierten Amyloglucosidase-Aktivität meßbar.

Den Wirkungsgrad der PAG-fixierten Amyloglucosidase zur Glucoseabspaltung aus löslicher Stärke sowie die Stabilität des trägergebundenen Enzyms haben wir in Reaktionssäulen bei einem kontinuierlichen Betrieb untersucht.

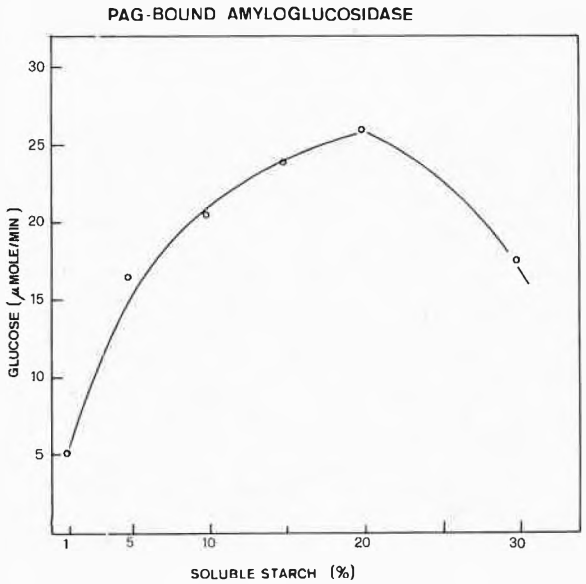


Abb. 4. Abhängigkeit der PAG-gebundenen Amyloglucosidase-Aktivität von der Substratkonzentration. *Bedingungen:* lösliche Stärke nach Zukolwsky, in 16 mM Acetatpuffer *p*H 4,6, Temperatur 45 °C

In Abb. 5 ist eine simple Betriebsanordnung, wie sie bei uns verwendet wurde, dargestellt. Einfachheitshalber wurde der Betrieb in einer Klimakammer bei 48 °C ausgeführt.

Für eine Reaktionskolonne mit 10 cm Durchmesser und 40 cm Höhe wurden etwa 600 g Trägermaterial eingesetzt. Vor der Enzymfixierung wurde der Träger diazotiert, da es sich gezeigt hat, daß der diazotierte Träger bessere Eigenschaften für die Aktivität des Enzyms in der Reaktionssäule zeigt. Zur Immobilisierung wurden 300 ml der flüssigen Amyloglucosidase verwendet. Nach der Fixierung des Enzyms auf die beschriebene einfache Art zeigte die trägergebundene Amyloglucosidase eine Aktivität von etwa 1000 Units/g Träger.

Die Reaktionssäule mit einem Trägerbett von 10 × 25 cm wurde im Fallstrombetrieb mit 45- bis 50prozentiger (Gew/Vol) vorhydrolisierter Stärke, auch Glucosesirup genannt, durch eine Kolbenpumpe gespeist. Das Dextrose-Äquivalent (DE) des Glucosesirups war 42; mit Essigsäure/Na-Acetat wurde der *p*H-Wert auf 4,6 eingestellt. Ein Manometer, angebracht am Kopf der Säule, zeigte den Druck bei dem jeweiligen Substratdurchfluß. Bei einem Durchfluß von etwa 15 Liter/h war der Druck nur 0,13 Atm.

Die jeweils anfallende Glucose im Eluat wurde enzymatisch bestimmt, aber auch mit der Flüssig-Chromatographie-Methode. Als Bezugswert für 100% Hydrolyse wurde jeweils eine mit löslichem Enzym abgebaute Substratprobe angenommen. Hierbei ist zu bemerken, daß die Hydrolyse einen 100prozentigen Wert nie erreicht. Als Grenzwert dürfte 97% angenommen werden.

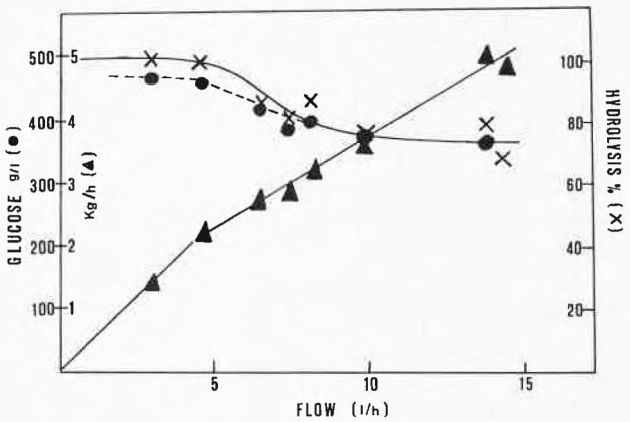


Abb. 6. Stärkehydrolyse und Glucoseproduktion mittels Enzymreaktor in Abhängigkeit von Substratdurchfluß. *Bedingungen:* Glucosesirup DE 42 (45 bis 50% w/v), 16 mM Acetatpuffer *p*H 4,6, Temperatur 48 °C

In Abb. 6 ist die Glucoseproduktion in Abhängigkeit des Substratdurchflusses dargestellt.

Wie man sieht, war der Abbau zu Glucose bis zu einer Durchflußgeschwindigkeit von etwa 5 Liter/h annähernd 100%, dann erfolgt eine langsame Abnahme. Interessanterweise bleibt die Hydrolyserate zwischen einem Flow von 10 bis 14 Liter/h ziemlich konstant. Aus technischen Gründen wurden keine höheren Durchflußraten bei dieser Versuchsanordnung getestet.

Wie man zudem sieht, steigt die Glucoseproduktion stetig an. Bei einer bestimmten Durchflußgeschwindigkeit über 15 Liter/h würde dann die Gerade einen Knick nach unten zeigen.

Wir haben auch viel weniger abgebaute Stärke mit dieser Versuchsanlage zu Glucose hydrolysiert. So z. B. Maltrin, eine lösliche Stärke mit einem Dextrose-Äquivalent von 9 bis 10, bei welchem der Glucoseanteil weniger als 1% beträgt. Hierbei haben wir festgestellt, daß die Hydrolysecharakteristika die gleichen bleiben. Die Leistungsfähigkeit der Säule auf die angenommene 100prozentige Hydrolyse, ausgedrückt in ml/h/Trägerbettvolumen, ergibt einen Wert von 1,7.

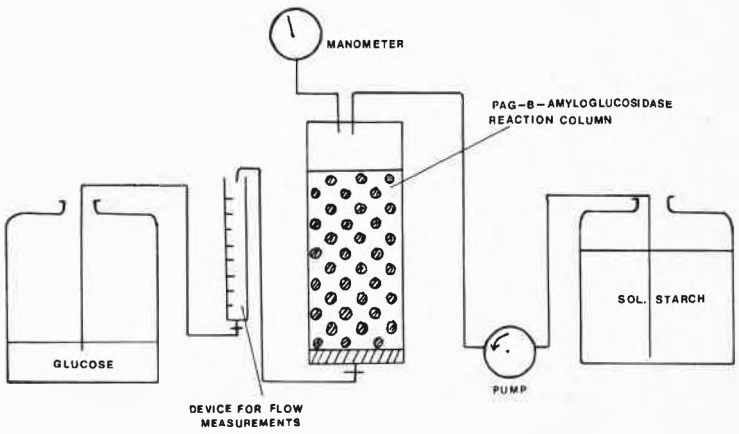


Abb. 5
Einfache Anordnung zur kontinuierlichen Hydrolyse von löslicher Stärke mit Hilfe eines Enzymreaktors

Immerhin kann man mit dieser kleinen Versuchsanlage beträchtliche Mengen Glucose produzieren. Man kann auch 60 bis 70% Substratkonzentration zur Hydrolyse einsetzen; hierbei sind es bereits ziemlich visköse Lösungen, die in der Säule verflüssigt werden. Beim Abkühlen der Eluate kristallisiert die Glucose massiv aus und kann dann abgeschleudert werden.

Die Stabilität einer solchen Betriebsanordnung haben wir schon mehrmals über eine Zeitdauer von etwa 3 Monaten getestet und haben nach einer anfänglichen, kurzen Abnahme, wie sie meistens mit immobilisierten Enzymen erfolgt, praktisch keinen weiteren Aktivitätsverlust feststellen können. Die PAG-immobilisierte Amyloglucosidase stellt also ein recht aktives System dar. Es ist durchaus denkbar, daß die Industrie in naher Zukunft immobilisierte Amyloglucosidase in Reaktionssäulen zur kontinuierlichen Herstellung von Glucose verwenden wird.

3 Isomerisierung von Glucose zu Fructose

Glucose spielt eine immer wichtigere Rolle in der Stärkeindustrie, zumal man einen enzymatischen Prozeß gefunden hat, um aus Glucose durch Isomerisation Fructose herzustellen. Das zu diesem Zweck verwendete Enzym, die Glucose-Isomerase, eigentlich eine Xylose-Isomerase, wird meistens aus *Streptomyces*-Spezien gewonnen.

Stärkeindustrien haben, basierend auf die Glucose-Isomerase, Verfahren entwickelt, mit denen sie den süßen Invertzucker herstellen, woraus auch Fructose isoliert wird. Invertzucker bietet zum Süßen von Getränken, Eiscrème, Dosenfrüchten und Konfekt gewisse Vorteile und wird der Saccharose vorgezogen. Da Invertzucker aus Glucose billiger ist als aus Saccharose, kommt dem Prozeß der enzymatischen Glucose-Isomerisation außerordentliche Bedeutung zu.

In der Industrie geschieht die Glucose-Isomerisierung mit dem ganzen Mycel der Mikroorganismen. Das Enzym ist durch eine Hitzebehandlung an das Zellmaterial fixiert. Wie oft das gleiche Mycel eingesetzt wird, ist nicht bekannt. Die Reaktionsbedingungen bei diesem Prozeß sind etwa 70 °C, das *p*H 6,5 bis 7,5, außerdem werden Cobalt- und Magnesium-Ionen dem Substrat zugefügt, damit das Enzym optimal arbeitet. Die Verweilzeit des Substrates wird mit bis zu 96 Stunden angegeben, wobei bis zu 8% unerwünschte Glucosepolymere entstehen können. Auch dürfte der Einsatz von Zellmaterial zu vermehrt kostspieliger Reinigung des Endproduktes führen.

Mit trägergebundener Glucose-Isomerase hofft man die Schwierigkeiten, die sich bei der Verwendung von Zellmaterial ergeben, teilweise zu umgehen. Verschiedene Forscher haben die isolierte Glucose-Isomerase bereits an Trägermaterialien fixiert[2,3]. Ob sich diese Präparate zum industriellen Einsatz eignen, wird sich in Zukunft zeigen. Da die Glucose-Isomerase schon von Natur aus recht träge gegenüber Glucose als Substrat ist und das Gleichgewicht der Isomerisierung bei etwa 50% Fructose liegt, braucht es verhältnismäßig viel Enzym, um in einer vernünftigen Zeit auf diesen Wert zu kommen. Wir haben bei der Immobilisierung von Glucose-Isomerase an PAG-Träger festgestellt, daß sich das Enzym nicht in der Menge, wie z. B. Amyloglucosidase, fixieren läßt und geringere spezifische Aktivitäten (Units/g Träger) ergibt. Die für unsere Experimente verwendete Glucose-Isomerase wurde aus einem Streptomyceten isoliert, aus einem Stamm, den Dr. P. Weber bei uns bearbeitet.

Im folgenden sollen einige Charakteristika der freien und gebundenen Glucose-Isomerase angeführt werden.

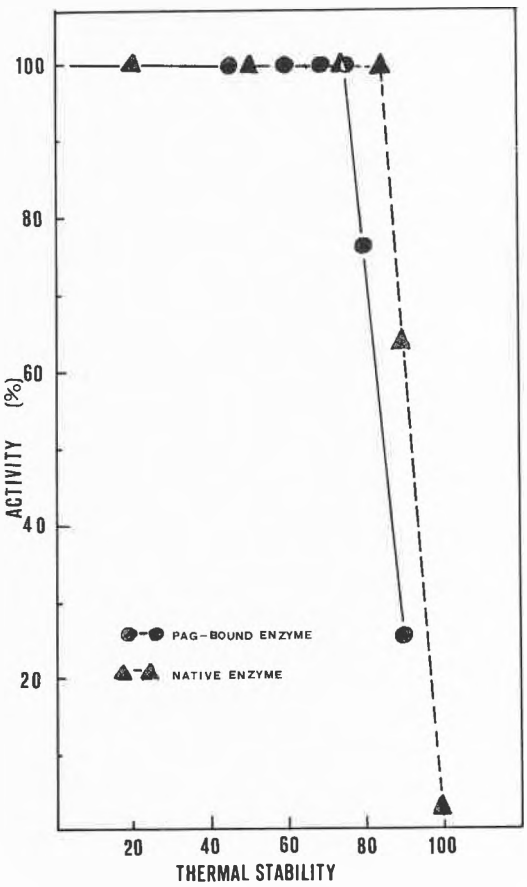


Abb. 7. Hitzebeständigkeit der löslichen und der PAG-gebundenen Glucose-Isomerase. *Bedingungen:* Phosphatpuffer 0,05 M, *p*H 7, 2 mM $MgSO_4$, 1 × 10^{-4} M $CoCl_2$, Inkubationsdauer 2 h

1. Thermostabilität: Abb. 7 zeigt die außerordentliche Hitzestabilität des Enzyms. Sowohl das freie als auch das fixierte Enzym sind noch nach 2 Stunden bei 75 °C voll aktiv. Das freie Enzym ist bei Temperaturen über 80 °C etwas stabiler als das gebundene.
2. Temperaturoptimum: Abb. 8 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität. Um die Isomerisierungsaktivität des Enzyms auszunützen, muß man bei recht hohen Temperaturen arbeiten. Interessanterweise zeigt das gebundene Enzym ein Aktivitätsmaximum bei niedrigerer Temperatur als das lösliche

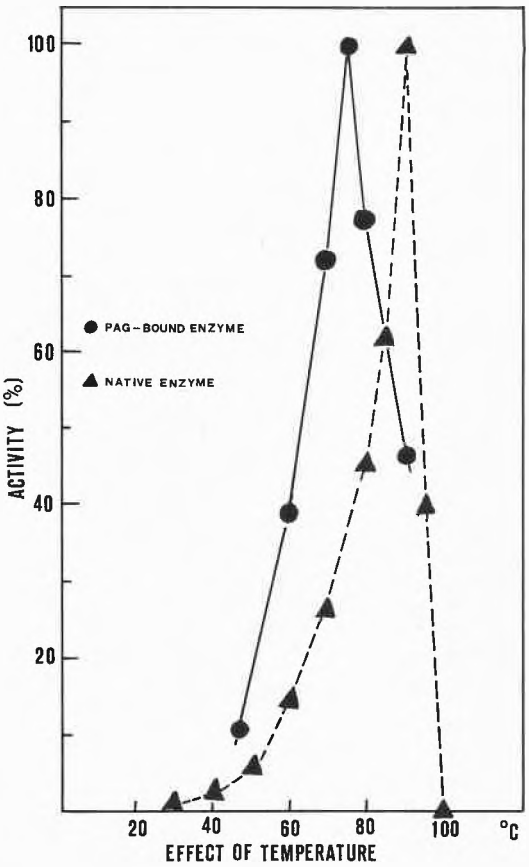


Abb. 8. Aktivität der löslichen und der PAG-gebundenen Glucose-Isomerase in Abhängigkeit der Temperatur. *Bedingungen:* 10% (w/v) Glucose in 0,05 M Phosphatpuffer *p*H 7, 2 mM $MgSO_4$, 1×10^{-4} M $CoCl_2$

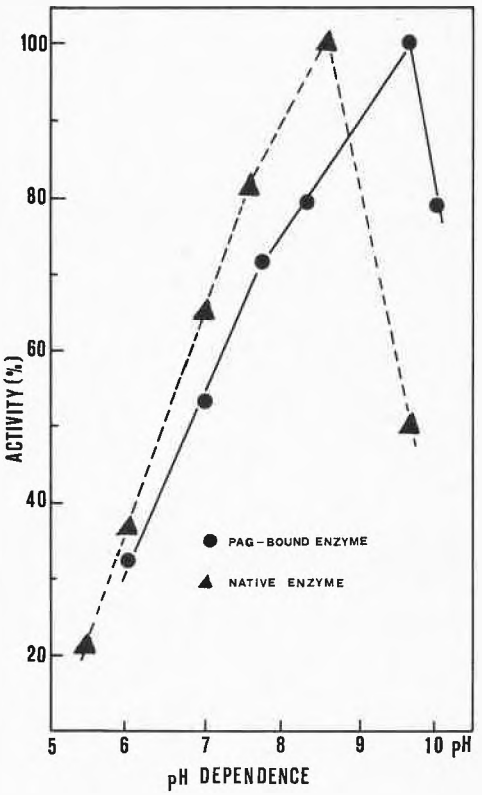


Abb. 9. Abhängigkeit der löslichen und der PAG-gebundenen Glucose-Isomerase-Aktivität vom *p*H-Wert. *Bedingungen:* 10% (w/v) Glucose in 0,05 M Pufferlösung mit entsprechendem *p*H, 2 mM $MgSO_4$, 1×10^{-4} M $CoCl_2$, Temperatur 60°C

Enzym. Mit dem freien Enzym wird der Isomerisationsprozeß bei etwa 70°C durchgeführt, da höhere Temperaturen zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Mit dem gebundenen Enzym muß man die Glucose-Isomerisierung aus Stabilitätsgründen bei 60 bis 65°C durchführen, also in einem Bereich, bei dem das Enzym nur 40 bis 50% seiner maximalen Aktivität entwickelt.

3. *p*H-Optimum: Abb. 9 zeigt die *p*H-Abhängigkeit der löslichen und fixierten Glucose-Isomerase-Aktivität. Wie man aus der graphischen Darstellung ersieht, zeigen das lösliche und das fixierte Enzym ihre optimalen Aktivitäten bei recht hohen *p*H-Werten, wobei das Aktivitätsmaximum des gebundenen Enzyms um etwa 1 *p*H-Einheit höher liegt als dasjenige des löslichen Enzyms. Solche *p*H-Verschiebungen werden häufig bei immobilisierten Enzymen beobachtet und erklären sich aus der Mikro-Umgebung des fixierten Enzyms, verursacht durch funktionelle Gruppen des Trägermaterials. Die enzymatische Glucose-Isomerisierung wird jedoch wegen Nebenproduktbildung nicht über einem *p*H-Wert von 7,5 durchgeführt.
4. Substratkonzentration: Abb. 10 zeigt die Aktivität der PAG-fixierten Glucose-Isomerase in Abhängigkeit der Glucosekonzentration. Wie man aus der graphischen Darstellung entnehmen kann, zeigt das immobilisierte Enzym recht hohe Substratsättigung. Oberhalb 30% Glucose tritt eine leichte Substrathemmung der Enzymaktivität ein. Praktisch das

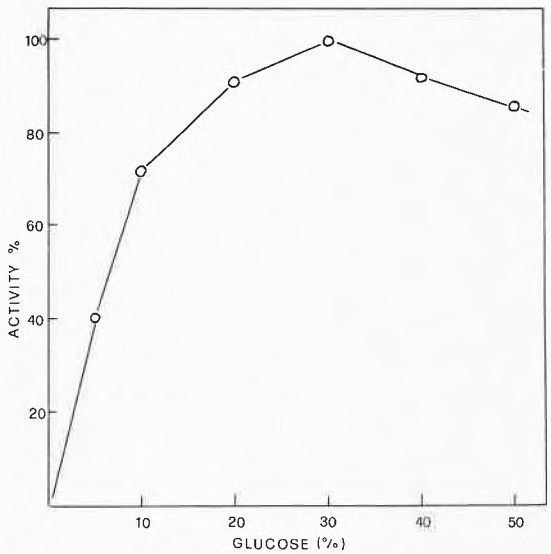


Abb. 10. Aktivität der PAG-gebundenen Glucose-Isomerase in Abhängigkeit der Glucosekonzentration. *Bedingungen:* Glucose in 0,05 M Phosphatpuffer *p*H 7, 2 mM $MgSO_4$, 1×10^{-4} M $CoCl_2$, Temperatur 60°C

gleiche wurde mit der löslichen Glucose-Isomerase beobachtet. Man kann also die Glucose-Isomerisierung bei hohen Glucosekonzentrationen durchführen, was für industrielle Prozesse von Vorteil ist.

5. Reaktionskonstante: Sowohl die lösliche als auch die PAG-gebundene Glucose-Isomerase folgen der Michaelis-Menten-Kinetik. Das K_m für die lösliche Glucose-Isomerase wurde als 0,4 Mol/l bestimmt. Die scheinbare Reaktionskonstante für das PAG-gebundene Enzym liegt etwas höher und beträgt im Durchschnitt 0,6 Mol/l. Die etwas höhere Substratsättigung des gebundenen Enzyms kann auf die Hinderung des Trägermaterials gegenüber dem Substrat beruhen und wird recht häufig bei immobilisierten Enzymen beobachtet.
6. Stabilität: Wie steht es mit der Stabilität der PAG-fixierten Glucose-Isomerase? Diese Frage haben wir mit einer Reaktionskolonne untersucht.

   Als Trägermaterial wurden 240 g PAG-beschichtetes Cellit verwendet. Nach der Enzymfixierung wies das Trägermaterial eine Aktivität von 35 U/g auf. Die Reaktionssäule wurde in einem kontinuierlichen Betrieb bei folgenden Reaktionsbedingungen getestet:

   Substrat: 10% Glucose in 0,05 M Tris-Maleatpuffer *p*H 7,0; 1×10^{-4} M $CoCl_2$; 0,01 M $MgSO_4$
   Temperatur: 59 bis 60 °C
   Durchflußgeschwindigkeit: 350 ml/h

   Die im Eluat anfallende Fructose wurde durch Messung der optischen Drehung bestimmt.

   In Abb. 11 ist der Betriebsverlauf über 47 Tage dargestellt. In den ersten zwei Tagen kontinuierlichen Betriebes enthielt das Eluat 47% Fructose. Dann erfolgte eine drastische Abnahme der Enzymaktivität, die sich jedoch auf etwa 50% der Ausgangsaktivität stabilisierte und sich über die gemessene Zeitdauer kaum veränderte. Diese Charakteristik haben wir mit weiteren Reaktionssäulen bestätigen können. Ob der anfängliche Aktivitätsabfall auf das Ablösen des Enzyms vom Träger oder auf der Inaktivierung gewisser gebundener Enzymmoleküle beruht, bleibt vorerst ungeklärt.

Auch die Verwendung von immobilisierter Glucose-Isomerase in Reaktionssäulen zur Herstellung von Invertzucker oder Fructose hat den großen Vorteil gegenüber dem Batch-Verfahren mit Mycel, daß kontinuierlich gearbeitet werden kann. Zudem ist die Verweilzeit des Substrates und Produktes bei der ungünstig hohen Temperatur beträchtlich erniedrigt, was zu geringerer Nebenproduktbildung führt.

4 Glucoseoxidase/Katalase-Enzymsystem zur Herstellung von Gluconsäure

Gluconsäure wird heute in der Industrie auf dem fermentativen Weg hergestellt. In letzter Zeit haben verschiedene Forscher[4, 5] über die enzymatische Oxidation von Glucose zu Gluconsäure mit Hilfe immobilisierter Glucoseoxidase berichtet.

Eine potentielle Anwendungsmöglichkeit immobilisierter Glucoseoxidase liegt vor allem in der Abtrennung von Fructose, indem die vorhandene Glucose zu Gluconsäure oxidiert wird und dann leicht durch Ionenaustauscher entfernt werden kann.

Mit der teuren Glucoseoxidase ist dieser Prozeß nur ökonomisch denkbar, falls geeignete immobilisierte Glucoseoxidase-Präparate gefunden werden. Bei der enzymatischen Oxidation von Glucose in obligater Präsenz entsteht neben Gluconat Wasserstoffperoxid, welches das Enzym inaktiviert. Zur nötigen Zersetzung von H_2O_2 kann man Katalase verwenden, die man der Glucoseoxidase zumischt. Besonders in einem kontinuierlichen Prozeß mit fixierter Glucoseoxidase ist es erwünscht, das entstehende H_2O_2 wieder in Wasser und Sauerstoff zu zersetzen, um den schnell verbrauchten Sauerstoff dem System wieder zuzuführen. Vor allem in einer Reaktionssäule würde die enzymatische Oxidation nur im oberen Teil der Säule stattfinden, da im unteren Teil anaerobe Verhältnisse auftreten würden.

Den Einsatz des Glucoseoxidase/Katalase-Enzymsystems, gebunden an Träger, kann man sich auf zwei Arten vorstellen: einmal in einem Batch-Verfahren oder in einer Reaktionssäule (Abb. 12).

a) Im Batch-Verfahren wird die Glucose-haltige Lösung im Beisein von immobilisierter Glucoseoxidase/Katalase unter Belüftung in einem Reaktionsgefäß, an das ein *p*H-Stat angeschlossen ist, inkubiert. Die Belüftung sorgt gleichzeitig für die Umwälzung

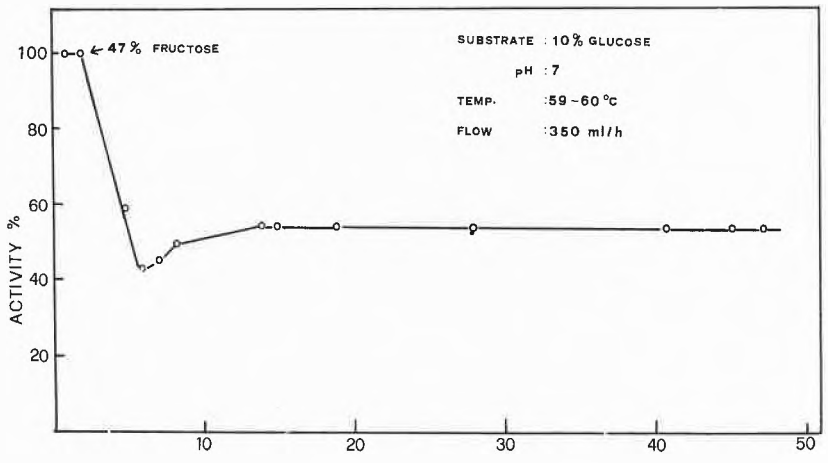


Abb. 11
Stabilität der PAG-gebundenen Glucose-Isomerase in einer Reaktorsäule bei kontinuierlichem Betrieb. *Bedingungen:* 10% (w/v) Glucose in 0,05 M Tris-Maleatpuffer *p*H 7,0, 0,01 M $MgSO_4$, 1×10^{-4} M $CoCl_2$, Temperatur 59 bis 60 °C. Die Isomerisierung von Glucose (= Fructose) wurde mit Hilfe der optischen Drehung bestimmt

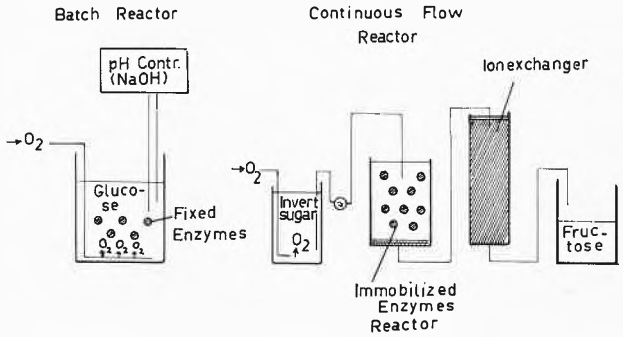


Abb. 12. Schematische Darstellung der Oxidation von Glucose mit Hilfe von immobilisierter Glucoseoxidase/Katalase in einem «Batch-Verfahren und in einem kontinuierlichen Verfahren

der fixierten Enzympartikel. Die entstehende Gluconsäure wird automatisch mit NaOH neutralisiert. Nach beendeter Reaktion kann die Lösung vom fixierten Enzym abfiltriert und die Gluconsäure durch einen Ionenaustauscher entfernt werden. Das trägergebundene Enzymgemisch kann erneut im Batch-Reaktor für die nächste Charge eingesetzt werden. Die verbleibende Fructose kann nach Einengung der Lösung auskristallisiert werden.

b) In einem kontinuierlichen Verfahren können Glucose-haltige Gemische, angereichert mit Sauerstoff, durch eine Reaktionskolonne, die fixierte Glucoseoxidase/Katalase enthält, gepumpt werden. Durch Regulierung des Durchflusses kann die Oxidationsrate der Glucose optimal eingestellt werden. Das Eluat wird mit Hilfe eines Ionenaustauschers von Gluconsäure befreit. Ist die Umwandlung Glucose zu Gluconsäure nicht vollständig, so kann eine Rezyklisierung vorgenommen oder eine weitere Reaktionssäule nach Belüftung des Eluats zwischengeschaltet werden.

Wir haben das PAG-gebundene Glucoseoxidase/Katalase-System sowohl in Reaktionssäulen als auch im Batch-Verfahren getestet. Die Resultate deuten darauf hin, daß das Batch-Verfahren für die Glucoseoxidation günstiger ist, wahrscheinlich, weil in diesem Prozeß eine bessere Sauerstoffsättigung des Systems erreicht wird.

Im folgenden soll das Verfahren des PAG-fixierten Glucoseoxidase/Katalase-Enzymsystems beschrieben werden.

Zur Immobilisierung wurde ein Glucoseoxidase-Präparat aus *Aspergillus niger* der Firma Merck verwendet. Das Präparat zeigte eine Glucoseoxidase-Aktivität von 10 U/mg und eine Katalase-Aktivität von etwa 350 U/mg. Das PAG-fixierte Enzymsystem wies eine Glucoseoxidase-Aktivität von 600 U/g PAG auf, gemessen durch fortlaufende Titration der entstehenden Gluconsäure. Die Katalase-Aktivität betrug 20000 U/g PAG, iodometrisch gemessen. Beide Enzymaktivitäten wurden bei Raumtemperatur bestimmt. Zusätzliche Fixierung von Katalase zeigte keinen Einfluß auf die Glucoseoxidase-Aktivität.

1. Bestimmung des Temperaturoptimums: In Abb. 13 ist die Temperaturabhängigkeit der löslichen und der PAG-fixierten Glucoseoxidase/Katalase graphisch dargestellt. Interessanterweise sind die Temperaturoptima der löslichen und der PAG-fixierten Enzym-

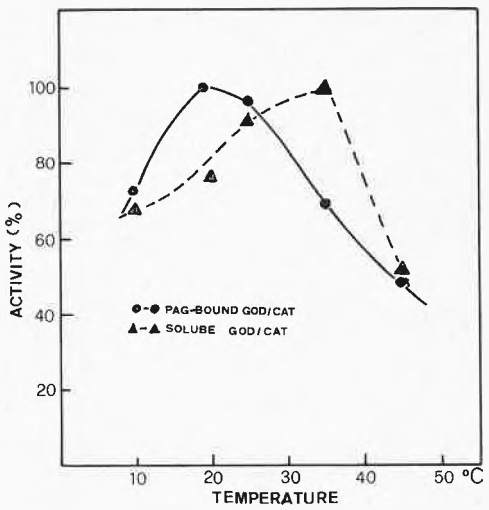


Abb. 13. Einfluß der Temperatur auf die lösliche und PAG-gebundene GOD/Kat-Aktivität. *Bedingungen:* 1% Glucoselösung wurde mit Sauerstoff belüftet; die entstehende Gluconsäure wurde durch *p*H-Stat (*p*H-Konstanz auf *p*H 6,5) mit Natronlauge titriert

aktivitäten recht verschieden. So zeigt das lösliche Enzymgemisch ein Reaktionsmaximum bei 35 °C, während das fixierte Enzymsystem seine maximale Aktivität etwa 15 °C tiefer entwickelt, nämlich bei 20 °C. Für den angeführten Unterschied könnte eine unzureichende Sauerstoffsättigung in der Mikro-Umgebung der fixierten Enzyme bei höherer Temperatur verantwortlich sein.

2. *p*H-Abhängigkeit: Abb. 14 zeigt die *p*H-Abhängigkeit der löslichen und der PAG-gebundenen Glucoseoxid/Katalase. Wie man aus der graphischen Darstellung ersieht, sind die *p*H-Optima für beide Präparate die gleichen und liegen bei *p*H 5.
3. Verwendung von Luft oder reinem Sauerstoff: Es zeigt sich, daß die Verwendung von Luft im Gegensatz zu Sauerstoff bei der Belüftung der Glucose einen merklichen Einfluß auf die Enzymaktivität ausübt. – In Abb. 15 sind die jeweiligen Reaktionskonstanten graphisch dargestellt. Bei der Belüftung mit Sauerstoff läuft die Oxidation beträchtlich schneller ab als mit Luft. In beiden Fällen ist die Reaktionskonstante der fixierten Enzyme um einen Faktor 2 kleiner als diejenige der löslichen Enzyme. Dieser Befund könnte den Einfluß der Katalase, gebunden in der unmittelbaren Nähe der Glucoseoxidase, und damit eine bessere Sauerstoffauswertung des Systems andeuten.
4. Stabilität des fixierten Enzymsystems: Im feuchten Zustand läßt sich das PAG-fixierte Glucoseoxidase/Katalase-Enzymsystem bei 4 °C über Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahren. Auch scheint das fixierte Enzymsystem bisher ohne merklichen Aktivitätsverlust zu arbeiten, wenn es wiederholt im Batch-Verfahren eingesetzt wird. In einem kontinuierlichen Prozeß wurde die Stabilität bisher nicht über längere Zeitdauer geprüft. – In Abb. 16 sind die

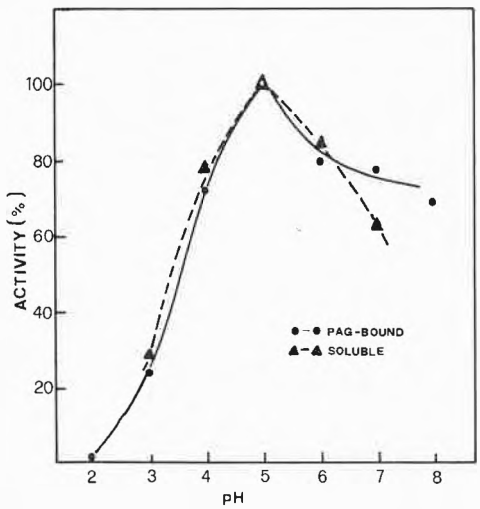


Abb. 14. Einfluß des *p*H-Wertes auf die lösliche und PAG-gebundene GOD/Kat-Aktivität. *Bedingungen:* 1% Glucoselösung, Temperatur 22°C, Belüftung mit Sauerstoff. Die entsprechenden *p*H-Werte wurden mittels *p*H-Stat konstant gehalten durch Titration mit Natronlauge

Resultate des fixierten Enzymsystems bei wiederholtem Gebrauch im Batch-Verfahren graphisch dargestellt. – Es wurden 250 mg des PAG-fixierten Enzymsystems in jeweils 20 ml einer 20prozentigen Glucoselösung verwendet. Bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit Sauerstoff durchblasen. Ein *p*H-Stat sorgte für das Konstantbleiben des *p*H-Wertes auf 6. In der graphischen Darstellung sieht man zwar eine Streuung in der Gluconsäureproduktion bei den einzelnen Ansätzen, doch bleibt die Enzymaktivität im ganzen gesehen konstant. Umgerechnet auf 1 g trägerfixierte Enzyme werden durchschnittlich 560 μ Mol Glucose per min umgesetzt. Es ist durchaus denkbar, daß in Zukunft die fixierte Glucoseoxidase nicht nur für analytische Zwecke verwendet wird, sondern in Verbindung mit der Katalase auch industriell zur Gluconsäureherstellung ihren Einsatz finden könnte.

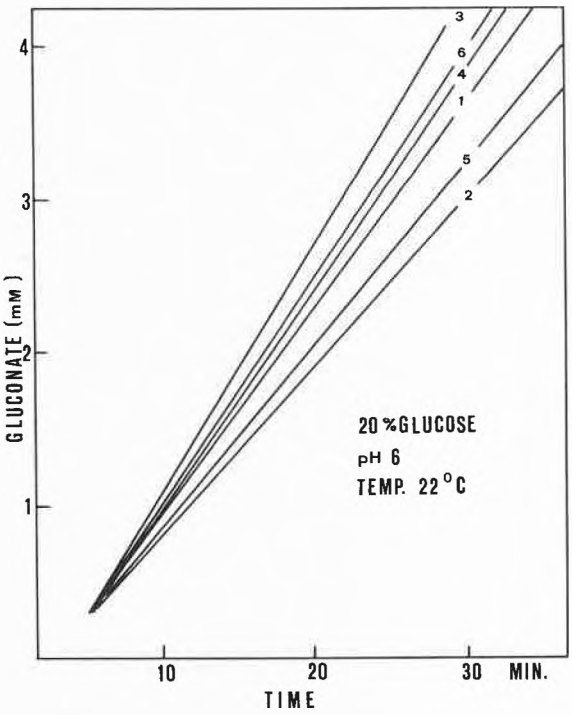


Abb. 16. Stabilität von PAG-gebundener GOD/Kat bei mehrmaliger Verwendung zur Glucoseoxidation. *Bedingungen:* 20prozentige Glucoselösung, *p*H-Stat auf *p*H 6 Konstanz, Temperatur 22°C, Belüftung: Sauerstoff

Literatur

1 H. H. Weetall, Trägergebundene Enzyme und ihre Anwendung in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie, *Chemiker-Ztg. 97* (1973) 11, 611–9.

2 G. W. Strandberg und K. L. Smiley, Glucoseisomerase covalently bound to porous glass beads, *Biotechnol. Bioengng. 14* (1972) 509.

3 S. Giovenco, F. Morisi und P. Pansolli, Properties of free and immobilized glucoseisomerase, *FEBS Letters 36* (1973) 57.

4 H. H. Weetall und L. S. Hersch, Preparation and Characterization of Glucose Oxidase covalently linked to Nickel Oxide, *Biochim. Biophys. Acta 206* (1970) 54–60.

5 H. O. Hultin, Characteristics of immobilized multi-enzyme systems, *J. Food Sci. 39* (1974) 645.

6 V. Krasnobajew und R. Böniger (L. Givaudan & Cie. SA), Schweiz. Patentanmeldung 1973, Nr. 2603173.

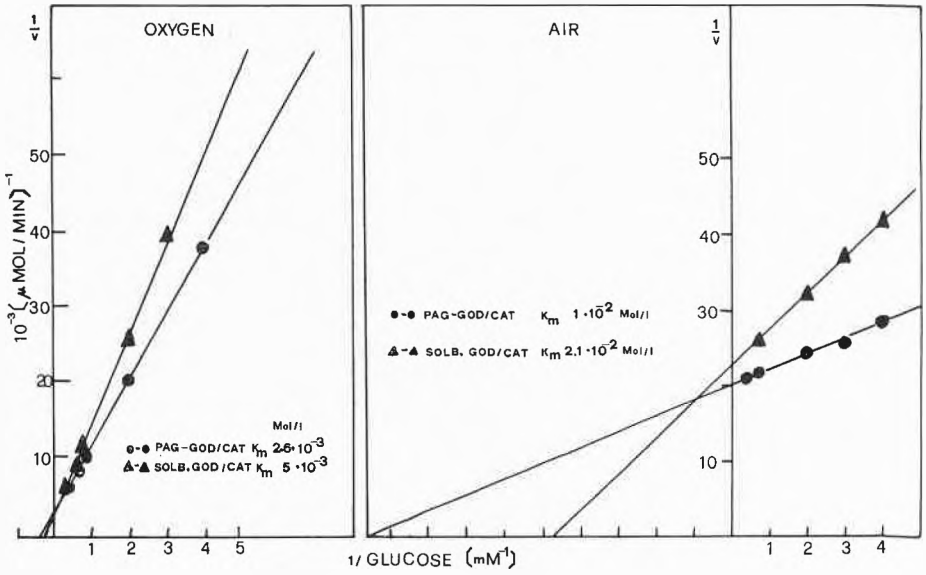


Abb. 15
Graphische Darstellung von Reaktionskonstanten der löslichen und der PAG-gebundenen GOD/Kat unter Sauerstoff bzw. Luft, nach Lineweaver-Burk. *Bedingungen:* Temperatur 22°C, *p*H 6,5