

Immobilisierte Biomaterialien – Techniken und Anwendungen

Von Bhavender P. Sharma*, Lorraine F. Bailey und Ralph A. Messing

Die Immobilisierung von Enzymen, Cofaktoren und ganzen Zellen bietet die Möglichkeit, die Aktivität von Biomaterialien ökonomisch zu nutzen. Zur Immobilisierung haben sich Adsorption und kovalente Bindung an hochmolekulare Träger sowie Einschluß in Polymere und Mikroverkapselung bewährt. Will man Systeme mit immobilisierten Biomaterialien entwickeln, muß man sowohl biochemische und kinetische als auch apparative Aspekte berücksichtigen. Beispiele für großtechnische Anwendungen sind die Gewinnung von Fructose-reichem Sirup aus Stärke und die Herstellung von L-Aminosäuren durch selektive Hydrolyse von N-Acyl-DL-aminosäuren.

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren wurde immer deutlicher, daß dem wachsenden Bedarf an Rohstoffen, Energie und nicht zuletzt an Nahrungsmitteln schwindende Ressourcen gegenüberstehen. Ein weiteres Problem, das gerade die Industrienationen zu bewältigen haben, ist die Umweltbelastung. Das Bestreben, die Rohstoffvorräte zu schonen und umweltfreundlichere Technologien einzuführen, läßt die Verwendung immobilisierter Biomaterialien attraktiv erscheinen.

Insbesondere der Abfall an organischen Produkten, der mikrobiologisch abgebaut wird, trägt einerseits einen großen Teil zur Umweltverschmutzung bei, andererseits wird hier ein Reservoir an Rohstoffen verschenkt, das unter anderem folgende nützliche Produkte liefern könnte:

- 1) Treibstoffe (Methan oder Alkohole)
- 2) Glucose (Hauptrohstoff der Biotechnologie, z. B. für die Produktion von Antibiotica)
- 3) Kohlenwasserstoffe (Ausgangsmaterialien für die Produktion von Kunststoffen)
- 4) Futtermittel und Futtermittelzusätze
- 5) Vitamine und Hormone

Unter Verwendung von Enzymen werden heute unter anderem Nahrungsmittel und Pharmaka hergestellt. Da Enzyme in der Regel löslich sind, werden sie vor allem im Chargenbetrieb umgesetzt und meist nur einmal verwendet: Entweder werden sie während des Prozesses zerstört, oder ihre Wiedergewinnung ist unrentabel. Die Immobilisierungstechnologie eröffnet die Möglichkeit, Enzyme wiederzuverwerten, und schont somit die kostbaren Ressourcen in zweierlei Hinsicht: Man benötigt weniger Tiere, Pflanzen und Mikroben – die „Rohstoffe“ für die Enzyme – und damit auch weniger Futtermittel, Nährstoffe etc.

Als Energieträger der Zukunft wird Wasserstoff mit Sicherheit eine Rolle spielen. Er könnte in Festphasen-Reaktoren mit immobilisierten Zellen durch Wasserspaltung (Biophotolyse) oder durch Abspaltung aus photosynthetisch produzierten organischen Substanzen hergestellt werden.

[*] Dr. B. P. Sharma, L. F. Bailey, R. A. Messing
Corning Glass Works
Corning, NY 14831 (USA)

2. Immobilisierung^[*]

Trotz der Fülle von Informationen über die Immobilisierung von Enzymen und dem daraus erwachsenen Fortschritt der Enzymtechnologie verläuft die Einführung der immobilisierten Enzyme in die Technik unerwartet langsam. Zu den vielen Gründen dafür zählen die Entwicklung praktikablerer Immobilisierungstechniken, häufig mit nicht-toxischen Chemikalien, Langzeitexperimente für die Zulassung der fixierten Enzyme in der Lebensmitteltechnologie, die notwendige Beherrschung der mikrobiellen Kontamination – und Enzyme mit ungünstigen Eigenschaften. Im letztgenannten Fall könnten Manipulationen der Enzyme („engineering of enzymes“) Abhilfe schaffen.

2.1. Vorteile der Immobilisierung

Neben der möglichen Wiederverwendung biologisch wirksamer Katalysatoren bringt die Immobilisierung zahlreiche Vorteile für den praktischen Umgang mit diesen Materialien. Beispielsweise können normalerweise labile Substanzen durch mehrere kovalente Bindungen oder durch Einschluß in einer schützenden Umgebung stabilisiert werden (Fig. 1)^[7,8]. Auf diese Weise lassen sich chemische und physikalische Eigenschaften selektiv dem Anwendungszweck anpassen. Die Co-Immobilisierung mehrerer Enzyme kann die Effizienz von vielstufigen Konsekutivreaktionen erhöhen: Die lokale Konzentration an Zwi-

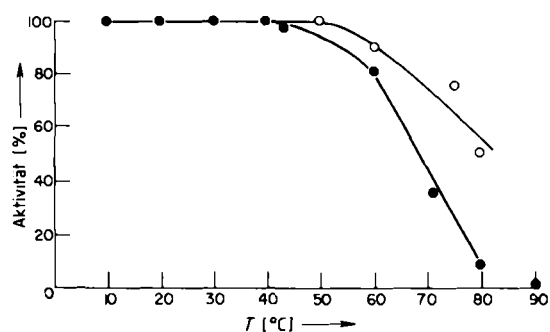


Fig. 1. Beispiel für die Erhöhung der thermischen Stabilität von Enzymen durch Immobilisierung. Lösliches Papain (●—●) und an porösem Glas immobilisiertes Papain (○—○) wurden bei steigender Temperatur jeweils 30 min gelagert. Die verbleibende Aktivität wurde bei 25 °C gemessen (nach [8]).

[*] Detaillierte Übersichten siehe z. B. [1–6].

schenprodukten und damit auch die Reaktionsgeschwindigkeit ist sehr viel größer als in freier Lösung, weil das Produkt des einen Enzyms das Substrat des nächsten ist. Mit mehreren trägerfixierten Enzymen lassen sich die Verhältnisse in der Zelle nachahmen, wo komplexe Enzymsysteme der Normalfall sind.

2.2. Immobilisierung von Mikroorganismen oder von Enzymen?

Viele extrazelluläre mikrobielle Enzyme werden in so großen Mengen hergestellt, daß man sie industriell verwenden kann. Bei intrazellulären Enzymen können dagegen die Kosten für Isolierung und Reinigung eine rentable Anwendung in Frage stellen. Isolierte, d. h. reinere Enzyme bringen allerdings Vorteile, z. B. größere Umwandlungsgeschwindigkeiten und reinere Produkte. Wenn man Mikroorganismen immobilisiert, die den interessierenden Katalysator enthalten, so addieren sich die Vorteile von immobilisierten Enzymen und die Vorteile von mikrobiellen Fermentationsprozessen.

Die Immobilisierung ganzer Zellen sollte erwogen werden, wenn das extrahierte Enzym instabil ist, denn in seiner natürlichen Umgebung behält es seine Aktivität. Als zusätzliche Aspekte bei der Zellimmobilisierung sind zu beachten: Fehlen von Nebenreaktionen in der Zelle, die mit der Enzymkatalyse konkurrieren (aber in den meisten Fällen schonend unterdrückt werden können); größere Enzymaktivität als sie bei immobilisierten Enzymen möglich wäre; viel kleineres Reaktionsvolumen für die kontinuierliche Umsetzung mit immobilisierten Zellen als für den herkömmlichen Fermentationsprozeß (bei gleicher Produktion). Ein möglicher Nachteil wäre, daß Zellwand und -membran den Substrat- und Produkttransport behindern.

2.3. Wirkungen der Immobilisierung

Durch die Immobilisierung ändern sich die Eigenschaften der Enzyme. Gibt man ein immobilisiertes Präparat in eine Lösung aus Substrat, Aktivatoren oder anderen Komponenten (pH und Ionenstärke konstant), so ist nicht sicher, daß die Bedingungen in der unmittelbaren Umgebung des Enzyms mit denen in der äußeren Lösung übereinstimmen^[9]. Dieses Phänomen („Einfluß des Mikromilieus“) kann durch Ladungen oder die physikochemischen Eigenschaften der Trägermatrix^[8] oder durch Diffusionsbehinderungen verursacht werden (Fig. 2 und 3).

Aufgrund dieses Einflusses sind kinetische Konstanten und andere Enzymparameter, die an immobilisierten Präparaten bestimmt worden sind, nur „scheinbare“ und nicht die wahren Werte, die sich in homogener Phase ergeben würden. Die Aktivitäten, mit denen man in praxi umgeht, müssen natürlich unter den Bedingungen des jeweiligen Prozesses ermittelt werden.

Bei der Wahl von Methode und Material für die Immobilisierung von ganzen Zellen muß man sich von ihrer geplanten Anwendung und dem Effekt der Immobilisierung auf ihre Integrität leiten lassen. Die Auswahl der Methoden wird auch dadurch eingeschränkt, ob das interessie-

rende Enzym seine Aktivität nur in lebensfähigen oder in intakten Zellen beibehält oder ob es auch in nichtwachsenden Zellen stabil ist. In Fällen wie der Regenerierung von

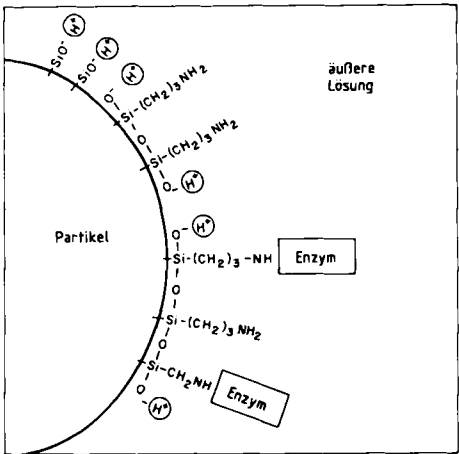


Fig. 2. Einfluß des pH-Wertes auf das Mikromilieu eines Enzyms, das an einem porösen Glas mit primären Aminogruppen immobilisiert ist (schematisch). Durch die Anhäufung von H^+ -Ionen ist das Milieu an der Oberfläche stärker sauer als in der äußeren Lösung (nach [9]).

Cofaktoren ist das System nur brauchbar, so lange die Zellen lebensfähig sind. Manchmal kann es nötig sein, ein Nährmedium zuzusetzen, um Integrität und Wachstum der Zelle zu erhalten.

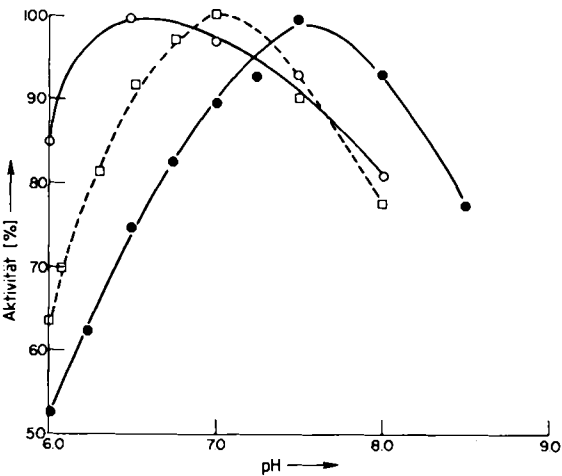


Fig. 3. Änderung der Aktivität von löslichem Papain (O—O) und von immobilisiertem Papain mit negativ (□—□) und positiv geladener Oberfläche (●—●) mit steigendem pH-Wert. Trägermaterial: derivatisiertes poröses Glas, Substrat: hitzedenaturiertes Casein (nach [8]).

2.4. Methoden der Immobilisierung

Enzyme oder Zellen können dadurch immobilisiert werden, daß sie adsorptiv oder kovalent an einen Träger gebunden oder daß sie in eine Matrix oder Mikrokapsel eingebettet werden (Fig. 4).

Die Immobilisierung eines Enzyms geht häufig auf das Zusammenwirken chemischer und physikalischer Faktoren zurück. Die Wahl des Trägers und der Immobilisierungsmethode sind kaum voneinander zu trennen.

2.4.1. Adsorption

Adsorption ist die Bindung eines Proteins an die Oberfläche eines Trägers, der keine speziellen funktionellen Gruppen für eine kovalente Bindung enthält. In der Theo-

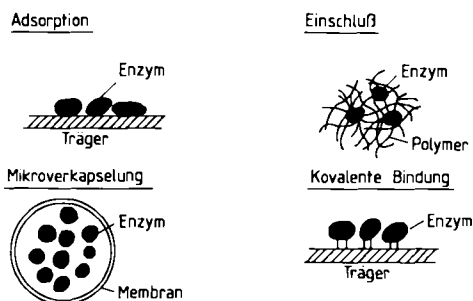


Fig. 4. Schematische Darstellung der Immobilisierungstechniken.

rie sollte die Adsorption reversibel sein, in der Praxis trifft das nur teilweise zu. Das Ausmaß von Adsorption und Desorption wird unter anderem von pH-Wert und Ionenstärke des Mediums, Anwesenheit des Substrats, Protein-Konzentration, Zeit und Temperatur sowie den Eigenschaften von Enzym und Träger bestimmt. Eine reversible Adsorption hat den Vorteil, daß man möglicherweise Enzyme und Träger zurückgewinnen kann.

Für die Praxis ist die Adsorption die einfachste und wirtschaftlichste Immobilisierungsmethode.

2.4.2. Kovalente Bindung

Die kovalente Bindung ist die mit Abstand am meisten untersuchte Immobilisierungsmethode (Fig. 5). Bei der Immobilisierung von Enzymen muß darauf geachtet werden, daß die Anordnung der Gruppen im aktiven Zentrum erhalten bleibt, d. h. daß sich Ladung und Mikromilieu dort nicht ändern. Das aktive Zentrum kann während der Kupplung durch Substrat oder einen kompetitiven Inhibitor geschützt werden. Es ist wenig wahrscheinlich, daß die Bindung im aktiven Zentrum erfolgt, da es im Vergleich zum ganzen Proteinmolekül recht klein ist und sich oft auch an einer schwer zugänglichen Stelle befindet. Manchmal vergrößert sich die Aktivität des immobilisierten Enzyms nach einer Anfangsphase. Dies geht darauf zurück, daß sich zusätzliche aktive Zentren in Gegenwart von Substrat öffnen, das vorher an den Träger oder an ein benachbartes Proteinmolekül gebunden sein mag.

Die kovalente Bindung eines Enzyms an einen Träger wird als dauerhafteste Möglichkeit zur Immobilisierung angesehen.

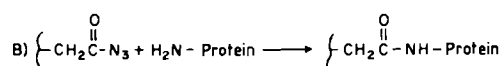
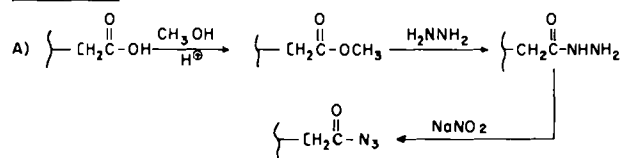
2.4.3. Matriceinschluß

Um ein Enzym einzuschließen, wird entweder ein quervernetztes Polymer um das Enzymmolekül gebildet, oder das Enzym wird in ein Polymer eingebettet, dessen Ketten anschließend vernetzt werden. Danach wird das Material auf die gewünschte Partikelgröße zerkleinert. Am gebräuchlichsten ist ein System aus Polyacrylamidgel; Silica-gel, Stärke und Silicongummi sind ebenfalls verwendet worden.

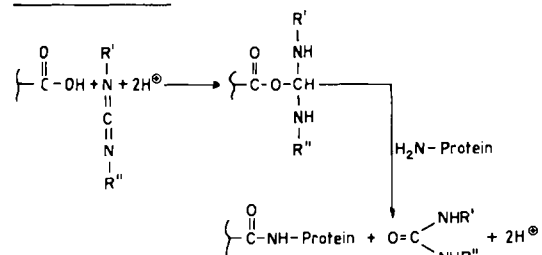
Der Matriceinschluß ist wahrscheinlich die beliebteste Methode zur Immobilisierung von mikrobiellen Zellen.

Dazu wurden z. B. Alginsäure und Carrageen verwendet, die Gelperlen bilden, wenn man ihre Lösungen mit den Zellen in Salzlösungen (z. B. CaCl_2 -Lösungen) einpreßt.

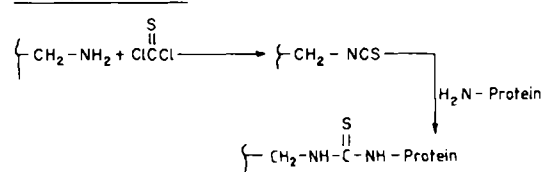
Azid-Methode



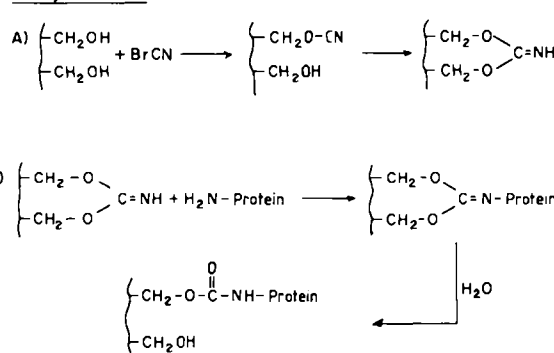
Carbodiimid-Methode



Isothiocyanat-Methode



Bromcyan-Methode



Azo-Methode

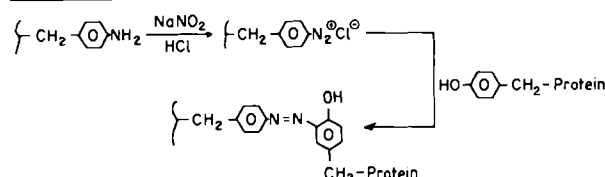


Fig. 5. Am häufigsten verwendete Methoden zur Immobilisierung von Enzymen durch kovalente Bindung.

Der Vorteil dieser Stoffe ist ihre Ungiftigkeit; die Zellen bleiben lebensfähig. – Alginsäure und Carrageen eignen sich auch für den Einschluß von Enzymen.

Im Endeffekt erhält man Zellen oder Enzyme im Gitter von Gelen, die Substrat- und Produktmoleküle frei diffundieren lassen, sofern deren Größe nicht die Grenzen übersteigt, die durch die Porengröße festgelegt sind. Eine Begrenzung der Porengröße nach oben ist nötig, da andernfalls die Enzymmoleküle aus dem Gel diffundieren. Da Gele eine Porengrößenverteilung haben, kann allerdings immer Enzym freigesetzt werden; dieses Problem läßt sich durch Quervernetzung des Enzyms mit einem difunktionalen Reagens, z. B. Glutaraldehyd, lösen.

Die maximale Substratbeladung des Enzyms kann durch seine Löslichkeit im Einschlußmedium begrenzt werden. Die tatsächliche spezifische Aktivität des eingeschlossenen Enzyms wird z. B. vom Einfluß des Mikromilieus auf den lokalen pH-Wert oder die lokale Ionenstärke sowie die ungleiche Verteilung der Substrate oder Inhibitoren bestimmt. Theoretisch bleibt bei dieser Immobilisierungsmethode die Tertiärstruktur des Enzyms erhalten.

2.4.4. Mikroverkapselung

Mikroverkapselung ist nur bei Enzymen anwendbar, deren Substrate und Produkte ein ziemlich niedriges Molekulargewicht haben. Es gibt zwei Methoden, Mikrokapseln mit Membran zu bilden: Die eine basiert auf der Koazervation (einem physikalischen Phänomen), die andere auf der Grenzflächenpolymerisation (einem chemischen Prozeß). Dicke und Durchlässigkeit der Membran werden von der Zusammensetzung der organischen Lösungsmittel, den Konzentrationen, den Membranbildnern und der Zeit für die Kapselbildung bestimmt. Bei der Mikroverkapselung wird das Enzym chemisch nicht modifiziert, so daß seine typischen Eigenschaften erhalten bleiben sollten. Durch Diffusionseffekte und das enzymatisch erzeugte Mikromilieum können sie jedoch verändert werden.

Diese Immobilisierungsmethode ist vor allem auf medizinische Anwendungen ausgerichtet, doch könnte sie auch bei industriellen Verfahren von Vorteil sein.

2.5. Auswahl des Trägers

Zur Erzeugung eines immobilisierten Enzyms braucht man das Enzym, den Träger und die Verknüpfungsmethode. Weitere Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke, Druck, Rühren, Cofaktor- und Substratzufuhr sowie Produktabtrennung können die Wirksamkeit des immobilisierten Enzyms beeinflussen. Bei der Auswahl eines Trägers müssen Morphologie, Oberfläche, Zusammensetzung (Tabelle 1)

Tabelle 1. Träger für Biomaterialien (Auswahl).

Glas sowie keramische Erzeugnisse (Aluminium-, Silicium- und Titanoxid) mit eingestellten Porengrößen
Polystyrol
Ionenaustauscher-Harze
Agarose und Sephadex
Nylon
Kollagen
Polysaccharid-Träger (Cellulose, Dextrose, Stärke, Agar)
Acrylpolymere
Siliconkautschuk
Silicagel
Bentonit
Ton
Magnetische Träger

und Regenerierbarkeit berücksichtigt werden. Alle diese Faktoren sollten unter Praxisbedingungen synergistisch zur Enzymaktivität beitragen, um ein Höchstmaß an Wirtschaftlichkeit zu erreichen.

Die Morphologie des Trägers (Oberfläche, Porenparameter) ist äußerst wichtig. Diesen Größen übergeordnet sind Konfiguration und Gestalt des Materials, sei es nun Schlauch-, Partikel-, Kugel-, Film- und Folien-, Faser- oder Membranform. Die Gesamtoberfläche des Trägers und somit die Enzymbeladung hängen außerordentlich stark davon ab, ob der Träger porös ist oder nicht^[3,10]. Nicht-poröse Träger haben nur eine geringe Gesamtoberfläche. Allerdings ist bei solchen Materialien die Diffusion nur wenig behindert, da das Protein nur an die äußere Oberfläche gebunden ist. Poröse Träger haben eine viel größere Gesamtoberfläche. Wenn auch ein erheblicher Teil davon nicht zugänglich ist, so lassen sich doch nur mit porösen Trägern sehr hohe Aktivitäten erreichen. Zusätzlich bietet die innere Oberfläche einen Schutz vor der bewegten, manchmal auch aggressiven äußeren Umgebung und vor mikrobiellem Angriff. Eine Vielzahl von Trägern mit eingestellten Porengrößen (und enger Porengrößenverteilung) oder mit großen Poren ist heute erhältlich. Mit diesen Trägern läßt sich die Aktivität von Biomaterialien optimieren (Fig. 6–8).

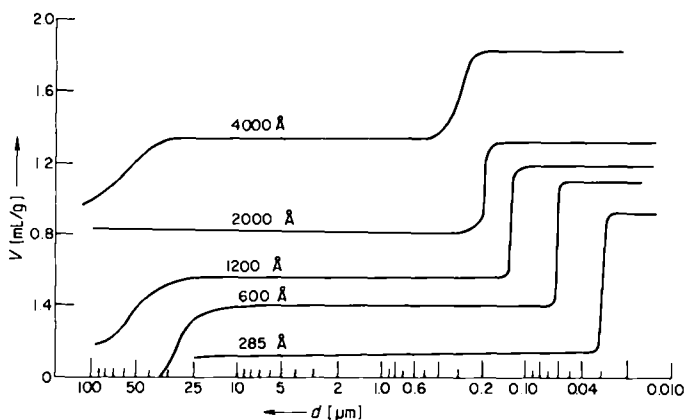


Fig. 6. Zusammenhang zwischen Porendurchmesser d und Porenvolumen V bei Gläsern mit eingestellter Porengröße. Der Mittelpunkt des vertikalen Abschnitts in jeder Kurve gibt den Mittelwert für den Porendurchmesser an. Je steiler der vertikale Abschnitt ansteigt, desto enger ist die Porengrößenverteilung (nach [10a]).

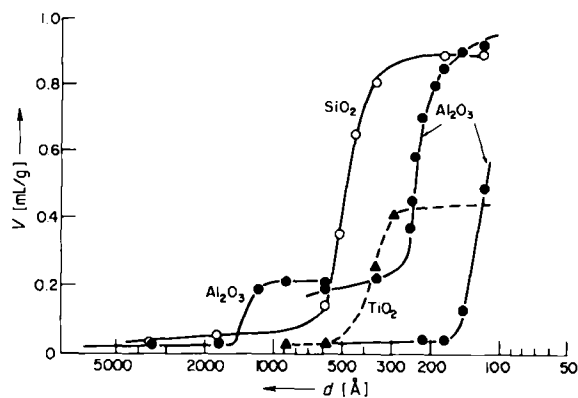


Fig. 7. Zusammenhang zwischen Porendurchmesser d und Porenvolumen V bei keramischen Materialien mit eingestellter Porengröße, gemessen durch Quecksilberaufnahme (nach [10b]).

Bei der Trägerwahl müssen auch die besonderen Eigenarten von organischem oder anorganischem Material in Betracht gezogen werden. Anorganische Träger sind hart

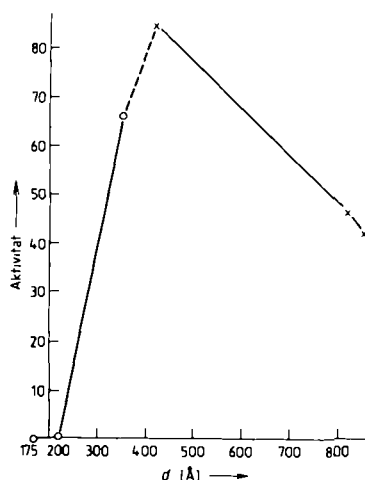


Fig. 8. Aktivität von Glucose-Oxidase (in Einheiten/g) in Abhängigkeit vom Porendurchmesser d , kumulative Auftragung (nach [7]).

und verformen sich nicht. Es muß zwar befürchtet werden, daß sie in Rührreaktoren mit kontinuierlichem Durchfluß durch Abrasion beschädigt werden, in Kolbenstromreaktoren sind sie jedoch gut verwendbar und verursachen keinen größeren Druckverlust. Organische Träger sind dagegen flexibler und elastischer, so daß sie in vielen Formen angewendet werden können, z. B. als dünne Membranen. Abrasion in Rührreaktoren ist nicht zu befürchten, doch muß bei Anwendung in Kolbenstromreaktoren mit größeren Druckabfällen gerechnet werden.

Die Möglichkeit, immobilisierte Enzyme zu regenerieren, trägt wesentlich zu ihrer Wirtschaftlichkeit bei. Die Regenerierung gelingt auf drei Wegen: 1) durch Auswaschen; hierbei wird das Material entfernt, das die Poren schließt und dadurch das Enzym desaktiviert, 2) durch Zugabe von frischem Enzym, 3) durch Regenerieren des Trägers; hierbei wird das alte Enzym mit chemischen oder physikalischen Methoden entfernt und danach wird erneut immobilisiert.

3. Technische Anwendung von immobilisierten Biomaterialien

3.1. Einleitung^[*]

Will man immobilisierte Biomaterialien zur Lösung eines Problems anwenden, ist zu prüfen, welche Kombination von Träger, Immobilisierungstechnik und Reaktorsystem am besten geeignet ist. Im folgenden werden mehrere Aspekte besprochen, die bei der Entwicklung von Systemen mit immobilisierten Biomaterialien berücksichtigt werden müssen.

[*] Detaillierte Übersichten siehe [11–16].

3.2. Kinetik der von immobilisierten Biomaterialien katalysierten Reaktionen^[**]

Immobilisierte Biomaterialien erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen Temperaturen oft stärker als feste, nicht-biologische Katalysatoren, denen allerdings zugestanden werden muß, daß sie bei höheren Temperaturen besser oder ebenso gut wie die meisten Biomaterialien katalysieren; diese werden meist etwas oberhalb 60 °C denaturiert. Eine Ausnahme ist das Enzym α -Amylase (vgl. Abschnitt 4.2.1).

Wenn man Geschwindigkeitsgleichungen aufstellen will, muß man die Elementarreaktionen für das betrachtete System abschätzen. Mit der Reaktion, die als langsamste angesehen wird, läßt sich ein brauchbarer Ansatz ableiten. Für die Kinetik von immobilisierten Biomaterialien geht man meistens von Gl. (1) aus, die von *Henri, Michaelis* und *Menten* sowie *Briggs* und *Haldane* postuliert wurde.

$$-\frac{dS}{dt} = v = \frac{kES}{K_m + S} \quad (1)$$

Dieser Ausdruck entspricht einer hyperbolischen Funktion, genauer: der Kinetik nach Langmuir-Hinshelwood oder nach Houghton-Watson. Die Michaelis-Gleichung (1) ist ein kinetischer Ausdruck für Reaktionsordnungen zwischen 0 und 1. Bei niedrigen Konzentrationen an limitierendem Substrat ist die Reaktion erster Ordnung. Wenn die Substratkonzentration erhöht wird, sinkt die Reaktionsordnung allmählich auf Null. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt ebenfalls direkt von der Gesamtkonzentration des Enzyms ab. Die Parameter in Gl. (1) können leicht erhalten werden, wenn man sie so umformt, daß sich eine lineare Auftragung ergibt:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (2)$$

Eine derartige Auftragung [Gl. (2)] wird als Lineweaver-Burke-Diagramm gezeichnet. Figur 9 zeigt ein solches Diagramm für eine freie und eine immobilisierte Protease. Daß sich bei der immobilisierten Form keine Gerade ergibt, läßt eine Schlüsselrolle des Stofftransports erkennen

[**] An Abkürzungen werden verwendet:

E	Gesamtkonzentration an Biomaterial (Enzym), frei und gebunden
F	Durchsatz
k	Wechselzahl, eine Konstante mit der Dimension einer reziproken Zeit
K_i	Inhibierungs-Konstante
K_m	Michaelis-Konstante mit der Dimension einer Konzentration. Ihr Zahlenwert entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
P	Produktkonzentration
S	Konzentration des zur Zeit t nicht gebundenen limitierenden Reaktanten (Substrats)
S_0	Anfangskonzentration des Substrats
S_t	Gesamtkonzentration des Substrats, wenn das Produkt quantitativ in Substrat umgewandelt würde
t	Reaktionszeit
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($= kE$)
X	Umsatz des Substrats $(S_0 - S)/S_0$
X_e	X , im Gleichgewicht
X_i	$(S_i - S_0)/S_i$
X_t	$(S_t - S)/S_t$

(siehe Abschnitt 3.3). Brauchbar erweisen sich auch die linearisierten Formen der Michaelis-Menten-Gleichung in den Auftragungen nach Hanes-Woolf, Woolf-Augustinson-Hofsee und Eadie-Scatchard.

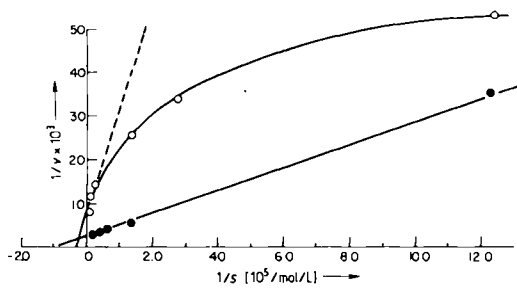


Fig. 9. Lineweaver-Burke-Diagramm für eine neutrale Protease aus *B. subtilis* mit 1% Natriumcaseinat als Substrat. Trägermaterial: Quarzglas mit ZrO_2 -Überzug. Die Krümmung in der Kurve des immobilisierten Enzyms weist auf Stofftransport-Effekte hin. O—O: Immobilisiertes Enzym, $K_m = 3.3 \times 10^{-5}$ mol/L; ●—●: natives Enzym, $K_m = 6.2 \times 10^{-6}$ mol/L (nach [17]).

Häufig ist der kinetische Ausdruck komplizierter als Gl. (1). Oft wird eine Inhibierung oder Aktivierung durch das Substrat oder Produkt beobachtet. Auch können an der Reaktion mehrere Substrate oder Produkte beteiligt sein, oder es kann eine Aktivierung durch Cofaktoren auftreten. Bei immobilisierten Biomaterialien müssen zusätzlich noch Parameter des Mikromilieus wie pH, Temperatur und Transportbehinderungen berücksichtigt werden. Bei der Hydrolyse von Lactose durch β -Galactosidase wirkt ein Produkt, Galactose, als Inhibitor. Um die Inhibierung durch ein Produkt P zu erfassen, wird Gl. (1) zu Gl. (3) modifiziert:

$$v = \frac{kES}{S + K_m(1 + P/K_i)} \quad (3)$$

Je niedriger der Wert der Inhibierungskonstante K_i ist, desto stärker ist die Inhibierung (bei gegebenen S und P). Die kinetischen Parameter wie auch die kinetischen Zusammenhänge erweisen sich als außerordentlich wertvoll, wenn man das Verhalten von Systemen mit immobilisierten Biomaterialien vorhersagen möchte (verfeinerte kinetische Betrachtungsweisen vgl. [18–23]).

3.3. Auswirkungen von Wärme und Behinderungen des Stofftransports

Die meisten Reaktionen, die durch immobilisierte Biomaterialien katalysiert werden, sind nur schwach exotherm, so daß eher der Stofftransport als die Wärmeableitung diskutiert werden muß. Das Substrat muß zum aktiven Zentrum des Enzyms transportiert und das Produkt von dort entfernt werden. Das Gleiche gilt für Systeme mit mehreren Substraten, aktiven Zentren und Produkten. Diese Bewegungen werden durch die Diffusions- und Konvektionsgesetze bestimmt. Bei den kinetischen Messungen sollte sichergestellt sein, daß die Reaktion und nicht die Diffusion geschwindigkeitsbestimmend ist. Wenn Behinderungen des Stofftransports ausschlaggebend sein könnten, wird die beobachtete Kinetik häufig als „schein-

bare Kinetik“ bezeichnet. Die „scheinbare K_m “ ist keine echte Kenngröße, sondern wird vom Mikro- und Makromilieu bestimmt^[24]. Man sollte immer prüfen, ob sich die „eigentlichen“ („intrinsic“) oder die realen kinetischen Größen in einem System mit Biomaterialien durch die Immobilisierung geändert haben. Dieser Befund kann für die Maßstabsvergrößerung und Auslegung industrieller Reaktoren unentbehrlich sein.

Es ist üblich, zwischen innerem und äußerem Stofftransport zu unterscheiden. Beim inneren Stofftransport hat man sich mit der Transportbehinderung innerhalb der porösen Partikel oder der Membran zu beschäftigen, an die das Biomaterial gebunden ist. Zu den Problemen des äußeren Stofftransports gehören Transportbehinderungen im Medium, das die Partikel oder Membran umgibt. Für solche Untersuchungen sind Konzepte aus dem Chemie-Ingenieur-Wesen nützlich^[25].

Selbst wenn sich die Kinetik eines Systems mit immobilisiertem Biomaterial nach Michaelis-Menten beschreiben läßt, kann die Lineweaver-Burke-Auftragung nicht-linear sein (vgl. Fig. 9). Dies^[17, 26, 27] ist zwar kein sicheres Indiz für Probleme beim Stofftransport, aber doch ein ernstzunehmender Hinweis darauf. Nach mathematischen Analysen^[28–31] kann die Nicht-Linearität auf einer Einschränkung des inneren und/oder äußeren Stofftransports beruhen. Auch stark unterschiedliche K_m -Werte des löslichen und des immobilisierten Biomaterials legen Behinderungen beim Stofftransport nahe^[32].

Die Bedeutung von Einflüssen des inneren Stofftransports wird oft durch den Wirkungsgrad η erfaßt:

$$\eta = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{scheinbare oder beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit in einer porösen Partikel oder einer Membran} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \text{Reaktionsgeschwindigkeit ohne Behinderung des inneren Stofftransports} \end{array} \right]} \quad (4)$$

Um die Einflüsse des äußeren Stofftransports zu erfassen, kann die Damköhler-Zahl Da verwendet werden:

$$Da = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{maximale reale oder „eigentliche“ Reaktionsgeschwindigkeit} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \text{maximale Geschwindigkeit, mit der sich das Substrat vom äußeren Volumen zur Grenzfläche bewegt} \end{array} \right]} \quad (5)$$

Wenn η nahe eins und Da sehr viel kleiner als eins ist, kann man den Stofftransport als nur wenig behindert betrachten. Im folgenden werden zuerst einige Techniken behandelt, mit denen man prüfen kann, ob es beim äußeren Stofftransport Schwierigkeiten gibt; anschließend werden Möglichkeiten aufgezeigt, mit denen sich die Diffusion in den Poren untersuchen läßt.

Im allgemeinen beobachtet man bei einer Behinderung des äußeren Stofftransports eine verringerte Aktivität. Wenn die scheinbare Reaktionsgeschwindigkeit auch durch eine größere Änderung der Strömungsgeschwindigkeit nicht verändert wird, kann der äußere Stofftransport nicht geschwindigkeitsbestimmend sein. Bei Festbettreaktoren kann man das dadurch prüfen, daß man mit verschiedenen Betthöhen, aber gleicher Verweilzeit arbeitet. Üblicherweise mißt man jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Durchsatz. Figur 10 zeigt das für immobilisierte Hefe-Invertase^[33].

Bei solchen Untersuchungen sollte der innere Stofftransport (oder Transport in den Poren) nur unbedeutend behindert sein, wie es bei nicht-porösen Materialien der Fall

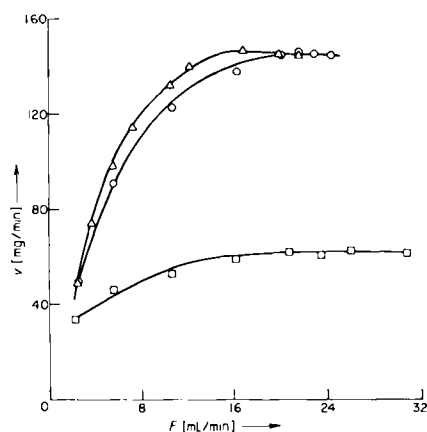


Fig. 10. Prüfung von Effekten des äußeren Stofftransports. Invertase aus *C. utilis* wurde an porösen Cellulosekörnern immobilisiert; Korngrößen: \square 28 mesh, \circ 35 mesh, Δ 48 mesh. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v (Bildung von Invertzucker aus Saccharose) vom Durchsatz F (nach [33]).

ist. Die tatsächlichen Geschwindigkeiten des äußeren Stofftransports können mit Formeln^[12, 16, 34] abgeschätzt werden. Um die Bedeutung des äußeren Stofftransports zu beurteilen, kann man seine Geschwindigkeit mit der der biochemischen Reaktion vergleichen. Nach einer bequemen Schnellmethode von Satterfield^[35, 36] läßt sich berechnen, wie dick ein Bett aus immobilisierten Biomaterialien sein muß, um den beobachteten Substratumsatz zu erreichen. Hierbei wird der äußere Stofftransport (Filmdiffusion) als geschwindigkeitsbestimmend angenommen. Wenn die tatsächliche Betthöhe erheblich größer ist als die berechnete, dann wird der äußere Stofftransport nur unbedeutend behindert.

Durch Diffusion in den Poren wird im allgemeinen auch die beobachtete Aktivität erniedrigt, was sich im Wirkungsgrad η [Gl. (4)] niederschlägt. Wie stark die Diffusion in den Poren die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen kann, wird aus Figur 11 deutlich^[37]. Erwartungsgemäß nimmt η mit steigender Substratkonzentration zu. Zunahme und tatsächlicher Wert von η hängen vom modifizierten Thiele-Modul Φ_0 ab. In dieser dimensionslosen Größe sind enthalten: Form, Wirkungsort und Diffusionsverhalten der immobilisierten Biomaterialien sowie K_m und V_{max} . Mit der Partikelgröße oder der Membrandicke nimmt Φ_0 zu. Bei Substratkonzentrationen $> 10 K_m$ und $\Phi_0 \approx 2$ nimmt die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit auf ungefähr die Hälfte ab.

Eine starke Behinderung der Porendiffusion läßt sich durch die folgenden drei Methoden nachweisen^[25] (vorausgesetzt, daß eine Behinderung des äußeren Stofftransports vernachlässigt werden kann):

1. *Bestimmung des effektiven Diffusionskoeffizienten innerhalb der enzymbeladenen Partikeln oder der Membran.* Man braucht unter anderem^[38] die beobachtete Geschwindigkeit, die Substratkonzentration, Maßzahlen für den Träger sowie die Geschwindigkeitsgleichung. Kennt man den effektiven Diffusionskoeffizienten, so kann man den Wir-

kungsgrad η ermitteln^[12, 16, 32]. Da sich der Diffusionskoeffizient jedoch nur umständlich bestimmen läßt, werden die beiden folgenden Methoden wahrscheinlich häufiger angewendet.

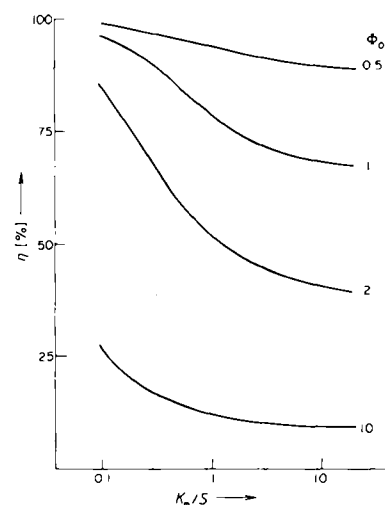


Fig. 11. Beziehung zwischen dem Wirkungsgrad η , dem Thiele-Modul Φ_0 und der dimensionslosen Substratkonzentration K_m/S (nach [37]).

2. *Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Partikelgrößen und Membrandicken.* Nimmt die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit nicht zu, wenn die Membranen dünner oder die Partikeln kleiner werden, dürfte die Diffusion in den Poren keine entscheidende Rolle spielen^[39].

3. *Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei mehreren Temperaturen.* Reaktionsgeschwindigkeiten hängen sehr viel stärker als Diffusionsgeschwindigkeiten von der Temperatur ab. Aus derartigen Daten kann man die Aktivierungsenergie mit einer Arrhenius-Auftragung ermitteln (siehe Fig. 12).

Erhält man im Arrhenius-Diagramm keine Gerade, so spielt die Diffusion in den Poren höchstwahrscheinlich eine Rolle; eine Gerade ist allerdings kein schlüssiger Beweis für uneingeschränkte Porendiffusion. Zum Beispiel

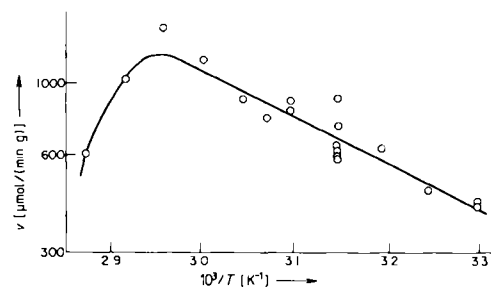


Fig. 12. Arrhenius-Auftragung für β -Amylase aus Gerste, immobilisiert an porösen Silicagelpartikeln. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v (Bildung von Maltose (μmol) bezogen auf immobilisiertes Enzym (g) und Zeit (min)) von der Temperatur (nach [40]).

ergibt sich für β -Amylase, die an porösem Silicagel immobilisiert ist, eine lineare Arrhenius-Beziehung (Fig. 12)^[40].

Trotzdem beträgt der Wirkungsgrad bei diesem System nur 0.2. Dies bedeutet langsame intrapartikuläre Diffusion. Aus den Aktivierungsenergien des löslichen und des immobilisierten Biomaterials erhält man ebenfalls Hinweise, ob die Porendiffusion geschwindigkeitsbestimmend ist^[41]. Für ein System mit immobilisiertem Biomaterial und stark behinderter Porendiffusion ist die beobachtete Aktivierungsenergie etwa halb so groß wie die echte oder „eigentliche“ Aktivierungsenergie^[25], die man erhält, wenn die Reaktion mit nativem Biomaterial katalysiert wird.

Auch mit dem „e-Test“ von Yamane^[42] lassen sich die Bedingungen festlegen, unter denen die Porendiffusion nicht bedeutend ist. Nach diesem von anderen Autoren bereits früher angewendeten Konzept werden Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Beladung der Träger mit Biomaterial bestimmt. Diese Werte sollten zu einer Hyperbel führen (Fig. 13). Im Bereich mit linearem Geschwindigkeitsanstieg ist der Wirkungsgrad η hoch.

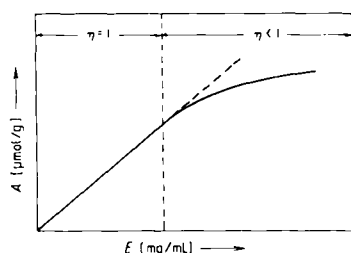


Fig. 13. Bestimmung des Bereichs einer Enzymreaktion, in dem der Wirkungsgrad $\eta = 1$ ist. Hierbei wird vorausgesetzt, daß zwischen der Konzentration an Biomaterial und dem Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung kein Zusammenhang besteht. Abhängigkeit von A (μmol Substrat, das pro g immobilisiertes Enzym umgesetzt wird) von der Enzymbeladung E (mg Protein pro mL Lösung) (nach [42]).

Für den Einfluß der Porendiffusion auf die Wirkungsweise immobilisierter Biomaterialien sind noch weitere Punkte wichtig, denn bei einem Biomaterial, das sehr empfindlich gegenüber Substratinhibition ist, könnte die Behinderung des Porentransports die Reaktion sogar fördern. Dies wurde bei immobilisierter Xanthin-Oxidase^[43] und immobilisierter Invertase^[33] beobachtet. Es ist auch diskutiert worden, daß die Porendiffusion lediglich die Temperatur- und pH-Stabilität eines immobilisierten Biomaterials vergrößert. Das würde bedeuten, daß die Aktivitäts-/Temperatur- und Aktivitäts-/pH-Kurven durch den Diffusionseinfluß verbreitert werden^[44]. Wenn die Substratmoleküle oder der Träger für das Biomaterial geladen sind, können erhebliche elektrostatische Kräfte auftreten; die pH-Stabilität wird dann nicht mehr erhöht, und das pH-Optimum kann sich verschieben (vgl. Fig. 3).

3.4. Reaktoren für Systeme mit immobilisiertem Biomaterial

Ehe wir die Auswahl des Reaktortyps diskutieren, ist eine kurze Übersicht der „idealisierten“ Typen angebracht. Für drei Typen „idealer“ Reaktoren – für Chargenbetrieb, mit idealer Durchmischung (z. B. Rührreaktor mit kontinuierlichem Durchfluß) und mit idealer Strömung (Kolbenstromreaktor, z. B. Festbettreaktor für kontinuierlichen Be-

trieb) (Fig. 14)^[45] – sind Gleichungen entwickelt worden, die das Verhalten wiedergeben.

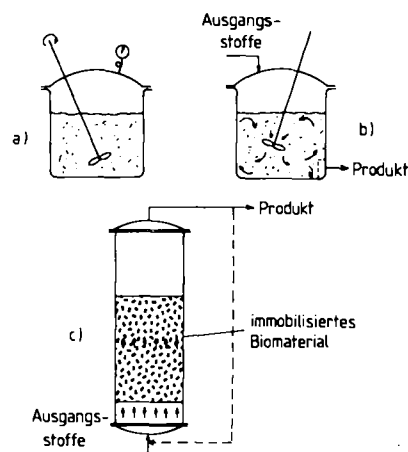


Fig. 14. Idealisierte Reaktoren: a) Rührreaktor für Chargenbetrieb, b) Rührreaktor mit kontinuierlichem Durchfluß, c) Festbettreaktor.

Ein vierter Typ, der allgemein als Hybrid der beiden letztgenannten Typen angesehen wird, ist der Fließbettreaktor (Fig. 15a). Die Strömungsverhältnisse lassen sich allerdings nicht leicht beschreiben.

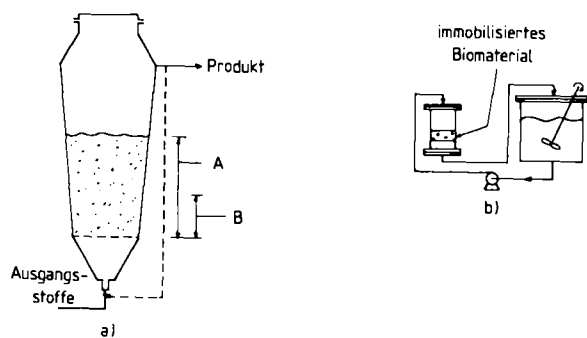


Fig. 15. a) Fließbettreaktor, A: expandierte Schicht, B: nicht fluidisierte Schicht; b) Differential-Schlaufenreaktor.

Für die ersten Experimente^[46–49] wurde ein wirkungsvoller^[25] Differential-Schlaufenreaktor benutzt (Fig. 15b), in welchem ein Festbett aus immobilisiertem Biomaterial mit einem gut durchmischten Reservoir der Ausgangsstoffe und des Produkts kombiniert ist.

Wenn man vereinfachend voraussetzt, daß ein spezieller Reaktor mit immobilisiertem Biomaterial ähnlich wie ein idealer Reaktor arbeitet, kann man anhand der Stoffbilanz und der Kinetik des Systems Gleichungen für diesen Reaktor aufstellen. Das Fließverhalten eines realen Reaktors läßt sich analysieren, indem eine nicht reagierende Substanz in den Reaktor injiziert und deren Konzentration nach Verlassen des Reaktors als Funktion der Zeit gemessen wird^[50, 51].

Reaktor-Gleichungen^[11–16, 52], die sich auf reale Systeme mit immobilisiertem Biomaterial anwenden lassen, gehören zu den wichtigsten Informationen. Diese Gleichungen ermöglichen es unter anderem, die Aktivität des Biomaterials im Reaktor zu jedem gewünschten Zeitpunkt abzu-

schätzen. Gl. (6) gilt z. B. für ein System mit idealer Strömung und Produktinhibition, wie sie bei der Hydrolyse von Lactose durch immobilisierte Lactose beobachtet wird:

$$\frac{kE}{F} = S_0(1 - K_m/K_i)(X_i - X_e) - (K_m + K_m S_i/K_i) \ln[(1 - X_e)/(1 - X_i)] \quad (6)$$

3.4.1. Auswahl des Reaktortyps

Von einem Reaktor mit immobilisiertem Biomaterial möchte man natürlich die *höchste Aktivität pro Volumeneinheit des Reaktors* (und damit die niedrigsten Kosten) für die *längstmögliche Zeit* haben. Zu den Hauptvorteilen des immobilisierten Biomaterials gehört die Wiederverwendbarkeit. Demnach ist im Prinzip jedes „geschlossene“^[15] System „akzeptabel“, in welchem das Biomaterial wiederverwendet werden kann, und zwar mit „akzeptablem“ Ausmaß an Substratumwandlung über eine „akzeptable“ Zeit. Die Auswahl des Reaktortyps wird unter anderem von folgenden Faktoren beeinflusst:

- 1) Art des Trägers
- 2) Art des Substrats
- 3) Kinetik der Reaktion
- 4) Konstruktions- und Betriebskosten des Reaktors
- 5) Leichtigkeit der Maßstabsvergrößerung
- 6) Methode zur Regenerierung oder zum Ersatz des immobilisierten Biomaterials
- 7) Stabilität im Betrieb und verfahrenstechnische Anforderungen
- 8) Aktivität pro Volumeneinheit oder erforderliche Produktivität

Verfahrenstechnische Aspekte sollten natürlich die Auswahl des Reaktors beeinflussen. Wenn der pH-Wert oder die Konzentration von gelöstem Sauerstoff eingestellt werden müssen, ist ein Reaktor mit guter Durchmischung vorzuziehen, denn es ist dort möglich, Säuren oder Basen bzw. Gase direkt einzuführen. Bei einem Schlaufenreaktor mit Festbett können Säure-, Base- und Gasgehalt extern kontrolliert werden. Bei Festbettreaktoren ist eine Kompression der Füllung bei hohem Durchsatz zu befürchten. Physikalische Zerstörung oder Auflösung des Trägers und/oder des Biomaterials können bei allen Reaktortypen auftreten.

Sehr wesentlich bei allen Reaktorsystemen mit immobilisiertem Biomaterial ist die Verhütung von mikrobieller Kontamination. Steriles Arbeiten erfordert nicht nur viele Vorsichtsmaßnahmen während des Betriebs, sondern auch die Sterilisierung sämtlicher Systeme. Will man im Autoklaven sterilisieren, müssen alle Komponenten des Systems 15 min bis mehrere Stunden gegen Dampf von 121 °C beständig sein. Wenn steriles Arbeiten nicht praktikabel erscheint, muß man versuchen, die mikrobielle Kontamination möglichst zu unterdrücken.

Auch wenn Verallgemeinerungen gefährlich sein können, sollen die Eigenschaften einiger Reaktortypen (Tabelle 2) kommentiert werden. Die (gegebenenfalls modifizierte) Michaelis-Menten-Gleichung ermöglicht es zusammen mit der Stoffbilanz, das Volumen eines Festbettreaktors für das gewünschte Ausmaß an Substratumwandlung abzuschätzen. Die Michaelis-Menten-Gleichung legt nahe,

Tabelle 2. Reaktortypen und -eigenschaften [11–16, 53].

Typ	Eigenschaften
Rührreaktor für Chargenbetrieb (Fig. 14a)	Bequem aufzustellen und leicht zu handhaben. Wirkungsvoller als ein Rührreaktor mit kontinuierlichem Durchfluß (Fig. 14b), wenn die Reaktionsordnung größer als Null ist.
Festbettreaktor für kontinuierlichen Betrieb (Fig. 14c)	Leicht zu handhaben und bei Systemen mit Reaktionsordnungen größer als Null bei Produktinhibition vorzuziehen. Das Trägermaterial sollte mechanisch beständig sein. Große Trägerpartikeln können Probleme beim Stofftransport verursachen, bei kleinen kann der Druck abfallen.
Fließbettreaktor, gut durchmischt (Fig. 15a)	Eingespeistes Material darf gröbere Teilchen enthalten: gut durchmischte Systeme sind bei Produktinhibition vorzuziehen. Probleme beim Stofftransport lassen sich umgehen. Das Trägermaterial sollte abriebfest sein; Maßstabsvergrößerung wurde nur wenig untersucht.
Festbett- oder Fließbettreaktor mit Schlaufenbetrieb (vgl. Fig. 15b)	Verhält sich bei langsamem oder ohne Kreislauf wie ein Kolbenstrom- und bei schnellem Kreislauf wie ein Rührreaktor mit kontinuierlichem Durchfluß.

für nicht all zu stark abweichende Systeme bei so hohen Substratkonzentrationen zu arbeiten, wie es mit K_m vereinbar ist. Dies ist bei idealer Strömung (Kolbenströmung) der Fall. In gut durchmischten Reaktoren wird die Substratkonzentration dagegen wegen des Rührens verringert. Nach quantitativen Untersuchungen ist das Arbeiten unter idealer Strömung besser als das unter guter Durchmischung, wenn hohe Substratumwandlung angestrebt wird^[11–16, 54]. Bei Produktinhibition ist der Kolbenstromreaktor sogar noch erfolgversprechender. Bei gegebener Substratkonzentration sollte er mit höherem Wirkungsgrad arbeiten als ein Rührreaktor. Bei starker Substratinhibition ist jedoch der Rührreaktor vorzuziehen, da die Substratkonzentration durch das Vermischen erniedrigt wird.

Im Prinzip lassen sich mit dem Fließbettreaktor einige der Probleme lösen, die bei den obengenannten Reaktoren auftreten. Es können kleinere Partikeln und Träger mit hohem Anteil an Biomaterial verwendet werden. Ein Fließbettreaktor läßt sich mit „idealer Strömung“ betreiben. Der Druckabfall bei ähnlicher Durchflußgeschwindigkeit kann im Fließbettreaktor wesentlich kleiner als im Festbettreaktor sein^[54, 55].

Früher wurde immobilisiertes Biomaterial kaum in Fließbettreaktoren umgesetzt. Unsicherheiten bei der Maßstabsvergrößerung und die Schwierigkeit, brauchbare Gleichungen für das Reaktorverhalten zu entwickeln^[56], mögen zu dieser Abneigung beigetragen haben. Untersuchungen an Fließbettreaktoren im halbertechnischen Maßstab sind vor einiger Zeit von *Coughlin et al.* für die Hydrolyse von Lactose^[57] und Stärke^[58], von *Tsao et al.* für die Isomerisierung von Glucose^[59] und von *Emery und Cardos* für die Hydrolyse löslicher Stärke^[51] durchgeführt worden.

Zu den bekannten Anwendungen von Festbettsystemen mit idealer Strömung zählt die Herstellung von „High Fructose Corn Syrup“ oder Isoglucose (HFCS bzw. IGS) bei der Clinton Corn Processing und den Corn Products International in den USA und bei Novo Industri A/S in Dänemark sowie die Aminosäureproduktion bei Tanabe Seiyaku Co. in Japan. Vor allem wegen betrieblicher Erfordernisse wie genauer pH-Kontrolle wurden gut durchmischte Reaktoren bei Beecham Pharmaceuticals, Squibb

und Astra für die kommerzielle Acylierung von Benzylpenicillin durch immobilisierte Penicillin-Acylase genutzt^[60]. Bei Snamprogetti (Italien) werden Lactase und Penicillin-Acylase, in Cellulosetriacetat-Fasern eingeschlossen, sowohl in gut durchmischten als auch in ideal durchströmten Reaktoren verwendet^[60]. Die kommerziellen Festbettreaktoren dürften 1–9 m³ Inhalt und Bett Durchmesser unter 1.5 m haben^[60]; der Durchmesser des Trägermaterials sollte 0.2 bis 4 mm betragen (siehe dazu Fig. 7 und 8).

Zu anderen interessanten Reaktortypen, die noch nicht kommerziell angewendet werden, zählen Reaktoren mit schlauchförmigen oder zusammengerollten Membranen^[16,61], anorganische Träger in Einkristallform^[62] sowie magnetisierbare Trägerteilchen^[63,64]. Spiralförmig zusammengerollte Membranen bieten hohe Oberflächen pro Volumeneinheit und damit guten Kontakt zwischen Substrat und Biomaterial. Bei magnetisierbaren Partikeln lassen sich Biomaterialverluste im Fließbett weitgehend unterdrücken. Vielversprechend ist auch eine Entwicklung in Japan^[65]: Auf Polyvinylalkohol-Fasern immobilisiertes Biomaterial hat eine sehr hohe Oberfläche pro Volumeneinheit.

3.5. Stabilität unter Betriebsbedingungen

Einer der kritischen Parameter bei der Entwicklung von Systemen mit immobilisiertem Biomaterial ist dessen Stabilität unter Betriebsbedingungen (Fig. 16); davon zu unterscheiden ist die Lagerungsbeständigkeit. Die Stabilität unter Betriebsbedingungen wird gewöhnlich als Halbwertszeit angegeben. Die häufigsten Gründe für die Abnahme der Aktivität sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Zu Vergleichszwecken kann man den Befund nutzen, daß immobilisiertes Biomaterial häufig nach einem Exponentialgesetz zerfällt. Oft wird zu Anfang ein Abfall der Aktivi-

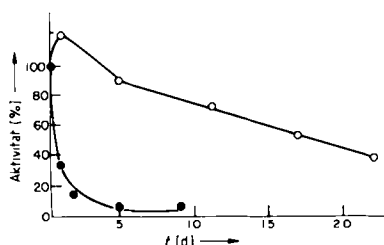


Fig. 16. Stabilität von immobilisierter Aminoacylase im Betrieb bei relativ hoher Substratkonzentration (0.6 mol/L Acetyl-DL-methionin) als Funktion der Zeit. ●—●: Tannin-aminoethylcellulose-Träger; ○—○: DEAE-Sephadex-Träger (nach [94]).

Tabelle 3. Faktoren, die den stabilen Betrieb von Systemen mit immobilisiertem Biomaterial möglicherweise beeinträchtigen.

Mikrobielles Wachstum
Resorption oder Auslaugen
Inaktivierung durch Metallsuren oder inhibierend wirkende Stoffe im Ausgangsmaterial
Beschichtung der Partikeln oder Membranen mit Proteinen oder anderen Fremdstoffen
Thermische Denaturierung
Mangelnde physikalische Stabilität des Trägermaterials
Temperatur- und pH-Änderungen

tät aufgrund des Auswaschens von schwach gebundenem Biomaterial oder ein Anstieg aufgrund einer Aktivierung

durch einen Bestandteil des Ausgangsmaterials beobachtet.

Pitcher^[66] hob hervor, daß der stabile Betrieb immer unter möglichst praxisnahen Bedingungen untersucht werden muß. Die Halbwertszeiten liegen zwischen zwei und über 100 Tagen (immobilisierte Lactase^[66]).

3.6. Produktionskosten und -strategien

In der Industrie interessieren vor allem die Kosten pro Einheit des Produkts, wenn die wesentlichen technischen Fragen beantwortet sind. Tabelle 4 gibt einen Anhaltspunkt zur vorläufigen Abschätzung der Kosten. Bisher wurden nur wenige Kostenberechnungen veröffentlicht, z. B. für Lactase^[67], Glucoamylase^[58,68] und Penicillin-Amidase^[101]. Aus Berechnungen für die Aminosäureproduktion bei der Tanabe Seiyaku Co.^[69] gehen beträchtliche Einsparungen durch den Gebrauch immobilisierter Biomaterialien hervor.

Tabelle 4. Zur Abschätzung der Kosten von Systemen mit immobilisiertem Biomaterial.

Rohstoffe einschließlich des Ausgangsmaterials
Vorbehandlung des Ausgangsmaterials, falls nötig
Immobilisiertes Biomaterial
Träger
Erforderliche Menge an Biomaterial je nach Effektivität des Immobilisierungsschritts
Material für den Immobilisierungsschritt
Ersatz oder Regeneration von Biomaterial je nach Stabilität der Betriebsweise
Herstellung des Produkts
Personal- und Instandhaltungskosten
Abschreibung, Steuern, Versicherungen

Bei der Entwicklung von Systemen mit immobilisierten Biomaterialien erkennt man möglicherweise, daß das System unterhalb einer gewissen Halbwertszeit nicht attraktiv ist. Man sollte die Produktivität pro Halbwertszeit abschätzen und dabei die tatsächliche Aktivität des Biomaterials berücksichtigen. Wenn man die Anfangsaktivität pro Volumeneinheit des Reaktors nennenswert erhöhen kann, ist eine kürzere Halbwertszeit möglicherweise tragbar. Eine Verdoppelung der Anfangsaktivität führt nicht notwendigerweise zu doppelter Produktivität des Reaktors^[70a] und kann sogar das Problem des Druckabfalls vergrößern^[71].

Die Kosten können durch Maximierung der Produktionsgeschwindigkeit minimiert werden, selbstverständlich innerhalb der Grenzen, die durch Temperatur, pH-Wert, Qualität des Endprodukts, der Zahl von Halbwertszeiten, die ein Reaktor betrieben werden kann, und der Zahl der vorhandenen Reaktoren gegeben sind. *Pitcher* hat sich mit Produktionsstrategien befaßt^[12,13,66], die sich entwickeln lassen, wenn man z. B. die Auswirkungen der Temperatur und des Durchsatzes auf die Aktivität und die Halbwertszeit kennt (Fig. 17). Um die Qualität des Produkts auch bei nachlassender Aktivität des immobilisierten Biomaterials zu erhalten, kann man die Temperatur erhöhen und/oder die Zufuhr des Ausgangsmaterials drosseln^[66,72]. Beabsichtigt man eine kommerzielle Anwendung eines Systems, so muß die Verfügbarkeit des Trägers und des Biomaterials in

ausreichender Menge und Qualität und zu akzeptablen Preisen sichergestellt sein.

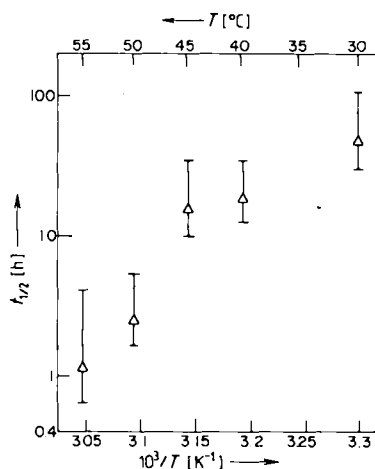


Fig. 17. Stabilität von Schweinenieren-Mutarotase, die an porösen SiO_2 -Partikeln immobilisiert ist, im Betrieb als Funktion der Temperatur. In diesem Beispiel ändert sich der Mechanismus der Aktivitätsabnahme bei ca. 45°C (nach [70b]).

3.7. Arbeitsmedizinische Aspekte

Enzyme sind Proteine und können somit Allergien hervorrufen. Einige Enzyme, besonders Proteasen, können darüber hinaus stark schädlich wirken. Bei einem Hauttest mit nur 0.3 ng Papain beobachtete *Flindt*^[73] an einem allergischen Patienten eine Strieme von 1 cm und eine Schwellung von 3 cm Durchmesser. Ein tödlicher Asthmaanfall ereignete sich beim Umfüllen von 1 kg Papain; das Opfer hatte sich etwa 10 m entfernt aufgehalten^[73].

Das Trägermaterial und die Chemikalien für die Immobilisierung müssen auf Unschädlichkeit geprüft werden, falls sie nicht schon gesetzlich zugelassen sind. Wenn eine Anwendung im Lebensmittel- oder Arzneibereich beabsichtigt ist, kann diese Prüfung recht aufwendig sein; unter Umständen müssen Tierfütterungsversuche durchgeführt werden. In dieser Hinsicht haben Biomaterialien einen Vorteil, die an „allgemein als sicher betrachteten“ („generally recognized as safe“, GRAS) Substanzen adsorbiert und dadurch immobilisiert sind. Solange ein Enzym nicht als unschädlich angesehen werden kann^[74,75], muß nachgewiesen werden, daß es nicht im Produkt enthalten ist. Ähnlich ist es bei mikrobieller Verunreinigung: Falls sie ein Problem ist – und das ist fast immer der Fall – sollten nur Biocide verwendet werden, die gesetzlich als unschädlich für Menschen eingestuft sind. Es ist auch versucht worden, das Wachstum von Mikroorganismen durch Desinfektionsmittel zu unterdrücken^[76–78]. Dabei kann jedoch das Enzym desaktiviert oder der Träger zerstört werden.

4. Anwendungen von Systemen mit immobilisierten Biomaterialien

4.1. Einleitung

Die Anwendungen lassen sich in die folgenden drei Gebiete unterteilen:

- 1) Anwendungen, die zu Handelsprodukten geführt haben oder kurz vor der Markteinführung stehen,

- 2) Anwendungen, die bereits im halbertechnischen Maßstab untersucht worden sind,
- 3) Anwendungen, die sich noch im Laboratoriumsstadium befinden sowie potentielle Anwendungen.

Tabelle 5. Zusammenstellung von Firmen, die immobilisiertes Biomaterial im technischen Maßstab anwenden. Abkürzungen: Pen. = Penicillin, GI = Glucose-Isomerase; Gal = Galactosidase.

A. B. Astra (Pen.-Acylase)
A. E. Stanley Manufacturing Co. (GI) [a]
American Maize (GI) [a]
Amstar Corporation (GI) [a]
Beecham (Pen.-Acylase)
CarMi (GI) [a]
Zentralmolkerei Mailand (β -Gal) [a]
Clinton Corn Processing, Tochterfirma von Standard Brands (GI)
Corn Products International (GI) [b]
Gist Brocades NV (GI) [a]
Great Western Sugar Co. (α -Gal) [a, c]
H. J. Heinz Co. (GI) [a]
Imperial Chemical Industries (GI) [a]
Kyowa Hakko Co. (Fumarase)
Novo Industri, A/S (GI)
Squibb (Steroid-Dehydrogenase)
Snampromgetti (β -Gal, Pen.-Amidase, Hydantoinase)
Tanabe Seiyaku Co. (Aminoacylase, Aspartase, Fumarase, Pen.-Amidase)
Toyo Jozo Co., Ltd. (Pen.-Amidase)

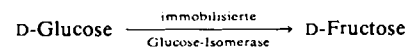
[a] Mit Lizenz einer anderen Firma produziert. [b] Mit Lizenz von Corning Glass Works produziert. [c] Mycelartige Träger mit α -Galactosidase-(Meliobiase-)Aktivität.

In Tabelle 5 sind die Firmen zusammengestellt, die immobilisierte Biomaterialien im technischen Maßstab nutzen.

4.2. Produkte, die schon im Handel sind oder vor der Markteinführung stehen

4.2.1. Getreidesirup mit hohem Fructosegehalt^[70, 71, 79–86]

Die hohen Zuckerpreise zu Beginn und in der Mitte der siebziger Jahre haben die Technologie zur Herstellung von Sirupen mit hohem Gehalt an Fructose und Glucose („Isoglucose“, „High Fructose Corn Syrup“ (HFCS) oder „High Fructose Glucose Syrup“) aus Stärke kräftig vorangetrieben. Zwischenzeitlich sind diese Entwicklungen wegen der gesunkenen Zuckerpreise wieder zurückgestellt worden. Hierbei handelt es sich vielleicht um das überzeugendste Beispiel für die Technologie mit immobilisierten Biomaterialien: Das Enzym Glucose-Isomerase wandelt, weit spezifischer als die „chemische“ Alternative, die Aldose in ihr Ketoisomer um.



D-Fructose kann je nach Konzentration bis zu 1.75mal süßer als Saccharose schmecken. Die Süßkraft von HFCS läßt sich durch Veränderung des Fructose/Glucose-Verhältnisses variieren, ohne daß der Nährstoffgehalt beeinflußt wird. In Obstkonserven und Limonaden hemmt HFCS aufgrund seines hohen osmotischen Druckes das Wachstum von Mikroorganismen. Sirupe, die bis zu 90% aus Fructose bestehen (bezogen auf das Trockengewicht), sind in den USA im Handel.

Wie die zahlreichen Patentanmeldungen zeigen, bestand an der HFCS-Technologie ein außerordentlich starkes industrielles Interesse^[86]. Die Entwicklungsarbeiten waren

nicht nur darauf ausgerichtet, das mit Enzymen arbeitende Verfahren zu verbessern, sondern auch intakte Zellen anzuwenden, die das Enzym enthalten^[87]. Eine andere Verbesserung war eine bei Novo Industri erhältliche α -Amylase. Dieses Enzym verträgt Temperaturen bis zu 105 °C, die während der ersten 5–6 min bei der Stärkeverflüssigung herrschen.

Die 1979 in den USA produzierte HFCS-Menge wird auf 1.6 Millionen Tonnen geschätzt^[82]. In Europa wurden 1976 etwa 70000 Tonnen produziert (vgl. auch ^[83]).

Die Immobilisierung von Glucose-Isomerase hat die Produktionskosten für Süßstoffe aus Stärke erheblich verringert und dadurch den Süßstoffmarkt völlig verändert. Vorteile wie vermindertes Reaktorvolumen sowie niedrigere Kosten für die Marktanpassung der Produkte und der Ausgangsmaterialien haben ebenso eine Rolle gespielt wie natürlich auch die niedrigeren Enzymkosten.

4.2.2. L-Aminosäuren^[89–100]

Weil L-Aminosäuren in der Medizin und als Nahrungsmittelzusatz verwendet werden, befaßt sich weltweit die Großindustrie mit ihrer Herstellung. In Japan allein sind 1976 L-Aminosäuren für ungefähr 300 Millionen Dollar produziert worden^[88, 89]. Aminosäuren können durch Isolierung aus Proteinhydrolysaten, durch Fermentation oder durch chemische Synthese gewonnen werden. Die Technologie mit immobilisierten Biomaterialien hat die chemische Synthese zu einem gangbaren Alternativweg gemacht. Aus dem „chemisch“ erhaltenen Gemisch von L- und D-Aminosäuren muß die L-Form isoliert werden, da nur sie vom Körper verwertet werden kann. Die Tanabe Seiyaku Co. verwendet seit 1969 immobilisierte Aminoacylase für diesen Schritt. Vermutlich war dies die erste industrielle Anwendung von immobilisierten Enzymen überhaupt. In einem kontinuierlichen, automatisch gesteuerten Prozeß wird die Mischung von L- und D-Aminosäure acyliert und danach mit einer immobilisierten Aminoacylase behandelt. Man erhält die gewünschte L-Aminosäure und unveränderte N-Acyl-D-aminosäure, die aufgrund von Löslichkeitsunterschieden voneinander getrennt werden können. Die acylierte D-Form wird racemisiert und wiederverwendet.

Die Tanabe Seiyaku Co. hat Aminosäuren wie Methionin, Phenylalanin, Alanin, Tryptophan und Valin im technischen Maßstab produziert. Die Herstellung anderer Aminosäuren wie L-Dopa, Phenylglycin und Hydroxyphenylglycin soll geplant sein. Die Ergebnisse groß angelegter Entwicklungsarbeiten am System mit immobilisierter Aminoacylase sind von Chibata et al.^[90–93] zusammengestellt worden.

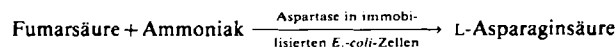
Bei diesem System wird eine Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae* in einem Festbettreaktor verwendet, die durch Ionenbindung an DEAE-Sephadexgel immobilisiert ist. DEAE-Sephadex erwies sich als mindestens sieben Jahre stabil.

Die Anwendung von immobilisierter Aminoacylase kann noch zusätzliche wirtschaftliche Vorteile bringen^[94]. Studien im Laboratoriumsmaßstab bei Tanabe Seiyaku haben gezeigt, daß man mit einer dreimal höheren Substanzkonzentration arbeiten kann, wenn man das Enzym durch

Adsorption an Tannin, das kovalent an Aminoethylcellulose gebunden ist, immobilisiert (vgl. Fig. 16).

Der Snamprogetti S.P.A. ist es gelungen, mit immobilisierter Aminoacylase L-Tryptophan in einer halbtechnischen Anlage zu produzieren^[95]. In ihrem Schlaufenreaktor für Chargenbetrieb wird ein Enzym verwendet, das in Cellulosetriacetat-Fasern eingeschlossen ist. Snamprogetti hat mit einem ähnlich eingeschlossenen Enzym aus Kalbsleber auch D-Aminosäuren aus Hydantoinen hergestellt^[96].

Für die Produktion von L-Asparaginsäure ist es nach Tanabe Seiyaku vorteilhafter, intakte Zellen in immobilisierter Form anzuwenden als isolierte Aspartase. In dem seit 1973 kommerziell genutzten Prozeß katalysiert die Aspartase-Aktivität von *Escherichia coli*-Zellen, die in ein Polyacrylamidgel eingeschlossen sind, die Bildung von L-Asparaginsäure aus Ammoniumfumarat^[97].



Es ist eine spezielle Eigenschaft der Technologie mit immobilisierten Biomaterialien, daß die Aktivität des Biomaterials stark erhöht und erniedrigt werden kann. Bei den eingeschlossenen Zellen nimmt die Aktivität um eine Größenordnung zu, und zwar von 130–180 auf 1200–1700 mol pro h und mL Gel, wenn die Zellen 24–28 h bei 37 °C mit dem Substrat und Magnesium-Ionen inkubiert werden. Dieses System ist bei Verwendung eines 1000-L-Festbettreaktors sehr stabil, und zwar 120 d bei 37 °C. Die Produktausbeute liegt bei 90–95%. Die Reaktion ist exotherm, so daß eine Vorrichtung zur Wärmeabfuhr erforderlich ist.

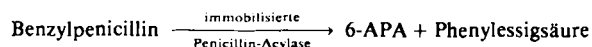
Bei einem verbesserten Verfahren für die L-Asparaginsäure-Produktion mit immobilisierten *E. coli*-Zellen dient Carrageen als Träger^[98]. Dieses Polysaccharid wird manchmal als gelbildendes Additiv in Nahrungsmitteln verwendet. Die Zellen werden zunächst im Gel eingeschlossen und dann mit Glutaraldehyd und Hexamethyldiamin vernetzt. Für eine Säule im Laboratoriumsmaßstab war eine Halbwertszeit von 686 Tagen vorgesehen; die Stabilität nach Maßstabsvergrößerung bleibt noch zu untersuchen.

Die Herstellung von zwei Aminosäure-Derivaten, L-Citrullin^[99] und Glutathion^[100], wurde auch bei Tanabe Seiyaku untersucht. Für die Glutathion-Produktion werden eingeschlossene *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen verwendet, der Cofaktor ATP wird kontinuierlich regeneriert. Zur kontinuierlichen Gewinnung von L-Citrullin aus L-Arginin werden in Polyacrylamidgel eingeschlossene *Pseudomonas putida*-Zellen in einem Festbettreaktor benutzt. Im Laboratoriumsreaktor hatte L-Arginin-Desaminase eine Halbwertszeit von 140 d bei 37 °C. Das Temperaturoptimum soll sich von 37 nach 55 °C verschieben; dieser Befund kann indessen auch auf die Bedingungen der Aktivitätsprüfung zurückgehen.

4.2.3. 6-Aminopenicillansäure

Ein anderes Anwendungsgebiet für immobilisierte Biomaterialien ist die Produktion von halbsynthetischen Penicillinen. Eine wichtige Zwischenstufe, 6-Aminopenicillansäure (6-APA), wurde technisch oder wenigstens im halb-

technischen Maßstab in Italien^[101], Japan^[102, 103], Schweden^[104], England und in den USA^[60] hergestellt.

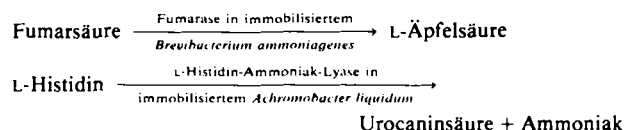


Die Stabilität des Enzyms Penicillin-Acylase oder -Amidase wird durch die Immobilisierung bedeutend erhöht. Das industrielle Interesse an dieser Technologie ist in diesem Fall auch durch die größere Reinheit des Produkts zu erklären.

An Sephadex G-200 kovalent gebundene Penicillin-Acylase wird seit 1973 bei A.B. Astra (Schweden) benutzt. Kovalente Bindung an Amberlite-Perlen verwendet der Beecham-Prozeß. Diese beiden Firmen sowie Squibb arbeiten mit Rührkesseln im Chargenbetrieb, hauptsächlich weil Alkali für die pH-Einstellung hinzugegeben werden muß. Wenn die Zugabe nicht sorgfältig gesteuert wird, kann das Enzym durch das Alkali denaturiert werden^[105].

4.2.4. Andere organische Verbindungen

Für die Herstellung organischer Verbindungen wie L-Äpfelsäure und Urocaninsäure (Imidazolacrylsäure) hat man sich in Japan die Technologie der immobilisierten Biomaterialien zunutze gemacht^[88, 106–109]. L-Äpfelsäure wird für intravenöse Infusionen und zur Behandlung von Leberleiden wie Hyperammonämie gebracht, Urocaninsäure ist ein Sonnenschutzmittel.



Die Untersuchungen bei Tanabe Seiyaku zeigen ein Problem auf, das nur ganze Zellen, nicht aber das isolierte Biomaterial betrifft. Immobilisierte ganze Zellen haben oft eine andere Bioaktivität als gewünscht. So bildeten die immobilisierten *B. ammoniagenes*-Zellen neben Äpfelsäure auch Bernsteinsäure. Glücklicherweise wurde entdeckt, daß man nicht nur die Entstehung von Bernsteinsäure unterbinden, sondern die Fumarase-Aktivität um den Faktor 6–7 steigern kann, wenn man die in Polyacrylamidgel eingeschlossenen Zellen in einer Substratlösung suspendiert, die oberflächenaktive Stoffe wie Desoxycholsäure oder Gallensäure enthält.

Ähnliches gilt auch für die Herstellung von Urocaninsäure: Die *A. liquidum*-Zellen hatten auch eine unerwünschte Urocanase-Aktivität, welche die gebildete Urocaninsäure zur Oxoimidazolpropionsäure umsetzte. In diesem Fall konnte man durch 30 min Erhitzen der Zellen auf 70 °C die Urocanase-Aktivität zerstören.

Auch Metallionen beeinflussen die Stabilität immobilisierter Biomaterialien (siehe auch Abschnitt 4.2.2). Wird Mg^{2+} (1 mmol/L) mit eingeschlossen, so verbessert sich die Halbwertszeit beim *A. liquidum*-System auf schätzungsweise 6 Monate – ohne Mg^{2+} beträgt sie nur 15 Tage^[109].

4.2.5. Hydrolyse von Molke- und Milchlactose

Die Technologie der immobilisierten Biomaterialien weist der Molkereiindustrie möglicherweise einen Weg,

das Problem der Molkeverwertung zu lösen. Nach Schätzungen werden weltweit jährlich nahezu 35 Millionen Tonnen Molke produziert. Von der süßen Molke, die der Hartkäse-Herstellung entstammt, wird gegenwärtig ein großer Teil getrocknet und Futter- oder Lebensmitteln zugesetzt. Die Verwertung von saurer Molke, einem Nebenprodukt bei der Herstellung von Weichkäse wie Hüttenkäse, ist dagegen wegen des Säuregehalts ein Problem. Die Molke wird in den USA und Kanada zu ca. 60%, in Frankreich und der UdSSR zu ca. 75%, in Dänemark und Holland zu ca. 95% verwendet^[110a]. Der Rest muß getrocknet oder konzentriert werden, da Molke wegen des hohen biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) nicht direkt in die Flüsse geleitet werden darf. Die steigenden Energiekosten geben einen Anreiz, nach profitableren Möglichkeiten für die Veredelung der Molke zu suchen.

Molke enthält 4.5–5% Lactose, 0.5–0.8% Protein und etwa 0.7% Salze. Wie Tabelle 6 zeigt, wäre das bei der Ultrafiltration erhaltene Permeat erheblich süßer, wenn die Lactose hydrolysiert werden könnte. Dazu eignen sich immobilisiertes Biomaterial sowie ein katalytisch wirkendes Harz^[112]. Andere Alternativen sind die Vergärung zu Alkohol und Methan^[110a] und die Kristallisation der Lactose vor der Proteingewinnung^[110b].

Tabelle 6. Vergleich der Süßkraft einiger Zucker in 10% wäßriger Lösung [111].

Zucker	Relative Süßkraft
Saccharose	100
Lactose	40
Glucose	75
Galactose	70

Immobilisierte Lactase (β -Galactosidase) hydrolysiert Lactose zu Glucose und Galactose; hierdurch werden Löslichkeit und Süßkraft verbessert. Die hydrolysierte Molke kann wegen ihrer süßenden Eigenschaften und ihres Nährwertes für Molkereiprodukte sowie als Substrat zur Herstellung von Bäckerhefe^[110c] verwendet werden. Figur 18 zeigt schematisch ein Verfahren, das von den Corning Glass Works angeboten wird.

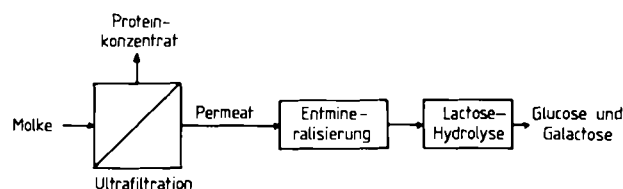


Fig. 18. Schema für die Molke-Verwertung. Das Protein wird durch Ultrafiltration gewonnen, und durch Hydrolyse des entmineralisierten Filtrats mit immobilisierter β -Galactosidase wird ein Süßstoff hergestellt.

Die Entmineralisierung des Permeats über Ionenaustauscher oder Elektrodialyse vermindert den „Salz“-Charakter des hydrolysierten Sirups. Zum System gehört ein Festbettreaktor mit Fließrichtung von oben nach unten. Die verwendete Pilz-Lactase wird an 30/45-mesh- SiO_2 -Perlen mit eingestellter Porengröße gebunden (Silan-Glutaraldehyd-Technik in wäßriger Lösung). Die Entwicklung eines Fließbettreaktors für den halotechnischen Maßstab gelang Coughlin et al.^[116, 117] (Lehigh University). Die Entwick-

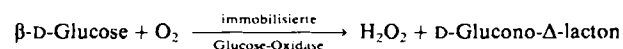
lungsarbeiten von Corning Glass Works und anderen Gruppen über die Hydrolyse von Molke-Lactose sind in [67, 77, 113–119] veröffentlicht.

Ein verwandtes Problem ist die Hydrolyse von Milch-Lactose für Menschen mit Lactase-Mangel. Die Zentralmolkerei von Mailand betreibt eine Anlage für die Hydrolyse von Lactose in Magermilch nach dem Snamprogetti-Verfahren mit einer Tageskapazität von 10 Tonnen^[78, 120, 121]. Das Enzym, eine Hefe-Lactase, ist in Cellulosetriacetat-Stapelfasern eingeschlossen, die sich in einer ummantelten Säule befinden. Die Fasern werden zuerst mit sterilem Puffer gewaschen. Danach wird sterile Magermilch chargenweise umgewälzt, um die Lactose zu hydrolysieren. Das Produkt „latte accadi“ soll angenehm süß schmecken.

4.2.6. Analytische Anwendungen

Es gibt viele analytische Anwendungen für immobilisierte Biomaterialien^[122, 123]. Hier sollen nur die Beispiele erwähnt werden, die sich mit Erfolg kommerzialisieren ließen. Glucose-Analysatoren, die mit immobilisierten Biomaterialien arbeiten, werden von Yellow Springs Instruments (YSI), Technicon Instruments, Leeds and Northrup Co. sowie von Radiometer Instruments auf den Markt gebracht. Ein Gerät für die Analyse von Harnstoff-Stickstoff im Blut, das mit immobilisierter Urease arbeitet, wurde von Owens-Illinois entwickelt^[80].

Das YSI-Gerät^[124–127] kann je nach Enzym für eine Fülle von Analysen benutzt werden. Zur Bestimmung von Glucose beispielsweise wird H_2O_2 mit Glucose-Oxidase erzeugt, die durch Reaktion mit Glutaraldehyd immobilisiert wurde.



Der Stromfluß ist der H_2O_2 -Konzentration proportional. Saccharose kann mit Invertase, Mutarotase und Glucose-Oxidase bestimmt werden, die an einer Membran immobilisiert sind und gemeinsam H_2O_2 aus Saccharose produzieren. Für Lactose wird an einer Membran immobilisierte Galactose-Oxidase benutzt.

Die Membran mit dem Enzym oder den Enzymen ist zwischen einer Celluloseacetat-Membran und einer Polycarbonat-Membran angeordnet. Die Celluloseacetat-Membran läßt H_2O_2 passieren, hält aber alle Reduktionsmittel zurück; die Polycarbonat-Membran schließt unerwünschte Zellen oder Enzyme aus (Fig. 19).

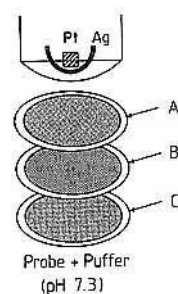


Fig. 19. Schema eines Geräts zur Bestimmung von Zuckern mit immobilisierten Enzymen (Yellow Spring Instruments). A: Celluloseacetatmembran, molekulare Ausschußgrenze 100; B: Membran mit immobilisiertem(n) Enzym(en); C: Polycarbonatmembran, 5 μm stark, Porendurchmesser 0.03 μm .

4.3. Herstellung von Glucose aus verflüssigter Stärke

Eine Herausforderung für die Technologie der immobilisierten Biomaterialien ist die Verzuckerung von Stärke. Theoretisch könnte immobilisierte Glucoamylase (Amylo-Glucosidase) im HFCS-Prozeß zur Produktion von Getreidesirup (vgl. Abschnitt 4.2.1) oder zur Herstellung alkoholischer Getränke verwendet werden. In der Praxis wird *lösliche* Glucoamylase für diese Prozesse benutzt. Ihr Absatz beläuft sich in den USA^[128] auf ca. 14 Millionen Dollar, in Japan auf ca. 4 Millionen Dollar. Die erste halbertechnische Anlage^[129] mit immobilisierter Glucoamylase ging von einem Festbettverfahren aus, die anderen beiden^[51, 58] arbeiteten nach der Fließbettmethode. Dies ist insofern begrüßenswert, als Kinetik und Verhalten eines Fließbettsystems mit immobilisierten Biomaterialien im halbertechnischen Maßstab untersucht wurden. Im folgenden sind einige der Hauptgründe angeführt, die der kommerziellen Entwicklung dieser Technologie entgegenstehen:

1) Stabilität im Betrieb: Das Wachstum von Mikroorganismen ist in Systemen mit immobilisierter Glucoamylase ein großes Problem, denn im Temperaturbereich der stabilen enzymatischen Aktivität (40–45 °C) werden auch kontaminierende Mikroorganismen begünstigt. Kontinuierliches und steriles Arbeiten ist im Betriebsmaßstab recht schwierig aufrechtzuerhalten. Eine thermophile Glucoamylase könnte das Problem lösen.

2) Kosten: Die Kosten pro Gewichtseinheit immobilisierter Glucoamylase müßten unrealistisch niedrig sein, wenn sie das derzeit verwendete, preisgünstige lösliche Enzym ersetzen sollte^[58].

3) Qualität: Ein kommerziell angewendetes System mit immobilisierter Glucoamylase müßte ein ebenso gutes Produkt wie das Verfahren mit dem löslichen Enzym liefern. Die dafür wünschenswerte Größenordnung der Betriebsanlage ist jedoch beim kontinuierlichen Arbeiten mit immobilisierten Biomaterialien schwierig zu erreichen.

Die Einführung eines solchen Systems in die Technik ließe sich somit nur in Ausnahmefällen rechtfertigen, z. B. wenn das lösliche Enzym nach Gebrauch (aus Produkten wie Diätbier) entfernt werden muß.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Der anfängliche Enthusiasmus für die immobilisierten Biomaterialien in den sechziger Jahren war vielleicht etwas übertrieben. Wenn man allerdings die vielen Anwendungsmöglichkeiten betrachtet, die im Laboratorium erforscht wurden, und das anhaltende Interesse an dieser Technologie berücksichtigt, kann man für die praktische Verwendung ein langsames, aber stetes Wachstum vorhersagen. Diese Möglichkeiten fassen wir im folgenden sehr kurz zusammen.

Zunächst sei das enorme Potential erwähnt, das diese Technologie für die Nutzung der sich erneuernden Ressourcen bietet (Tabelle 7). Die enzymatische Hydrolyse von Cellulose wurde eingehend bearbeitet. Cellulose kann sowohl als Träger als auch als Substrat für die Cellulasen angesehen werden, weil sie mit den Enzymen einen festen Komplex bildet. Zusätzliche Arbeiten auf dem Gebiet nähren die Hoffnung, Kraftstoffe und Chemikalien aus Holzabfällen gewinnen zu können.

In zukünftigen Systemen wird man höchstwahrscheinlich die Vorteile der Co-Immobilisierung nutzen können.

Tabelle 7. Potentielle Anwendungsgebiete immobilisierter Biomaterialien.

Nutzung sich erneuernder Ressourcen
Cofaktor-Regenerierung und -Synthese
Produktion von Maltose aus Stärke
Desinfektion von strömenden Gasen
Zerstörung von H ₂ O ₂ bei der Kaltsterilisation von Milch
Produktion von L-Lysin aus ε-Aminocaprolactam
Koagulierung von Milch
Produktion von Cyclodextrin aus Stärke
Aromaverbesserung von ultrahocherhitzter (UHT-)Milch
Umwandlungen von Steroiden
Müllverwertung

Die Co-Immobilisierung von zwei oder mehr Biomaterialien ist wegen der möglichen synergistischen Effekte außerordentlich vielversprechend. Diese Synergie kann sich vielfältig bemerkbar machen, z. B. durch Konsekutivreaktionen, Schutz vor Inhibitoren, höhere Reaktionsgeschwindigkeiten sowie verbesserte Säure-, Base- und Wärmestabilität.

Ein spezielles Beispiel ist der gemeinsame Einschluß von β-Glucosidase und *Saccharomyces cerevisiae* in Alginate; mit dieser Kombination lassen sich Cellobiose und Glucose im Fließbettreaktor in Ethanol umwandeln^[130].

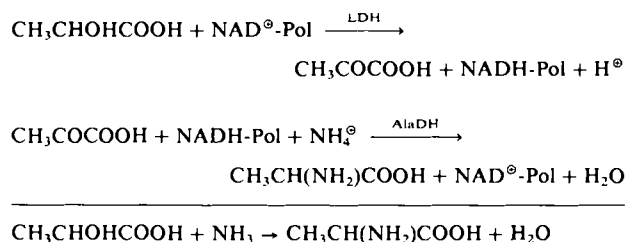
Verbesserte thermische Stabilität von Alkohol-Dehydrogenase wurde bei der Co-Immobilisierung des Enzyms mit dem Coenzym NAD(H) in Agarose gefunden^[131]. Die Halbwertszeit verbesserte sich von einigen Minuten auf fast 2 h^[132].

Die gemeinsame Anwendung von immobilisierter β-Amylase und Pullulanase hat Vorteile bei der Hydrolyse von Stärke^[133]. β-Amylase baut die äußeren Ketten ab, Pullulanase spaltet an den Verzweigungen, so daß jedes Enzym die Voraussetzungen für das Weiterwirken des anderen schafft.

Biomaterialien, die für Synthesen verwendet werden, benötigen oft Cofaktoren wie ATP, FMN und NADP. Ehe sich die „gebrauchten“ teuren Cofaktoren nicht regenerieren lassen, kann eine wirtschaftliche Durchführung der Synthesen nicht erwartet werden. Beispielsweise kosten 1 mol ATP bzw. NADP 1500 bis 2900 bzw. 57000 Dollar. Mit Biomaterialien sollte es möglich sein, diese Cofaktoren billiger herzustellen und zu regenerieren.

Ein System mit immobilisierten Coenzymen ist nur dann von praktischem Interesse, wenn es mehr als 1000 Redoxcyclen überdauert^[134, 135]. Im Hinblick darauf sei auf eine neuere Arbeit^[136] über die Immobilisierung von NADH mit wasserlöslichen Copolymeren verwiesen. Das System unter Verwendung der Monomere 3-[4-(2,3-Epoxypropoxy)butoxy]-2-hydroxypropylacrylat und N-(Methacrylyl)-2-glucosamin überstand 1000 bis 2500 Cyclen. Immobilisierte Coenzyme und Multienzyme sind zusammenfassend beschrieben worden^[135, 137, 138].

L-Alanin läßt sich mit zwei Enzymen und einem Coenzym synthetisieren^[139], die gemeinsam in Cellulosetriacetat-Fasern eingeschlossen sind. Es handelt sich um Lactat-Dehydrogenase (LDH), Alanin-Dehydrogenase (AlaDH) und 4-(NAD⁺-N⁶)-3-hydroxybutyryl-polyethylenimin (NAD⁺-Pol). Die Übertragung in den technischen Maßstab wurde nicht für sinnvoll gehalten.



Fermentationssysteme sind im Prinzip das Äußerste an Co-Immobilisierung. Viele Enzyme und Coenzyme kombinieren innerhalb der Zelle ihre Wirkungen, damit die Zelle wächst oder Stoffwechselaufgaben erfüllt. Die Immobilisierung von Zellen ist somit ein logischer Schritt über die Multienzym-Coenzym-Immobilisierung hinaus.

Die weltweit zunehmend interessierende Gentechnologie eröffnet zusätzliche Möglichkeiten für die Technologie mit immobilisierten Biomaterialien, ist aber auch eine Konkurrenz. Auch in Zukunft sollte diese Technologie zu analytischen und medizinischen Anwendungen führen, die hier nicht abgehandelt wurden. Ein Beispiel: Mit immobilisierten Biomaterialien lassen sich toxische Substanzen im Blut entgiften und weiter umsetzen^[140, 141].

Die Technologie mit immobilisierten Biomaterialien hat ihre Kinderkrankheiten überwunden, wie die weltweite kommerzielle Anwendung beweist. Zusätzliche Anwendungsgebiete werden wahrscheinlich hinzukommen, doch wird die Entwicklung vielleicht langsamer voranschreiten als bisher.

Wir danken Dr. W. H. Pitcher, Jr., für seine Ermutigung und Hilfe bei der Abfassung dieses Manuskriptes. Ms. S. A. Harrau, Ms. F. J. Osekoski und Ms. N. L. Foster sind wir ebenfalls für ihre Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 19. September 1979,
ergänzt am 13. Mai 1982 [A 373]
Übersetzt von Prof. Dr. Volker Rossbach
und Dipl.-Chem. Johannes Windeln, Aachen

- [1] O. R. Zaborsky: *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland 1973.
- [2] G. R. Stark: *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports*, Academic Press, New York 1971.
- [3] R. A. Messing: *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, Academic Press, New York 1975.
- [4] H. H. Weetall, S. Suzuki: *Immobilized Enzyme Technology*, Plenum Press, New York 1974.
- [5] A. Wiseman: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Wiley, New York 1975.
- [6] K. Mosbach, *Methods Enzymol.* 44 (1976).
- [7] R. A. Messing, *J. Non-Cryst. Solids* 19 (1975) 277.
- [8] H. H. Weetall, *Food Prod. Dev., Part 1* (1973) Nr. 4.
- [9] H. H. Weetall: *Res./Dev.* 22 (1971) Nr. 12, S. 18.
- [10] a) A. M. Filbert, W. H. Pitcher, Jr., *Ind. Res.* 1975, Nr. 8; b) D. L. Eaton, *Adv. Exp. Med. Biol.* 42 (1974) 241.
- [11] W. H. Pitcher, Jr. in [3], Kap. 9.
- [12] W. H. Pitcher, Jr., *Adv. Biochem. Eng.* 10 (1978) 1.
- [13] W. H. Pitcher, Jr.: *Immobilized Enzymes for Food Processing*, CRC Press, Cleveland 1979, Kap. 2.
- [14] M. D. Lilly, P. Dunnill, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 3 (1972) 221.
- [15] M. D. Lilly, P. Dunnill, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 717.
- [16] W. R. Vieth, K. Venkatasubramanian, A. Constantinides, B. Davidson, *Appl. Biochem. Bioeng.* 1 (1976) 221.
- [17] R. D. Mason, C. C. Detar, H. H. Weetall, *Biotechnol. Bioeng.* 17 (1975) 1019.
- [18] D. J. Bates, C. Frieden, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 7885.
- [19] A. Cornish-Bowden, R. Eisinger, *Biochem. J.* 139 (1974) 721.
- [20] S. L. Yun, C. H. Suelter, *Biochim. Biophys. Acta* 480 (1977) 1.
- [21] A. C. Storer, M. G. Darlison, A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.* 151 (1975) 361.
- [22] T. A. Fjellstedt, J. J. Schlesselman, *Anal. Biochem.* 80 (1977) 224.

- [23] R. G. Duggleby, J. F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* 481 (1977) 297.
- [24] V. Kasche, A. Kapune, H. Schwegler, *Enzyme Microbiol. Technol.* 1 (1979) 41.
- [25] O. Levenspiel: *Chemical Reaction Engineering*, Wiley, New York 1972, 2. Aufl., Kap. 14.
- [26] K. Ohmiya, S. Tanimura, T. Kobayashi, S. Shimizu, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1507.
- [27] B. K. Hamilton, C. R. Gardner, C. K. Colton, *AIChE J.* 20 (1974) 503.
- [28] M. Moo-Young, T. Kobayashi, *Can. J. Chem. Eng.* 50 (1972) 162.
- [29] J. Engasser, C. Horvath, *J. Theor. Biol.* 42 (1973) 137.
- [30] B. K. Hamilton, C. R. Gardner, C. K. Colton in A. C. Olson, C. L. Cooney: *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*, Plenum Press, New York 1974, S. 205.
- [31] W. K. Shieh, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 503.
- [32] H. Maeda, G. T. Tsao, L. F. Chen, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 383.
- [33] P. A. Dickensheets, L. F. Chen, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 365.
- [34] S. Fukushima in H. H. Weetall, S. Suzuki: *Immobilized Enzyme Technology: Research and Applications*, Plenum Press, New York 1975, S. 225.
- [35] C. N. Satterfield: *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysis*, M.I.T. Press, Cambridge, MA 1970.
- [36] N. B. Havewala, W. H. Pitcher, Jr. in E. K. Pye, L. B. Wingard, Jr.: *Enzyme Engineering*, Vol. 2, Plenum Press, New York 1974, S. 315.
- [37] W. Halwachs, C. Wandrey, K. Schugler, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 541.
- [38] K. B. Bischoff, *Chem. Eng. Sci.* 22 (1967) 525.
- [39] D. R. Marsh, Y. Y. Lee, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 483.
- [40] C. C. Hon, P. J. Reilly, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 505.
- [41] W. H. Pitcher, Jr., *Proceedings—Whey Products Conference*, 1974, U.S.D.A. ERRC Publ. No. 3996, S. 107.
- [42] T. Yamane, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 749.
- [43] J. Tramper, F. Muller, H. C. vanderPlas, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1507.
- [44] N. G. Karanth, J. E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1817.
- [45] Siehe [25], Kap. 5.
- [46] J. R. Ford, A. H. Lambert, W. Cohen, R. P. Chambers: *Enzyme Engineering*, Wiley-Interscience, New York 1972.
- [47] Y. Y. Lee, K. Wun, G. T. Tsao in [34], S. 129.
- [48] J. E. Prenosil, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 89.
- [49] B. Atkinson, I. Rousseau, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 1065.
- [50] J. M. Brillouet, P. R. Coulet, D. C. Gautheron, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 125.
- [51] A. N. Emery, J. P. Cardoso, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1903.
- [52] E. Siimer, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1853.
- [53] W. H. Pitcher, Jr., *Process Eng.* 1977, Nr. 7, S. 77.
- [54] R. W. Coughlin, M. Charles, *Enzyme Technol. Dig.* 3 (1974) 69.
- [55] I. Karube, S. Tanaka, T. Shirai, S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 1183.
- [56] T. Kobayashi, M. Moo-Young, *Biotechnol. Bioeng.* 13 (1971) 893.
- [57] M. Charles, R. W. Coughlin, B. R. Allen, E. K. Parchuri, F. X. Hasselberger, *66th Annual Meeting of the Am. Inst. of Chem. Eng.*, Philadelphia 1973, Paper 17b.
- [58] B. R. Allen, M. Charles, R. W. Coughlin, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 689.
- [59] Y. Y. Lee, K. Wun, G. T. Tsao, *77th Nat. Meeting of the Am. Inst. of Chem. Eng.*, Pittsburgh 1974, Paper 11a.
- [60] M. D. Lilly in: *Proc. First Eur. Congress on Biotechnol.*, Verlag Chemie, Weinheim 1978, S. 165.
- [61] A. H. Emery in [36], S. 269.
- [62] M. R. Benoit, J. T. Kohler, *Biotechnol. Bioeng.* 17 (1975) 1617.
- [63] P. J. Robinson, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 603.
- [64] P. H. Halling, P. Dunnill, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 393.
- [65] *Chem. Age*, 27. Oktober 1978.
- [66] W. H. Pitcher, Jr., *Enzyme Engineering Conference*, Bad Neuenahr 1977.
- [67] W. H. Pitcher, Jr., R. Ford, H. H. Weetall, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 792.
- [68] W. H. Pitcher, Jr., H. H. Weetall, *Enzyme Technol. Dig.* 4 (1975) 127.
- [69] I. Chibata: *Immobilized Enzymes—Research and Development*, Kodansha, Tokyo 1978, S. 174, 190.
- [70] a) D. Y. Ryu, S. H. Chung, K. Katoh, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 159; b) H. N. Chang, P. J. Reilly, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 923.
- [71] P. B. Poulsen, L. Zittan, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 809.
- [72] K. Venkatasubramanian in G. B. Broun, G. Manecke, L. B. Wingard, Jr.: *Enzyme Engineering*, Vol. 4, Plenum Press, New York 1978, S. 283.
- [73] M. Flindt, *Process Biochem.* 13 (1978) 3.
- [74] US Congressional Federal Register 173.135, 426 (1977).
- [75] G. Reed: *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, New York 1975, Kap. 20.
- [76] R. L. Barndt, J. G. Leeder, J. R. Giacini, D. H. Kleyn, *J. Food Sci.* 40 (1975) 291.
- [77] W. H. Pitcher, Jr., J. R. Ford in E. K. Pye, H. H. Weetall: *Enzyme Engineering*, Vol. 3, Plenum Press, New York 1978, S. 483.
- [78] M. Pastore, F. Morisi, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 822.
- [79] R. A. Messing, A. M. Filbert, *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 920.
- [80] K. J. Skinner, *Chem. Eng. News* 53 (1975) Nr. 33, S. 22.
- [81] R. D. Sweigart in [72], S. 229.
- [82] H. C. Barfoed, *Enzyme Microb. Technol.* 1 (1979) 66.
- [83] „Editor's note“, *Enzyme Microb. Technol.* 1 (1979) 66.
- [84] C. Bucke in A. Wiseman: *Topics in Enzyme and Fermentation Technology*, Ellis Horwood, Chichester 1977, Kap. 7.
- [85] M. M. Godzicki, *Food Eng.* 47 (1975) Nr. 10, S. 11.
- [86] *Enzyme Microb. Technol.* 1 (1979) 62.
- [87] M. Kamakura, M. Yoshida, I. Kaetsu, *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979) 310.
- [88] The International Technical Information Institute: *Immobilized Enzymes and Cells in Japan*, Special Survey Report, Tokyo 1978.
- [89] K. Yamada, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 1563.
- [90] I. Chibata, T. Tosa, T. Sarto, T. Mori, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 746.
- [91] T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.* 33 (1969) 1047.
- [92] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Matsuo, *Proc. IV. IFS: Ferment. Technol. Today*, 1972, S. 383.
- [93] T. Tosa, T. Mori, I. Chibata, *Enzymologia* 40 (1971) Nr. 1, S. 49.
- [94] T. Watanabe, T. Mori, T. Tosa, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 477.
- [95] F. Bartoli, G. E. Bianchi, D. Zaccardelli in [72], S. 279.
- [96] D. Dinelli, W. Marconi, F. Cecere, G. Galli, F. Morisi in [77], S. 477.
- [97] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 739.
- [98] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida in [72], S. 335.
- [99] K. Yamamoto, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 1589.
- [100] K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1978) 23.
- [101] F. Giacobbe, A. Iasonna, F. Cecer in [72], S. 245.
- [102] T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2 (1976) 153.
- [103] Siehe [69], S. 183.
- [104] E. Lagerlof, L. Nathorst-Westfelt, B. Ekstrom, B. Sjoberg, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 759.
- [105] S. W. Carleysmith, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 1057.
- [106] I. Chibata, T. Tosa, K. Yamamoto in [77], S. 463.
- [107] K. Yamamoto, T. Tosa, K. Yamashita, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 1101.
- [108] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto in [34], S. 111.
- [109] K. Yamamoto, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 1601.
- [110] a) L. Reesen, R. Strube, *Process Biochem.* 13 (1978) 21; b) J. C. Davis, *Chem. Eng. (NY)* 79 (1972) 114; c) T. L. Stineman, J. D. Edwards, J. C. Grosskopf, US-Pat. 4 192 918 (1980).
- [111] J. H. Woychik, V. H. Holsinger in R. L. Ory, A. J. St. Angelo: *Enzymes in Food and Beverage Processing*, Am. Chem. Soc., Washington, DC 1977, S. 67.
- [112] M. Demaimay, Y. LeHenoff, P. Printemps, *Process Biochem.* 13 (1978) 3.
- [113] H. H. Weetall, N. B. Havewala, W. H. Pitcher, Jr., C. C. Detar, W. P. Vann, S. Yaverbaum, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 295.
- [114] H. H. Weetall, N. B. Havewala, W. H. Pitcher, Jr., C. C. Detar, W. P. Vann, S. Yaverbaum, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 689.
- [115] D. L. Eaton, W. H. Pitcher, Jr., *Northeast Regional Am. Chem. Soc. Meeting*, Boston, MA 1978.
- [116] R. W. Coughlin, M. Charles in E. K. Pye: *Enzyme Technology Grants—Users Conference*, NTIS PB 265 548, 1975, S. 107.
- [117] M. Charles, R. W. Coughlin, E. K. Paruchuri, B. R. Allen, F. X. Hasselberger, *Biotechnol. Bioeng.* 17 (1975) 203.
- [118] A. C. Olson, W. L. Stanley, *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973) 440.
- [119] W. L. Stanley, R. Palter, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 597.
- [120] M. Pastore, F. Morisi, L. Leali, *Milchwissenschaft* 31 (1976) 362.
- [121] W. Marconi in [60], S. 88.
- [122] G. C. Guilbault, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 579.
- [123] D. N. Gray, M. H. Keyes, B. Watson, *Anal. Chem.* 49 (1977) 1067 A.
- [124] L. C. Clarke, Jr., US-Pat. 3 539 455.
- [125] P. J. Taylor, E. Kmetec, J. M. Johnson, *Anal. Chem.* 49 (1977) 789.
- [126] D. N. Gray, M. H. Keyes, *ChemTech* 7 (1977) 642.
- [127] W. W. Spencer, D. Sylvester, G. H. Nelson, *Clin. Chem.* 24 (1978) 386.
- [128] B. Wolnak, *Conf. on Enzyme Economics*, Chicago, IL 1978.
- [129] H. H. Weetall, W. P. Vann, W. H. Pitcher, Jr., D. D. Lee, Y. Y. Lee, G. T. Tsao, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 776.

- [130] B. Hahn-Hagerdal, E. Anderson, M. Lopez-Leiva, B. Mattiason, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11 (1981) 651.
 [131] S. Gestrelus, M.-O. Mansson, K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* 57 (1975) 529.
 [132] A. C. Koch-Schmidt, K. Mosbach, *Biochemistry* 16 (1977) 2101.
 [133] K. Martensson, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 1567.
 [134] R. P. Chambers, E. M. Walle, W. H. Baricos, W. Cohen in [77], S. 363.
 [135] C. R. Lowe, *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* 5 (1981) 13.
 [136] C. W. Fuller, J. R. Rubin, H. J. Bright, *Eur. J. Biochem.* 103 (1980) 421.
 [137] S. A. Barker, P. J. Somers, *Adv. Biochem. Eng.* 10 (1978) 27.
 [138] K. Mosbach, *Adv. Enzymol.* 46 (1978) 205.
 [139] W. Marconi, F. Morisi, *Appl. Biochem. Bioeng.* 2 (1979) 219.
 [140] T. M. S. Chang: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, Plenum Press, New York 1977.
 [141] D. M. Munnecke, *Process Biochem.* 13 (1978) 14.

Grenzorbitale – ihre Bedeutung bei chemischen Reaktionen (Nobel-Vortrag)**

Von Kenichi Fukui*

Einführung

Mehr als ein Jahrtausend galt die Chemie als eine komplizierte und schwer in den Griff zu bekommende Wissenschaft, in der Voraussagen kaum möglich schienen. Die Bemühungen um wenigstens partielle Vorhersagbarkeit brachten mit dem Erfolg der „Elektronen-Theorie“ erstmals ein positives Ergebnis. Diese Theorie wurde hauptsächlich von Erforschern der Organischen Chemie begründet, genannt seien *Fry*, *Stieglitz*, *Lucas*, *Lapworth* und *Sidgwick*. Von *Robinson* und *Ingold* weiterentwickelt, wurde sie späterhin durch Beiträge vieler anderer Chemiker ausgebaut^[1]. In der Elektronen-Theorie wird die Art der Elektronenverschiebung in Molekülen betrachtet und unter verschiedenen Aspekten erörtert. Hierzu bedarf es eines Kriteriums bezüglich der Anzahl der Elektronen, die einem Atom oder einer Bindung in einem Molekül prinzipiell zuzuordnen ist. Es war das Lewissche Konzept der gemeinsamen Elektronenpaare, das die Elektronen-Theorie auf eine feste Basis gestellt hat^[2].

In der organisch-chemischen Theorie werden konzeptionelle Begriffe wie Säure/Base und Oxidation/Reduktion seit langem nutzbringend verwendet. Des weiteren gibt es Begriffe, die sich enger an das Elektronenkonzept anlehnen, z. B. Elektrophilie/Nucleophilie und Donor/Acceptor.

Es sei darauf hingewiesen, daß diese korrespondierenden Begriffspaare qualitativ in Beziehung mit der Abstufung der Elektronendichte oder Elektronenladung gebracht werden können. In der Elektronen-Theorie werden das statische und das dynamische Verhalten von Molekülen durch elektronische Effekte erklärt, die ausschließlich auf der Elektronenverteilung im Molekül beruhen.

Die Ladungsverteilung in einem Molekül läßt sich bis zu einem gewissen Grad anhand des Konzepts der Elektronegativität von Atomen und chemischer Erfahrung abschätzen. Begründet, quantifiziert und abgesichert wird sie durch physikalische Messungen sowie durch quantentheoretische Berechnungen.

Die Verteilung von Elektronen oder elektrischer Ladung in einem Molekül – das Ergebnis ist von der Betrachtungsweise unabhängig – wird üblicherweise durch die Gesamtzahl (im allgemeinen keine ganze Zahl) der Elektronen eines jeden Atoms und jeder Bindung wiedergegeben. Dies war infolge der realistischen Bedeutung auch für experimentell arbeitende Chemiker akzeptabel, und sie verwendeten die Elektronendichte als ein fundamentales Konzept zur Deutung verschiedener Phänomene. Besonders bei der Planung neuer chemischer Reaktionen benutzen Forscher häufig Analogieschlüsse, wobei sich die Elektronen-Theorie als sehr fruchtbar und weitreichend erwiesen hat.

Wenn man die Größe der Elektronendichte als Kriterium heranzieht, wird die elektrostatische Anziehung und Abstoßung als Folge der Elektronenverteilung mitberücksichtigt. Es erscheint daher plausibel, daß ein elektrophiles Reagens bei einem Substratmolekül das Zentrum hoher Elektronendichte angreifen wird, ein nucleophiles Reagens hingegen das Zentrum geringer Elektronendichte. So erklärten *Wheland* und *Pauling*^[3] die Orientierung bei der Substitution von Benzol und seinen Verbindungen entsprechend diesen Vorstellungen. Analoge Interpretationen vieler anderer Reaktionen folgten.

Die Frage jedoch, warum eine der einfachen, seit langem bekannten Reaktionen, nämlich die elektrophile Substitution von Naphthalin, z. B. die Nitrierung, überwiegend 1-substituierte Derivate ergibt, war nicht so leicht zu beantworten. Die Tatsache, daß bei vielen unsubstituierten aromatischen Kohlenwasserstoffen sowohl das Elektrophil als auch das Nucleophil am gleichen Zentrum reagieren, ließ an einer Theorie der Reaktivität organischer Verbindungen, bei der allein die Elektronendichte der ausschlaggebende Faktor ist, einige Zweifel aufkommen.

[*] Prof. Dr. K. Fukui
 Department of Hydrocarbon Chemistry, Kyoto University
 Sakyo-ku, Kyoto 606 (Japan)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1982. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.