

Průmyslové využití imobilizovaných enzymů

577.152 663.15 663.18 664.162.79

Ing. JIŘÍ KUČERA, CSc., Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha

*Předneseno na VI. konferenci Racionalizace fermentačních procesů, v květnu 1983 ve Zvíkovském Podhradí***Klíčová slova:** imobilizované enzymy, využití imobilizované buňky, aminokyseliny, výroba, fruktozový sirup, glukozový sirup

První práce věnované imobilizaci některých hydrolas (proteas a amylas) a jejich využití pro hydrolýzu substrátů pocházejí již z počátku našeho století. K praktickému využití tohoto objevu však došlo až o šedesát let později, kdy byly pro průmyslové použití imobilizovaných enzymů vytvořeny technické a ekonomické podmínky. Moderní výzkum imobilizovaných enzymů mohl být zahájen až po objevu možnosti kovalentní vazby bílkovin na polysacharidové nosiče, tedy po roce 1951 [1]. Teprve rozvoj technicky využitelných nosičů, vyhovujících jak maximální účinnosti imobilizovaného enzymu tak i technickými a ekonomickými faktory podmínkám průmyslového procesu [2–7], umožnil průmyslové využití imobilizovaných enzymů. V současné době je v časopise Chemical Abstracts citováno více než šest tisíc prací věnovaných vázaným enzymům, nosičům, metodám vazby bílkovin na nosiče a dalším aspektům tohoto procesu. Jen malá část poznatků je však průmyslově využívána.

Využití imobilizovaných enzymů lze rozdělit do tří skupin, které se vzájemně liší požadavky na vlastnosti enzymu, způsobem provedení enzymové reakce a požadavky na ekonomiku procesu.

Do první skupiny patří použití imobilizovaných enzymů v lékařství. V tomto případě je základním požadavkem hygienická nezávadnost nosiče i metody vazby. Mechanické vlastnosti nosiče musí odpovídat především způsobu použití, přičemž difuze substrátu a další vlastnosti mají jen doplňkový význam. Tato oblast použití je prozatím pouze ve stadiu výzkumu, ale slibuje řadu možností, např. ve výrobě umělých orgánů (např. ledvin a jater), léčení některých forem rakoviny použitím enzymů typu asparaginasy, leucinoxidasy a jiných [8, 9].

Druhou oblastí využití imobilizovaných enzymů je jejich použití v analytické chemii pro specifické stanovení některých látek enzymovými elektrodami [10]. Této možnosti je hojně využíváno zejména pro specifické stanovení jednotlivých cukrů, např. glukosy [11], sacharosy, maltosy nebo laktosy [12, 13], bez rušivého vlivu ostatních cukrů nebo jiných redukcujících látek. Podobně je rovněž využíváno imobilizované alkoholdehydrogenasy [14] ke specifickému stanovení alkoholů. Elektrody citlivé na amonné ionty lze využít pro stanovení močoviny imobilizovanou ureasou apod. [15]. Tepelného průběhu enzymových reakcí lze využít také pro stanovení řady látek mikrokolorimetricky v přítomnosti imobilizovaných specifických enzymů [16].

Konečně třetí oblastí využití imobilizovaných enzymů, o které se zmíním podrobněji, je jejich použití pro průmyslové zpracování některých substrátů.

Nejstarším použitím vázaných enzymů v průmyslu je výroba L-aminokyselin ze syntetických racemátů [17, 18]. Syntetická výroba aminokyselin je poměrně jednoduchým procesem, nevyžadujícím na rozdíl od kvasné výroby vysoké investiční náklady a dosahující velmi dobrých výtěžků. Na překážku použití syntetických aminokyselin je ve většině případů to, že synteticky lze jednoduchou

cestou vyrobit pouze racemické aminokyseliny. Byly sice rovněž vypracovány stereospecifické syntézy některých aminokyselin, tyto postupy však většinou nejsou z průmyslového hlediska výhodné, protože proces tím ztrácí základní výhodu, tj. nízké náklady a jednoduchost. Proto bylo již před mnoha lety laboratorně využíváno vlastností některých enzymů, schopných zpracovávat pouze deriváty přirozených L-aminokyselin. Například aminoacylasa odštěpuje acetyl skupinu pouze z L-N-acetyl aminokyselin [17, 18], proteasy hydrolyzují pouze estery L-aminokyselin apod. [19, 20]. Průmyslově nebylo možno této specifčnosti enzymů využívat pro vysokou cenu aminoacylasy i ostatních enzymů tohoto typu. Imobilizací enzymů se podstatně snížily náklady na štěpení racemátů aminokyselin vyrobených synteticky. Výrobní náklady klesly natolik, že bylo možno realizovat tento proces průmyslově. Od roku 1969 je touto cestou vyráběn v Japonsku L-methionin [21] a později byl proces použit i k výrobě dalších aminokyselin. V počátku průmyslového využití bylo používáno acylasy imobilizované sorpcí na DEAE-celulose (Whatman), v současné době je pro imobilizaci používán DEAE-Sephadex A-25, který má lepší hydrodynamické vlastnosti. Separace D-N-acetyl-methioninu a L-methioninu je velice jednoduchá. Aby nevznikaly ztráty výrobou D-isomerů aminokyselin, pro které není použití, následuje po separaci L-aminokyseliny enzymová racemizace D-isomeru imobilizovanou racemasou a takto získaný roztok racemátu je dosycen syntetickým racemátem na provozní koncentraci a znovu zpracován v reaktoru s imobilizovanou acylasou. Prakticky všechny syntetický racemát je zpracován na L-aminokyselinu. Výtěžek jednoho stupně je u methioninu 80 %, a alaninu 70 %. Produktivita imobilizovaného enzymu je 0,6 objemu roztoku substrátu k objemu enzymu za hodinu. Někteří autoři považují za nevýhodu tohoto postupu využívajícího enzym imobilizovaný sorpcí to, že nelze zpracovávat substrát o koncentraci vyšší než 0,2 M, protože při vyšší koncentraci nastává eluce enzymu. Doporučují proto imobilizaci acylasy kovalentní vazbou, kdy je koncentrace substrátu limitována pouze jeho rozpustností [22, 23]. Průmyslový proces s kovalentně vázaným enzymem však nebyl dosud realizován. Náklady na imobilizaci kovalentní vazbou jsou totiž mnohem vyšší a nosič nelze jednoduchým způsobem regenerovat. Také doplňování enzymu během procesu je při imobilizaci kovalentní vazbou daleko obtížnější. Při postupu provozně používaném v Japonsku je enzym doplňován pouhým přidáváním rozpustného enzymu k roztoku substrátu. Takové doplňování je nutno provádět poměrně často, aby byla udržena konstantní produktivita reaktoru. Při tom však celková náplň enzymu v reaktoru je obměňována po těchto malých dávkách za více než jeden rok. Jako sloupceový reaktor je použita průmyslová chromatografická kolona, známá z prospektů firmy Pharmacia Uppsala. Reaktor má objem 500 l. Výhodou kolony tohoto druhu je především to, že je rozdělena do řady pater s vyrovnáním tlaku, takže se netlačuje sloupec imobi-

lizovaného enzymu a tím ani nesnižuje průtok během provozu.

Průmyslově je rovněž zavedena výroba kyseliny asparagové, citrulinu a kyseliny urokanové s použitím imobilizovaných buněk mikroorganismů [24–26]. Výchozími surovinami jsou pro výrobu kyseliny asparagové kyselina fumarová, pro výrobu citrulinu L-arginin a pro výrobu kyseliny urokanové L-histidin.

Výroba aminokyselin a jejich derivátů s použitím imobilizovaných enzymů je zavedena především v Japonsku. V Evropě a ve Spojených státech je tato výroba zaváděna teprve v posledních letech. V ČSSR byla ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací vypracována a poloprovozně ověřena metoda výroby kyseliny asparagové adicí amoniaku na fumarát s použitím imobilizovaných buněk.

V poslední době byla vypracována a poloprovozně ověřena nová metoda výroby aminokyselin s použitím imobilizovaných enzymů nebo imobilizovaných buněk, založená na stereospecifické hydrolýze α -aminonitrilů [27]. Tento postup je v oblasti organické syntézy jednodušší a také pro enzymové dokončení reakce je nutný pouze jeden enzym. α -Nitrily jsou jednostupňově převáděny enzymem nitrilhydrolasou na L-aminokyseliny odpovídající struktury. Byly získány rovněž bakteriální kmeny obsahující dostatečné množství enzymu k tomu, aby bylo možné používat přímo imobilizovaných buněk, což je ekonomicky výhodnější.

Velice významnou aplikací imobilizovaných enzymů je specifická hydrolýza G-penicilinu na aminopenicilanovou kyselinu, která je pak výchozí surovinou pro výrobu semisyntetických penicilinů [28]. Pro tuto výrobu je rovněž možno použít imobilizovaných buněk, stejně jako imobilizovaných enzymů. Postup výroby kyseliny aminopenicilanové využívající imobilizovaných buněk byl vypracován rovněž ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací a byl průmyslově realizován v n. p. Biotika. Je to první a dosud jediný technologický postup využívající imobilizovaných enzymů nebo buněk realizovaný v Československu.

Největšího uplatnění došly vázané enzymy ve škrobárenském průmyslu. Výroba fruktosového sirupu dosahuje jen ve Spojených státech celkového objemu 3,5 miliónu tun a trvale stoupá. Rozvoj výroby fruktosového sirupu v Evropě byl zahájen o něco později, ale i zde výroba přesahuje již dnes 2 milióny tun ročně a dále stoupá. Předpokládá se, že do konce osmdesátých let bude fruktosový sirup krýt asi polovinu spotřeby cukru, hlavně v průmyslových odběratelích. Isomerizace glukosy na fruktosu v průmyslovém měřítku byla umožněna teprve použitím imobilizované glukosoisomerasy, protože všechny ostatní způsoby by isomerizace, včetně použití nativního enzymu, byly ekonomicky nevýhodné. Pro tento proces se používá všech způsobů imobilizace enzymu, tj. kovalentní vazbou, sorpcí, zabudováním apod., stejně jako imobilizace buněk s vysokým obsahem enzymu [29–33]. Rovněž používané enzymové reaktory jsou všech typů [34, 35]. Průmyslově se nejlépe osvědčilo použití imobilizovaných buněk mikroorganismu produkujícího intracelulární glukosoisomerasu. Tento způsob je proto v současné době používán nejčastěji. Z enzymových reaktorů je nejčastěji průmyslově pro isomerizaci glukosy na fruktosu používán sloupcový reaktor. Je-li používán imobilizovaný enzym, je zpravidla imobilizován kovalentní vazbou na mycelium. Takto vázaný enzym je rovněž dodáván komerčně dánskou firmou NOVO Industrii pod obchodním označením Sweetszyme. Glukosový sirup vyrobený ze škrobu působením α -amylasy a glukosamylasy je isomerizován při teplotě 60 °C (sníží se tím nebezpečí kontaminace), pH 8,0 a koncentraci glukosy 40 %. Vyrobený fruktosový sirup obsahuje zpra-

vidla 42–44 % fruktosy a má sladivost shodnou se sacharosou. Speciálními postupy lze dosáhnout konverze až 70 % fruktosy se sladivostí sirupu přibližně dvojnásobnou v porovnání se sacharosou. Tento postup je však nákladnější a všeobecně je považováno za výhodnější fruktosu z produktu izolovat a glukosový sirup znovu vrátet na isomerizaci. Tak lze výtěžek fruktosy zvýšit až na 80 % (v přepočtu na surovinu).

Dlouhodobě je značná pozornost věnována použití vázané glukosamylasy pro výrobu glukosy, která je výhodná zejména při dalším zpracování produktu na fruktosu. Tento postup je jen o málo levnější než dosud používaný způsob hydrolýzy ztekuceného škrobu nativní glukosamylasou a malé snížení nákladů neospravedlňuje přestavbu stávajících závodů. Proto až dosud pracuje pouze jediný závod na výrobu glukosy ze škrobu s použitím vázané glukosamylasy. Tento závod byl postaven ve Spojených státech a využívá glukosamylasu vázanou kovalentně na porézní sklo. Velice drahý nosič je regenerován vyžháním a znovu používán pro vazbu enzymu. Velice nízká cena nativní glukosamylasy způsobuje, že postup není více rozšířen. Uvedený závod produkuje 250 kg (přesněji 500 lb) glukosy denně. Významný je však tento závod z jiného důvodu. Je to zcela automatizovaný proces, kde právě automatizace přispívá k tomu, že výrobní náklady jsou zde podstatně nižší než při klasické výrobě s rozpustnou glukosamylasou, kde tak vysokého stupně automatizace nelze dosáhnout. Již příprava škrobového mléka pro ztekucení je vybavena automatickým nastavením koncentrace a pH. Koncentrace je nastavována podle měření zákalu a současně je výsledek registrován pomocí mikropočítače s tiskárnou. Proces ztekucení je sledován podle redoxpotenciálu a automaticky zastaven v optimu zjištěném v poloprovozním výzkumu v počátku sedmdesátých let. Po ztekucení je hydrolyzát zahřát v průtokovém tlakovém ohřeváči krátkodobě na 140 °C, čímž se denaturuje α -amylasa a současně steriluje hydrolyzát. Doba ohřevu je regulována rychlostí průtoku opět podle programu zaznamenaného v řídicí jednotce. Po té je automaticky upraveno pH na hodnotu optimální pro glukosamylasu, teplota je upravena na provozní teplotu reaktoru (55 °C) a ztekucený škrob je veden na sloupcový reaktor s imobilizovanou glukosamylasou. Doba zdržení v reaktoru je průměrně 1,5 h a je řízena podle aktivity enzymu. Ta v průběhu procesu postupně klesá inaktivací enzymu, a proto je za reaktorem umístěna enzymová elektroda pro stanovení glukosy a podle jejího měření programově regulována rychlost průtoku reaktorem. Pro případ prudkého snížení koncentrace glukosy na výstupu z reaktoru (havarijní situace) je produkt automaticky vrácen na přítok reaktoru a signální zařízení na to upozorní obsluhu. Celý proces je řízen mikropočítačem, jehož současná cena je ve Spojených státech méně než 1000 US \$ [36].

Jako modernizace procesu výroby fruktosového sirupu bylo v poslední době navrženo a poloprovozně ověřeno použití imobilizovaného dvouenzymového katalyzátoru glukosamylasa — glukosoisomerasa. Tento postup dovo-luje především dosáhnout prakticky kvantitativního výtěžku glukosy ze škrobu tím, že je trvale odčerpáván produkt. Značnou překážkou však je rozdílné optimální pH obou enzymů [glukosoisomerasa pH 8,0; glukosamylasa pH 4, 5], což vede k nutnosti pracovat s oběma enzymy mimo oblast optimálního pH [prakticky bylo použito pH 6,0]. Autoři tohoto projektu se domnívají, že vhodnou modifikací glukosamylasy by bylo možno změnit optimální pH tohoto enzymu, jak to bylo již laboratorně prokázáno u mnoha enzymů [37]. Tento proces představuje především perspektivní vývojovou fázi průmyslové enzymologie, tj. změny vlastností enzymů modifikací jejich struktury a používání současně imobilizovaných

enzymů pracujících v sérii. Práce tohoto druhu jsou prozatím omezeny pouze na laboratorní pokusy, při tom lze však počítat s jejich výhledovým průmyslovým využitím právě při provádění složitějších enzymových reakcí.

V tomto stručném přehledu jsem uvedl jen ty nejvýznamnější příklady průmyslových technologií využívajících vázané enzymy. Bylo by možno uvést řadu dalších příkladů, třeba delaktosaci mléka a syrovátky [38], transformace steroidů [39], výrobu aminokyselin značených radioaktivním dusíkem [40], výrobu fosforečných esterů cukrů apod. Žádná z těchto metod však prozatím nedosahuje průmyslového rozsahu předcházejících.

Literatura

- [1] CAMPBELL D. H., LUESCHER E., LERMAN S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 1951, s. 575
- [2] PORATH J., AXÉN, R., ERNBACK S.: Nature 215, 1967, s. 1491
- [3] CHEN L. F., TSAO G. T.: Biotechnol. Bioeng. 19, 1977, s. 1463
- [4] WEETALL H. H., FILBERT A. M.: Methods Enzymol. 34, 1976, s. 59
- [5] BENOIT M. R., KOHLER J.: Biotechnol. Bioeng. 17, 1975, s. 1617
- [6] BROTHERTON J. E., EMERY A., RODWELL V. M.: Biotechnol. Bioeng. 18, 1976, s. 527
- [7] ČOUPEK J., GEMEINER P., JIRKŮ V., KÁLAL J., KUBÁNEK V., KUNIAK L., PEŠKA J., REXOVÁ L., ŠTAMBERG J., ŠVEC F., TURKOVÁ J., VERUOVIC B., ZEMEK J.: Chem. Listy 75, 1981, s. 512
- [8] KO R. Y. C., HWRSH L. S.: J. Biomed. Mat. Res. 10, 1976, s. 249
- [9] CHANG T. M. S.: Canad. J. Physiol. Pharmacol. 44, 1966, s. 115
- [10] GOUGH D. A., ANDRADE J. D.: Science 180, 1973, s. 380
- [11] MELL L. D., MALOY J. T.: Anal. Chem. 48, 1976, s. 1597
- [12] SATOH I., KARUBE I., SUZUKI S.: Biotechnol. Bioeng. 18, 1976, s. 269
- [13] GOUGH D. A., ANDRADE J. D.: Science 180, 1973, s. 380
- [14] BOURDILLON C., BONRGEOS J. P., THOMAS D.: Biotechnol. Bioeng. 21, 1979, s. 1877
- [15] GRAY D. N., KEYES M. H., WATSON B.: Anal. Chem. 49, 1977, s. 1067A
- [16] CANNING L. M., CARR P. W.: Anal. Lett. 8, 1975, s. 359
- [17] TOSA T., MORI T., CHIBATA I.: J. Ferment. Technol. 49, 1971, s. 522
- [18] BARTH T., MAŠKOVÁ H.: Coll. Czech. Chem. Commun. 36, 1971, s. 2398
- [19] MONSAN P., DURANG G.: Biochim. Biophys. Acta 523, 1978, s. 477
- [20] HALWACHS W., WANDREY C., SCHÜGERL K.: Biotechnol. Bioeng. 19, 1977, s. 1667
- [21] TOSA T., MORI T., FUSE N., CHIBATA I.: Biotechnol. Bioeng. 9, 1967, s. 603
- [22] CHIBATA I., TOSA T., SATO T., MORI T.: Methods Enzymol. 44, 1976, s. 746
- [23] VEINBWARGA I., ČUCHRAJ E. S., POLTORAK O. M., ARENS A.: Vestn. Mosk. Univ. Ser. 2. Chim. 22, 1981, s. 550
- [24] CHIBATA I., TOSA T., SATO T.: Methods Enzymol. 44, 1976, s. 739
- [25] YAMAMOTO K., SATO T., TOSA T., CHIBATA I.: Biotechnol. Bioeng. 16, 1974, s. 1589
- [26] JACK T. R., ZAJIC J. E.: Biotechnol. Bioeng. 19, 1977, s. 631
- [27] JALLAGEAS J. C., ARNAUD A., GALZY P.: Patent USA č. 4,366,250 (28. 10. 82); Enzyme Microb. Technol. 5, 1983, s. 235
- [28] CARLEYSMITH S. W., LILLY M. D.: Biotechnol. Bioeng. 21, 1979, s. 1057
- [29] BUCKE C.: Topics Enzyme Ferment. Biotechnol. 1, 1977, s. 147
- [30] SYNOWIECKI J., SIKORSKI Z. E., NACZK M., PIOTRZKOWSKA H.: Biotechnol. Bioeng. 24, 1982, s. 1871
- [31] SCHNYDER B. J.: Starch 26, 1974, s. 469
- [32] KASUMI T., TSUJI M., TSUMURA N.: Shokuhin Sogo Kenkyusho Hokoku 37, 1980, s. 109; Chem. Abstr. 96, 1980, s. 138884f
- [33] VIETH W. R., WANG S. S., SAINI R.: Biotechnol. Bioeng. 15, 1973, s. 565
- [34] WALON R. G. P., STOUFFS R. H. M.: Eur. pat. appl. 36, 662; Chem. Abstr. 96, s. 81901b
- [35] KORUS R. A., OLSON A. C.: J. Food Sci. 42, 1977, s. 258
- [36] LEE D. D., LEE Y. Y., REILLY P. J., COLLINS E. V. Jr., TSAO G. T.: Biotechnol. Bioeng. 18, 1976, s. 253
- [37] LEE G. K.: Proc. Annu Biochem. Symp. 5, 1975, s. 32
- [38] FINOCCHIARO T., RICHARDSON T., OLSON N. F.: J. Dairy Sci. 63, 1980, s. 215
- [39] YAMANE T., NAKOTANI H., SADA E., OMATA T., TANAKA A., FUKUI A.: Biotechnol. Bioeng. 21, 1979, s. 2133
- [40] COHEN M. B., SPOLTER L., CHANG C. C., BOBINET D. D.: J. Nucl. Med. 15, 1974, s. 1192

Kučera, J.: Průmyslové využití imobilizovaných enzymů. Kvas. prům. 30, 1984, č. 3, s. 64–67.

Využití imobilizovaných enzymů je možno rozdělit do tří skupin. V první skupině jsou zařazeny aplikace v medicíně, kde je hlavní důraz kladen na hygienickou nezávadnost nosiče i metody vazby. Druhou skupinu tvoří aplikace v analytické chemii, kde je hlavním požadavkem přesnost a rychlá odezva a proto je rozhodujícím faktorem difuze substrátu k aktivnímu místu enzymu. Konečně třetí skupinu tvoří průmyslová aplikace při specifických modifikacích různých substrátů. V tomto případě je důraz kladen na ekonomické faktory.

Jsou popsány aplikace imobilizovaných enzymů pro stereospecifickou syntézu aminokyselin, výrobu kyseliny 6-aminopenicilanové, výrobu fruktosových sirupů, glukosových sirupů a některé další aplikace.

Кучера, И.: Промышленное использование иммобилизованных энзимов. Квас. прум. 30, 1984, № 3, стр. 64–67.

Использование иммобилизованных энзимов можно разделить на три группы. К первой группе относится применение в медицине, где подчеркивается главным образом безвредность носителя и метода связи. Во вторую группу входят типы применения в аналитической химии, где главным требованием является точность и быстрый ответ, и поэтому решающим фактором является диффузия субстрата к активному месту энзима. Наконец, третью группу составляют промышленные виды применения при специфических видоизменениях разных субстратов. В этом случае главное внимание уделено экономическим факторам.

Описано применение иммобилизованных энзимов для стереоспецифического синтеза аминокислот, производства 6-аминопеницилановой кислоты, производства фруктозных и глюкозных сиропов и некоторые другие типы применения.

Kučera, J.: Industrial Applications of Immobilized Enzymes. Kvas. prům. 30, 1984, № 3, p. 64–67.

The application of immobilized enzymes can be divided into three groups. First group comprises medical applications. Here both beads and an immobilization technique must not have toxic effect. Second group comprises applications in analytical chemistry. The main requirement is given on the accuracy and the fast response. Therefore, the significant factor is a diffusion of substrate to the active center of the enzyme. Into third group belongs industrial applications of immobilized enzymes for a conversion of various substrates. Here economic factors are emphasized. The applications for stereospecific synthesis of amino acids, production of 6-aminopenicillanic acid, fructose syrup, glucose syrup are described.

Kučera, J.: Industrielle Ausnützung immobilisierter Enzyme. Kvas. prům. 30, 1984, Nr. 3, S. 64–67.

Die Ausnützung immobilisierter Enzyme wird in drei Applikationsgebiete eingeteilt. Zu dem ersten Gebiet gehören die Applikationen in der Medizin, wo eine besondere Bedeutung der hygienischen Einwandfreiheit des Trägers sowie auch der Bindungsmethode beigelegt wird. Das zweite Gebiet bilden die Applikationen der immobilisierten Enzyme in der analytischen Chemie — hier sind die Hauptanforderungen Genauigkeit und schnelle Reaktion und deshalb wird als maßgebender Faktor die Diffusion des Substrats zu der aktiven Stelle des Enzyms angesehen. Zu der dritten Gruppe gehören die industri-

ellen Applikationen bei spezifischen Modifikationen verschiedener Substrate. Bei diesen Applikationen sind die ökonomischen Faktoren ausschlaggebend.

In dem Artikel werden die folgenden Applikationen der

immobilisierten Enzyme beschrieben: für die stereospezifische Synthese von Aminosäuren, bei der Produktion der 6-Aminopenicillinsäure, bei der Fruktosesirupherstellung und einige weiteren.