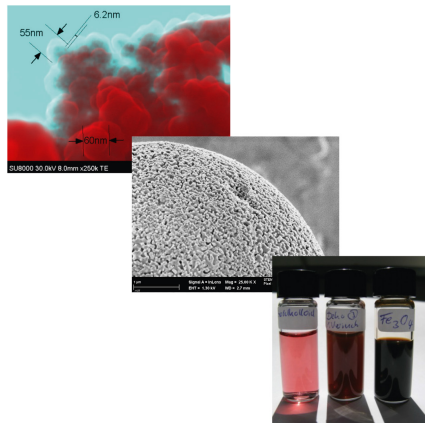




Aline Pasteur (Autor)
Einsatz magnetisierbarer Partikelsysteme in der Bioverfahrenstechnik

Aline Pasteur

**Einsatz magnetisierbarer Partikelsysteme
in der Bioverfahrenstechnik**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6874>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1 Einleitung und Stand der Technik

Die magnetischen Nanopartikel haben in den letzten Jahren hohes Interesse in der Forschung geweckt. Die Anwendungsfelder in den verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen sind vielfältig und die Eigenschaften dieser Nanopartikel eröffnen erstaunliche Möglichkeiten für Technologien an der Schnittstelle zwischen Chemie, Physik und Biologie.^[1] Besonders im Bereich der Medizin wird den magnetischen Nanopartikeln ein hohes Potential zugeschrieben. Die Anwendungen reichen von bildgebenden Verfahren, z.B. MRI Magnetresonanz Imaging^[2,3], über die Krebstherapie mit Hilfe von Drug Delivery Systemen^[4], der magnetischen Hyperthermie^[5] oder Bindung an freien Krebszellen und deren Abtransport^[6] bis hin zum Biosensing bzw. der Bioanalytik^[7]. Intensiv diskutiert wird dabei zumeist die Toxizität der Nanopartikel, da hier die Langzeitfolgen noch nicht klar sind.^[8] Dennoch sind diese Technologien in der Entwicklung weit fortgeschritten. Einen guten Überblick über alle Anwendungen und eine Zusammenfassung aktueller klinischer Studien liefert Harivardhan et al..^[9]

Weitere Einsatzfelder außerhalb der Biomedizin, die bereits kommerziell genutzt werden, sind z.B. Speichermedien^[10,11,12], die eine sehr hohe Speicherdichte aufweisen (10 Tbit/inch²) oder in Form von Ferrofluiden als magnetische Kühlmittel, z.B. in Lautsprechern^[13,14]. Dies sind nur einige Beispiele aus den verschiedenen Disziplinen. In der Verfahrenstechnik ist die Verwendung der magnetischen Nanopartikel nur wenig beschrieben. In großtechnischen Prozessen sind kaum magnetische Partikel zu finden; eines der wenigen Beispiele sind Orica MIEX-Partikel, die zur Reinigung von Abwasser genutzt werden.^[15] Die magnetischen Nanopartikel sind hier in einer Harzmatrix eingebettet und auf der Partikeloberfläche befinden sich Ionentauscher-Gruppen. Weitere Anbieter wie Chemagen oder Chemicell bieten Magnetpartikel in kleinen Chargen mit verschiedensten Oberflächenfunktionalitäten an, da deren Einsatz meist nur im Labormaßstab stattfindet.^[89] Magnetseparatoren wie Magnet-Trommelseparatoren, Hochgradienten-Magnetseparatoren, Wirbelstromseparatoren oder magnetisch stabilisierte Wirbelschichten sind allerdings bereits in Großanlagen weit verbreitet und finden zumeist Anwendung in der Erzaufbereitung, Recyclingindustrie oder Petrochemie.^[16] Für die Anwendung im Bereich der Bioverfahrenstechnik wurden bereits Hochgradienten-Magnetseparatoren entwickelt und patentiert,^[17] die allerdings meist im Labormaßstab zur Proteinaufarbeitung eingesetzt werden. Andere Anwendungsfelder werden dabei vernachlässigt.



Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei Anwendungsbeispielen magnetischer Partikelsysteme aus den Bereichen Hydrolyse, Katalyse und dem Downstream Processing und soll das breit gefächerte Potential der Magnettechnologie im Bereich der Bioverfahrenstechnik aufzeigen.

Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe für die industrielle Produktion von Grund- und Feinchemikalien sowie die Gewinnung von Biokraftstoffen ist Teil der weißen Biotechnologie. Der erste Schritt zur Nutzung dieser Rohstoffe ist die Vorbehandlung zur Gewinnung von fermentierbaren Zuckern. Kapitel 2 beschäftigt sich mit einer möglichen Vorbehandlungsmethode der enzymatischen Hydrolyse des nachwachsenden Rohstoffes Cellulose zu Glucose. Als Enzym wird eine kommerzielle Cellulase eingesetzt die auf einen magnetischen Träger gebunden wird. Als Träger werden superparamagnetische Eisenoxidpartikel mit einer Goldschale verwendet. In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass durch die Immobilisierung von Enzymen auf makroskopischen Trägern (heterogene Katalyse) die Aktivität im Vergleich zu gelösten Enzymen (homogene Katalyse) deutlich herabgesetzt ist. Gründe dafür sind zum einen der konformative Stress, dem das Protein ausgesetzt ist, zum anderen die Einschränkung der Beweglichkeit des Proteins in Lösung. Dieses Modellsystem der enzymatischen Hydrolyse dient der Untersuchung des Aktivitätsverlustes von Enzymen nach der Immobilisierung auf Nanopartikeln. Die kleineren Durchmesser der Nanopartikel könnten für eine höhere Beweglichkeit des Träger-Protein-Komplexes sorgen und dennoch die Rückgewinnung der Partikel ermöglichen. Somit würde diese Technologie die Schnittstelle zwischen homogener und heterogener Katalyse bilden. Desweiteren lassen sich anhand dieses Beispiels zwei Eigenschaften (Superparamagnetismus und Oberflächenplasmonresonanz) von Nanopartikeln demonstrieren, die zur Charakterisierung der Partikel genutzt werden können. Besonders die magnetische Komponente erleichtert die Rückgewinnung der Enzyme erheblich, sodass diese auch mehrfach in Hydrolysen eingesetzt werden können.

Die durch Hydrolyse eines Faserstoffes gewonnene Glucose kann nun im nächsten Schritt in Fermentationen zu einem Wertstoff verarbeitet werden, wie z.B. Bernsteinsäure, Bioethanol usw. Oder sie wird, wie in Kapitel 3 beschrieben, in der katalytischen Umsetzung zu Gluconsäure verwendet, welche wiederum weit verbreitet in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird. Großtechnisch wird die Gewinnung von Gluconsäure fermentativ durchgeführt. Der Einsatz von katalytisch aktiven Goldnanopartikeln stellt hierbei eine neue und vielversprechende Alternative dar. Die in Kapitel 3 vorgestellten Arbeiten übertragen die aus der Literatur bekannte Technologie der Trägerkatalysatoren auf magnetische Träger, wodurch die bisher im Batch-Prozess eingesetzten Trägerkatalysatoren in einen halb-



kontinuierlichen Prozess überführt werden können. Desweiteren wird in Kapitel 3 gezeigt, dass Nanopartikel oftmals vom Feststoff unterschiedliche Eigenschaften besitzen, so ist z.B. bei kleinen Partikeldurchmessern der Schmelzpunkt deutlich reduziert und das Gold im Nanometermaßstab katalytisch aktiv. Durch den Einsatz der Katalysatoren, die hochselektiv sind, werden die Aufarbeitungsschritte des Produktes zu einem einzigen Schritt reduziert. Die zumeist sehr aufwendige Aufarbeitung der Produkte aus der Reaktionslösung ist eine große Herausforderung in der Bioverfahrenstechnik und es wird versucht diese Prozessschritte so gering wie möglich zu halten. Diese Thematik wird in Kapitel 4 erneut aufgegriffen.

In vielen biotechnologischen Prozessen zur Herstellung von Pharmazeutika, Lebensmitteln oder Feinchemikalien stellt die Aufarbeitung des Produktes, das sogenannte Downstream Processing, einen wichtigen Prozessschritt dar. Kapitel 4 befasst sich mit der Aufarbeitung eines Antibiotikums mittels selektiver magnetischer Adsorbermaterialien. Die Arbeiten wurden von der DBU im Rahmen des Verbunds zur nachhaltigen (Bio)-Katalyse und integrierten Bioprozessentwicklung (ChemBioTec) gefördert. Als magnetische Komponente werden Eisenoxidnanopartikel, eingebettet in einer Silicat-Matrix, verwendet. Die hohe Selektivität der Partikeloberfläche soll durch polyvalente Wechselwirkung mit verschiedenen funktionellen Gruppen erreicht werden. Das Adsorptionsverhalten soll mit kommerziell erhältlichen Systemen verglichen und so die Vorteile gegenüber unspezifischer konventioneller Adsorbersysteme herausgearbeitet werden. Im Rahmen dieses Kapitels wird darüber hinaus auch die Integration der Aufarbeitung mittels selektiver Magnetpartikel in einem Fermentationsprozess diskutiert. Die Abtrennung der magnetischen Adsorber soll mit einem Hochgradienten-Magnetseparator erfolgen, der für biotechnologische Anwendungen weiter optimiert wird. Die Optimierung des HGMS erfolgt anhand von Separationsversuchen und Simulationen mit der Software COMSOL Multiphysics.

In einem abschließenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den drei verschiedenen Anwendungsfeldern erneut kurz zusammengefasst und diese im Hinblick auf das Potenzial für eine großtechnische Anwendung beurteilt.





2 Enzymatische Hydrolyse von Cellulose

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Gewinnung von Ethanol aus nachwachsenden Rohstoffen ist in aller Munde. So ist aktuell im italienischen Crescentino in der Region Piemont die weltweit erste Raffinerie für Biokraftstoffe der zweiten Generation, sprich der Gewinnung von Bioethanol aus Cellulose entstanden.^[18] Die Verzuckerung der Cellulosefasern zu fermentierbaren Zuckern erfolgt mit Enzymen der Firma Novozymes. Damit diese Prozesse wirtschaftlich sind, sind die Kosten für die Enzyme und Rohstoffe entscheidend und müssen so gering wie möglich gehalten werden. Laut dem Betreiber der Anlage Ghisolfi ist Biokraftstoff der zweiten Generation wettbewerbsfähig; allerdings gilt es auch hier die Prozesse zu optimieren und Kosten zu senken.

Eine Möglichkeit die Kosten zu senken wäre, die Enzyme in mehreren Hydrolysen einzusetzen; denn je nachdem welche Katalysatoren in einem Prozess eingesetzt werden, kann deren Rückgewinnung aus einer Reaktionslösung eine erhebliche Kostenersparnis sein. Dies gilt prinzipiell für alle katalytischen Prozesse. Durch die Bindung der Enzyme auf einem festen Träger wird dies ermöglicht, führt aber zu einem zusätzlichen Prozessschritt der Abtrennung. Der Einsatz von magnetischen Partikeln erleichtert hierbei im Vergleich zu herkömmlichen Trennverfahren wie Zentrifugation oder Filtration erheblich die Rückgewinnung. Bei der Immobilisierung von Enzymen auf makroskopischen Trägern kommt es allerdings zur Abnahme der Enzymaktivität. Bei schwer zugänglichen Substraten wie z.B. der Cellulose-Faser, ist diese Abnahme noch sehr viel gravierender und die Enzymaktivität beträgt nur noch ein Bruchteil derer nativer Cellulase. Grund hierfür sind zum einen Konformationsänderungen der Proteinstruktur durch die Bindung auf der Trägeroberfläche; aber auch die Einschränkung der Beweglichkeit der Enzyme reduziert die Enzymaktivität. Durch die Immobilisierung der Katalysatoren auf nanoskaligen Trägermaterialien soll der Schnittpunkt zwischen homogener und heterogener Katalyse untersucht und gezeigt werden, ob und welche Vorteile die Anwendung von Nanopartikeln dabei mit sich bringt. Die geringen Durchmesser der Nanopartikel von < 150 nm erschweren deren Rückgewinnung aus der Reaktionslösung; durch die magnetische Komponente, wird die Rückgewinnung deutlich erleichtert. Als Modellsystem dient die bereits erwähnte Hydrolyse von Cellulose durch das Enzym Cellulase, da dies auch am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik in verschiedenen Verbundprojekten Anwendung findet.^[19,20] Die verwendeten magnetischen Nanopartikel



wurden in einer vorgelagerten Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysik und medizinische Physik synthetisiert, charakterisiert und auch erste Immobilisierungsversuche mit Alkanthiolen durchgeführt. Einige dieser Ergebnisse werden für ein besseres Verständnis der Vorgänge bei der Enzymimmobilisierung gezeigt und mit der entsprechenden Literaturstelle markiert.

2.2 Theoretische Grundlagen

2.2.1 Hydrolyse von Cellulose

Cellulose ist der Hauptbestandteil von Pflanzenzellwänden und ist die meist verbreitetste organische Verbindung auf der Erde.^[21] Sie ist ein Polysaccharid bestehend aus mehreren hundert bis tausend linearen Ketten aus β -1,4 glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Obwohl chemisch recht einfach aufgebaut, ist die Cellulose physikalisch sehr komplex, da sie aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen sowohl größere kristalline Strukturen als auch amorphe Regionen beinhaltet. Für die effiziente Hydrolyse der Cellulose werden verschiedene Cellulasen benötigt, die als individuelle Enzyme wirken oder in einem Multienzymkomplex dem sog. Cellulosom zusammengefasst sind.^[21,22] Die individuell wirkenden Enzyme werden von vielen Pilzen wie *Trichoderma reesei* produziert. Die drei Hauptenzyme dieser Hydrolyse sind Endoglucanasen, Exoglucanasen (in erste Linie Cellobiohydrolasen) und β -Glucosidasen, welche in Synergie zusammenarbeiten.^[21]

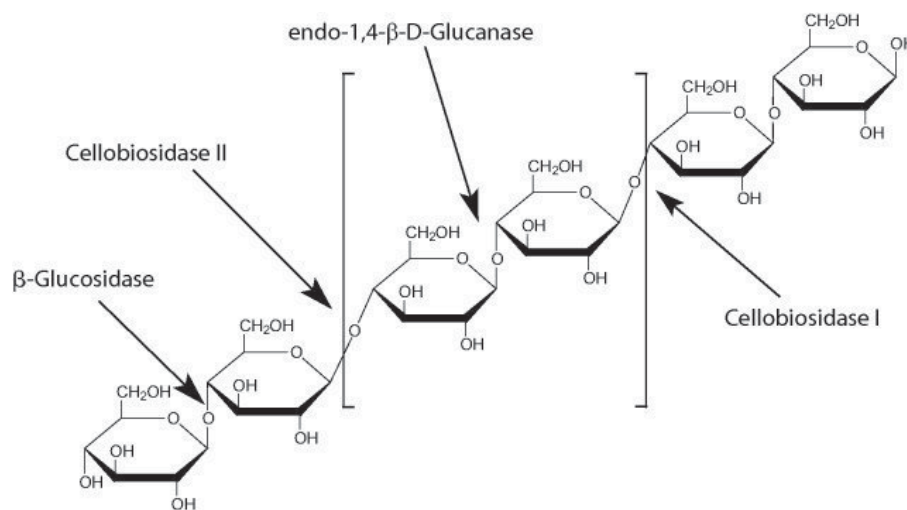


Abb. 1: Polysaccharidkette mit Angriffspunkten der verschiedenen Cellulasen von *Trichoderma reesei*^[23]

Endoglucanasen spalten die glycosidischen Bindungen in den amorphen Bereichen der Cellulosefaser zufällig, wodurch kürzere Celluloseketten entstehen, die wiederum für den Angriff von Exoglucanasen zugänglich sind. Bei den Cellobiohydrolasen unterscheidet man zwischen den Enzymen die vom reduzierenden (Cellobiosidase I) und denen die vom nichtreduzierenden Kettenende (Cellobiosidase II) angreifen.^[24] Diese Enzymklasse macht etwa 80 % der cellolytischen Enzyme von *Trichoderma reesei* aus und ist auch in der Lage in den kristallinen Bereichen der Cellulose wirken zu können.^[25] Beide Enzyme setzen das

Dimer Cellobiose frei, welches dann von β -Glucosidasen zu Glucose gespalten wird.^[26] Die verschiedenen Angriffsstellen sind in Abb. 1 zusammengefasst.

Die meisten Cellulasen von *Trichoderma reesei* besitzen eine große katalytische Domäne und eine kleinere Cellulose-bindende Domäne, die durch ein Linker-Peptid miteinander verbunden sind.^[25] Die katalytische Spaltung der glycosidischen Bindung wird in zwei Mechanismen aufgeteilt, welche in Abb. 2 dargestellt sind.^[27] Es handelt sich in beiden Fällen um eine Säure-Base-Katalyse, die durch zwei im aktiven Zentrum befindliche katalytisch aktive Carboxylgruppen gesteuert werden. Dies sind in erster Linie Aspartat- oder Glutamatreste.

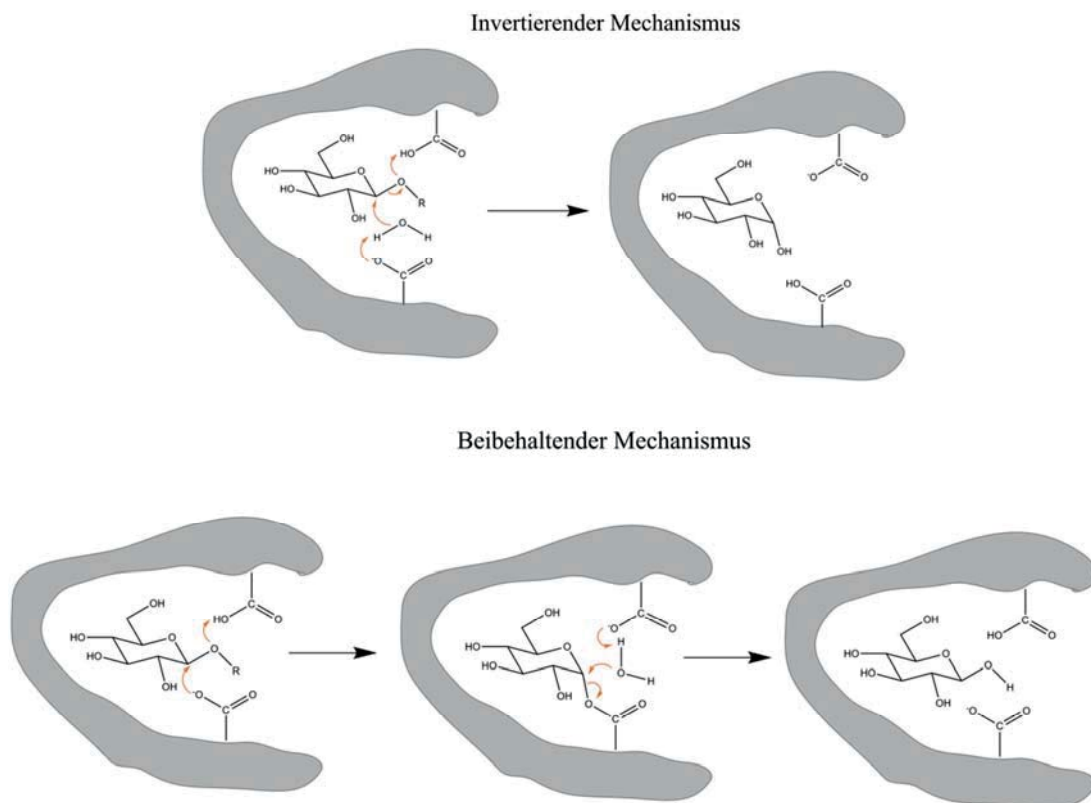


Abb. 2: Mechanismus der Substrathydrolyse unter Inversion der Konfiguration des Substrats und unter Retention der Konfiguration. Die Abbildung ist McCarter et al.^[27] nachempfunden.

Die Form des aktiven Zentrums kann für Endoglucanasen eine Rinnenform annehmen^[28], die es dem Enzym ermöglicht, in der Mitte der Polysaccharidkette optimal anzugreifen. Für Exoglucanasen zeigt sich das aktive Zentrum in einer Tunnelform^[29], wodurch ein Angriff der Cellulosefaser nur am Ende der Kette und nach Einfädeln in das katalytische Zentrum möglich ist. Abb. 3 zeigt Proteinformen der jeweiligen Enzymklassen.

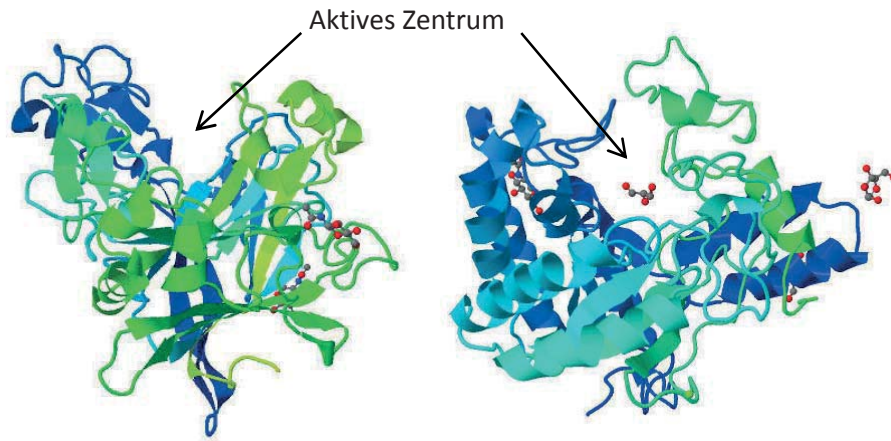


Abb. 3: Proteinstruktur der aktiven Zentren verschiedener Cellulasen. Links eine Endoglucanase mit einer Rinnenform^[28] und rechts eine Exoglucanase mit Tunnelform^[29]. Die Abbildungen wurden der Proteindatenbank entnommen.

Eine der effizientesten und am besten charakterisierten cellulolytischen Pilze ist *Trichoderma reesei*. Die große Menge und Diversität der von ihm produzierten Cellulasen öffnet ein weites Feld an Anwendungen für dessen Enzympräparate, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Sie werden in verschiedenen Feldern der Biotechnologie einschließlich der Biokonversion erneuerbarer Rohstoffe zu Biokraftstoffen^[30] und Feinchemikalien^[31]; in der Textilindustrie zur Steigerung der Qualität von Baumwolle und Leinenartikeln^[32] sowie in der Lebensmittel-^[33] und Papierindustrie^[34] eingesetzt.

Die Vielseitigkeit der Anwendungen dieser Enzyme macht die Cellulasen so interessant und es wird fortwährend nach Möglichkeiten der Verbesserung solcher enzymatischer Prozesse gesucht. Neueste Fortschritte in der Genomic, Proteomic und der Bioinformatik lieferten Zugang zu einer enormen Informationsbasis, um die Wahl des geeigneten Mikroorganismus und geeigneter Enzyme für die Biokonversion zu erleichtern. Ein Lösungsansatz ist die Steigerung der Enzymaktivität durch genetische Variation der Aminosäuren des katalytischen Zentrums^[35] und der substratbindenden Domäne.^[36] Zusätzlich haben die Entdeckung und Entwicklung von geeigneten Kultivierungsstrategien und Organismen zur Überexpression für die Enzymproduktion bereits die Kosten der Cellulaseproduktion deutlich verringert. Wie sich das auf die Gesamtprozesskosten auswirkt ist beispielhaft der Abb. 4 zur Herstellung von Ethanol aus Cellulose zwischen 1999 und 2005 zu entnehmen.^[37] Trotz dieser Anstrengungen ist das eingesetzte Enzym weiterhin ein großer Kostenfaktor, der in vielen Prozessen bis zu 50 % der Kosten ausmacht.^[34] Eine Bindung der Enzyme auf einem festen Trägermaterial ermöglicht eine Rückgewinnung der Katalysatoren aus der Reaktionslösung und somit den

wiederholten Einsatz in dem Prozess. Vor- und Nachteile dieser Methode werden im folgenden Kapitel diskutiert.

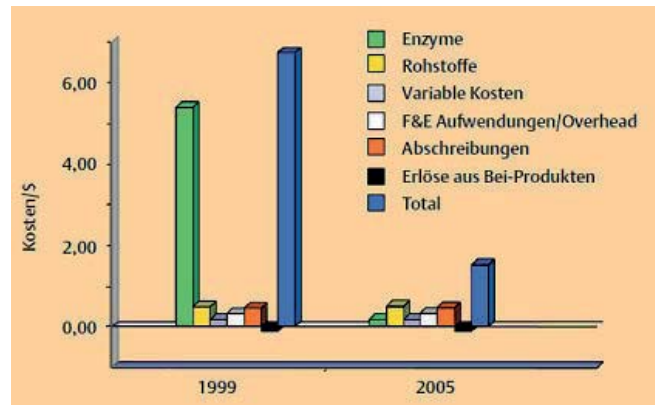


Abb. 4: Aufstellung der Kostenanteile bei der Produktion von Ethanol aus Cellulose zwischen 1999 und 2005.^[37]



2.2.2 Immobilisierte Biokatalysatoren

Die Anwendungsfelder für Biokatalysatoren sind vielfältig und breit gefächert, wie es zuvor am Beispiel der Cellulase diskutiert wurde. Die Verwendung von Enzymen in chemischen Prozessen ermöglicht hohe Aktivität, Selektivität und Spezifität in komplexen chemischen Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen.^[38] Daher ist das Engineering von Enzymen für industrielle Reaktoren ein großes aktuelles Forschungsgebiet. Allerdings sind die industriellen Anwendungen durch Instabilität der Enzyme und vor allem der Schwierigkeit der Rückgewinnung und Wiederverwendung der Enzyme in den Prozessen geprägt. Die Immobilisierung von Enzymen bietet hierbei eine mögliche Lösung dieser Probleme.

Die Definition bezeichnet Biokatalysatoren als immobilisiert, wenn sie durch chemische oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt worden sind.^[39, 40] Die Vorteile einer Immobilisierung sind einerseits eine einfache Separation der Enzyme aus der Reaktionslösung, was die Proteinkontaminationen des Produktes minimiert und somit den Aufreinigungsaufwand des Produktes verringert, andererseits kann durch die Wiederverwendbarkeit der Enzyme eine Kosteneinsparung erzielt werden, was im Hinblick auf die Konkurrenzfähigkeit enzymkatalysierter Prozesse einen wichtigen Faktor darstellt. Zusätzlich zur einfachen Handhabung und Wiederverwendbarkeit der Enzympräparate nach Immobilisierung wird auch die Lagerung vereinfacht und die Enzymstabilität gegenüber Hitzedenaturierung und anderer extremer Umgebungsbedingungen gesteigert;^[41] dies gilt besonders bei kovalent gebundenen Enzymen. Nachteile sind die zusätzlichen Kosten, die durch den Immobilisierungsprozess entstehen. Hierbei sollte besonders abgewogen werden, ob es sinnvoll ist, das vorliegende Enzym zu immobilisieren, da nicht jedes Enzym immobilisiert werden kann, weil es durch Immobilisierung von Proteinen zu erheblichen Aktivitätsverlusten kommt. Des Weiteren kann es bei zu großen Immobilisaten durch Diffusionslimitierung von Substrat und Produkt zu Problemen des Stofftransportes kommen. Demnach sollte bei der Wahl der Immobilisierung auf eine geringe Inaktivierung des Enzyms, geringe Immobilisierungskosten bzw. eine einfache Immobilisierungsmethode und gute Langzeitstabilität des Katalysatorkomplexes geachtet werden.^[42]

Die unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden sind als Überblick in Abb. 5 zusammengefasst. Diese Einteilung wurde von einem internationalen Gremium 1971 vorgeschlagen.^[39,40] Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich die Trägerbindung von Biokatalysatoren, sprich die Bindung des Enzyms an einen festen unlöslichen Träger genutzt und diskutiert.

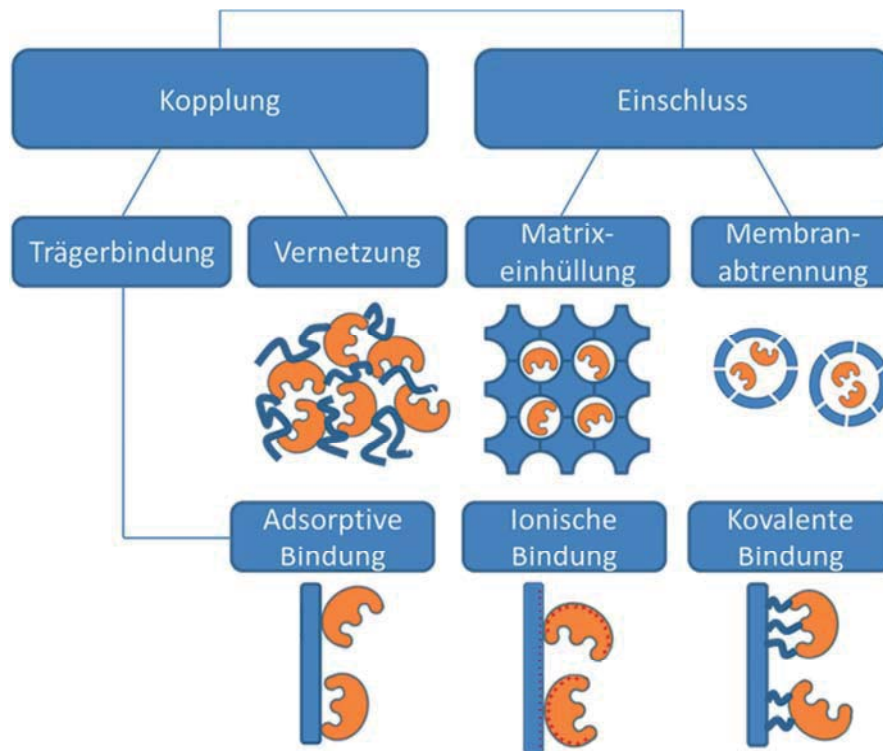


Abb. 5: Einteilung der verschiedenen Immobilisierungsmethoden. Abgewandelt nach Hartmeier^[39].

Als Träger können anorganische Stoffe wie Glas, Silicagel, Aluminiumoxid, Gold, organische Stoffe wie Kollagen, Cellulose, Stärke oder synthetische Stoffe wie Nylon oder Polyvinylalkohol dienen.^[43] Die Kopplung der Enzyme an einen Trägerstoff wird in adsorptive, ionische und kovalente Bindungen eingeteilt.

Die Adsorption basiert auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägermaterial. Obwohl es sich bei Wasserstoffbrücken-Bindung und hydrophoben Bindungen nicht um die physikalische Adsorption handelt, werden diese Wechselwirkungen auch unter dem Begriff Adsorption zusammengefasst. Die adsorptive Bindung von Biokatalysatoren ist eine schnelle und einfache Methode der Immobilisierung. Hierbei kommt es nur selten zu kopplungsbedingten Konformationsänderungen der Enzyme; Aktivitätsverluste treten daher kaum auf. Nachteilig bei dieser Methode ist die geringe Bindungsstärke. Bereits bei kleinen pH- oder Temperaturschwankungen löst sich die Bindung und das Enzym geht in Lösung über.^[43]

Bei ionischen Bindungen kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Trägermaterial und Biokatalysator. Dieses Verfahren ist ähnlich einfach durchzuführen wie die Adsorption. Zwar ist die Kopplungsstärke der ionischen Bindung stärker als die der Adsorption, jedoch ist sie immer noch schwach im Vergleich zur kovalenten Bindung.^[43]



Die kovalente Bindung ist eine relativ stabile irreversible Bindung zwischen Biokatalysator und Trägerstoff. Sie entsteht zwischen funktionellen Gruppen der Enzyme (z.B. -OH, -SH, -NH₂, -COOH) und Ankergruppen des Trägerstoffes. Nachteil dieser Immobilisierung ist eine häufig auftretende Verminderung der Aktivität des Biokatalysators.^[38] Diese Abnahme der Aktivität wird unter anderem verursacht durch sterische Behinderung, bei der aktive Zentren der Enzyme durch Abschirmungseffekte des Trägers und benachbarter Enzyme in ihrer Zugänglichkeit behindert werden oder durch Konformationsänderungen der Tertiärstruktur, die infolge der Bindung zwischen Enzym und Träger auftreten. Da sich die Nähe zur Trägeroberfläche also nachteilig auf die Aktivität des Biokatalysators auswirkt, lässt sich der konformative Stress auf das Enzym durch Einbringen eines Spacers (Abstandshalter) verringern. Diese Spacer sollen eine höhere Beweglichkeit und Zugänglichkeit des angekoppelten Biokatalysators ermöglichen.^[39] Die in diesem Kapitel beschriebenen charakteristischen Merkmale der unterschiedlichen Immobilisierungsformen werden im folgenden Kapitel anhand von Beispielen der Cellulase-Immobilisierung verdeutlicht. Diese Untersuchungen sollen die Wahl des Partikelsystems und der Immobilisierungsform für die hier vorgestellte Arbeit erleichtern.



2.2.3 Einsatz immobilisierter Cellulasen

Es gibt nur wenige Publikationen, die die Anwendung von immobilisierter Cellulasen referieren. Hauptgrund hierfür ist das unlösliche Substrat Cellulose. Dies kann durch Vorbehandlung und spezielle Modifikation in eine wasserlösliche Form z.B. Carboxymethylcellulose überführt werden. Als Träger für die Immobilisierung werden unporöse Strukturen bevorzugt, da hier die Diffusionseffekte bzw. Diffusionslimitierungen vernachlässigbar sind. Der Einsatz von nanostrukturierten Trägern ermöglicht eine höhere Beladungskapazität aufgrund des erhöhten Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, eine verbesserte Löslichkeit bzw. Dispergierbarkeit des Enzym-Träger-Komplexes und eine geringere Massentransfer-Limitation.^[44] Durch den Einsatz von Nanopartikeln soll außerdem ein geringerer konformativer Stress für die Enzyme vorherrschen, so dass sie ihre native Form weitestgehend beibehalten.^[45, 46] Des Weiteren zeigen Nanopartikel aufgrund ihrer Größe Brown'sche Molekularbewegung und schränken somit das Enzym weniger in seiner Mobilität ein als dies mit μ -Partikeln als Träger der Fall ist. Eine Berechnung zur Brown'schen Molekularbewegung kann dem Anhang B 10 entnommen werden. Im folgenden Kapitel sind einige Publikationen zur Immobilisierung und Anwendung von Cellulasen auf Nanostrukturen zusammengetragen.

Die Physikalische Adsorption von Cellulase auf einem Trägermaterial zeigt zu geringe Bindungsstärken. Beispiele der physikalischen Adsorption von Cellulase sind die Adsorption auf Tonerde, bei der bis zu 20 % des adsorbierten Proteins (Beladungen bis 200 mg/g) noch vor Einsatz in der Hydrolyse von dem Trägermineral abgewaschen werden.^[47] Die Aktivität der Immobilisate sinkt auf etwa 70-80 % der nativen Cellulase, allerdings kann eine Steigerung der Lagerstabilität erzielt werden. Als weitere adsorptive Funktionalisierung von Cellulose wurden Teflonpartikel (215 nm) untersucht. In diesem Fall sank die Aktivität des Enzymkomplexes auf etwa 50 % der Aktivität nativer Cellulase.^[45] Großer Vorteil dieser Immobilisierungsform ist die geringe Konformationsänderung des Enzyms. Dies konnte auch anhand der Untersuchungen der adsorptiven Immobilisierung auf Aktivkohle bestätigt werden.^[46] Daoud et al.^[46] untersuchten ebenfalls den wiederholten Einsatz der Immobilisate in mehreren Zyklen. Die Aktivität der Cellulase reduziert sich nach 5 Zyklen auf 70 % des Anfangswertes, was wohl im großen Nachteil der physikalischen Adsorption begründet ist, dem Proteinleaching. In allen Fällen wurde als Substrat die lösliche Methylcellulose eingesetzt. Nicht nur die Physisorption der Enzyme zeigt ein starkes Proteinleaching sondern auch die Einbettung des Enzyms in eine Polymermatrix. So wird z.B. von Kumakura et al.^[48]



eine Immobilisierung des Enzyms auf Aluminiumoxid Partikeln mit umgebender Polymermatrix, in der die Cellulasen eingebettet sind, realisiert. Nach den ersten Zyklen werden etwa 20 % der Enzyme aus der Matrix ausgewaschen.^[48] Durch Steigerung des Vernetzungsgrades könnte hier das Proteinleaching minimiert werden. Dies hätte jedoch wieder den Nachteil des konformativen Stresses für das Protein und Substratlimitierungseffekte machen den Einsatz des immobilisierten Enzyms ineffizient. Um das Problem des Proteinleachings zu reduzieren kann alternativ die ionische Immobilisierung eingesetzt werden.

Die Natur der Oberflächenladung und das Ausmaß der Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche sind stark abhängig vom Lösungsmittel-pH. Aus diesem Grund sollten der Ionisationsgrad des Enzyms und die Oberflächenladung des Trägermaterials bei den vorliegenden Umgebungsbedingungen bekannt sein. Die elektrostatische Adsorption ist eine vielseitige Methode, die einfach auf ein breites Spektrum von Nanomaterialien so wie superparamagnetische Partikel^[49] oder Kohlenstoff-Nanotubes^[50] angewendet werden kann. Die inerte Natur der Eisenoxid Nanopartikel gegenüber biologischen Systemen erlaubt deren Einsatz in z.B. zellulären oder Drug-Delivery Systemen. Zusätzlich versprechen diese magnetischen Partikel eine einfache Möglichkeit der Wiedergewinnung und des erneuten Einsatzes der immobilisierten Enzyme über mehrere Zyklen. Auch hier konnte eine deutliche Verbesserung der pH-Stabilität sowie eine leichte Stabilisierung gegenüber hohen Temperaturen beobachtet werden. Ein großes Problem dieser magnetischen Partikelsysteme ist die Oxidation der Eisenkomponente und die damit verbundene Abnahme der magnetischen Abtrennbarkeit. Das zweite Beispiel, die Kohlenstoff-Nanotubes, sind aufgrund ihrer großen Oberfläche von 130 m²/g ein guter Kandidat als Träger für Biomoleküle. Die negativ geladenen Carboxyl-Gruppen auf der Trägeroberfläche interagieren mit den positiven Seitenketten (z.B. Aminogruppen) des Proteins. Es sind maximale Beladungen von 630 ± 40 mg/g beschrieben worden, die sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren des Partikels stattfinden.^[50] Die Aktivität bei Hydrolyse von 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranosid der immobilisierten β -Glucosidase betrug nur noch 20 % der nativen Enzymaktivität, so dass dieses Trägermaterial für industrielle Anwendungen uninteressant wird.

Eine weitere Methode der Immobilisierung ist die Quervernetzung des Enzyms mit der Trägermatrix. Dies führt zu einer deutlich erhöhten Stabilität des Enzyms in mehreren Zyklen.^[51, 52] Nachteil hierbei ist allerdings die stark reduzierte Aktivität des Enzyms aufgrund des sterischen Stresses und der damit verbundenen Konformationsänderung sowie abhängig vom Substrat eine Stofftransportlimitierung aufgrund von Diffusionslimitierungen