

Kohlenstoffmonolithe zur Immobilisierung von Enzymen und deren Anwendung als Durchflussreaktor (MBFSt Kennziffer: 3476)

Dr. Susann Barig

Institut für Biotechnologie; Fakultät für Umwelt- und Naturwissenschaften
BTU Cottbus-Senftenberg

Einleitung

Der Einsatz immobilisierter Enzyme ist aus industrieller Sicht wichtig um Kosten zu sparen. Verschiedene Faktoren, z.B. die Wahl des Trägermaterials, die angewandte Immobilisierungsmethode oder die Auslegung des Bioreaktors, bestimmen eine erfolgreiche Immobilisierung welche zu einer erfolgreichen Biotransformation führt [1]. Oft ist die Wahl des Trägers auf käuflich erwerbbar Materialen in vorgegebenen Dimensionen beschränkt. Des Weiteren werden hohe Anforderungen an das optimale Trägermaterial gestellt, z.B. Resistenz gegenüber Druck, Scherkräften und Lösungsmitteln, eine geringe Diffusionsbeeinträchtigung durch hohe Porosität, eine große Oberfläche sowie eine biologische Verträglichkeit. Diese Ansprüche können von Kohlenstoffmaterialien erfüllt werden [2, 3]. In früheren Arbeiten konnte ein Verfahren entwickelt werden, welches hochporöse Kohlenstoffmaterialien in beliebigen Dimensionen zur Verfügung stellt. Als Templat dient handelsüblicher Porenbeton, welcher einfach zu bearbeiten ist. Dieser wurde mit einer 68 % (w/v) Saccharose Lösung infiltriert und karbonisiert. Das Templat wird herausgelöst und somit ein Negativabdruck des porösen Betons erhalten. Diese Kohlenstoffmonolithe können industriell vielfältig Anwendung finden, wie z. B. als Absorber, Katalysatoren oder als Energiespeicher [4]. Durch die bereits genannten Eigenschaften des Kohlenstoffmaterials sind sie auch als Träger zur Immobilisierung von Biokatalysatoren geeignet [3]. Um Alternativen zu bereits selbstentwickelten Verfahren zu entwickeln [5], sollte in dem Projekt das Verfahren zur Herstellung von hierarchischem hochporösem Kohlenstoffmaterial genutzt werden, um Granulat sowie Monolithe bereitzustellen. Als Modell-Enzym zur Immobilisierung wurde die *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) gewählt, welche adsorptiv sowie kovalent an das Material gebunden werden sollte. Durch den Vergleich mit käuflichem Trägermaterial auf Polymethacryl-Basis sollte eine Einschätzung zur weiteren Anwendung des Materials getroffen werden.

Durchführung und Ergebnisse:

Im ersten Teil des Projektes wurde Kohlenstoffgranulat mit einem Durchmesser von 125-200 μm synthetisiert, um das Material mit käuflichem Trägermaterial auf Polymethacryl-Basis zu vergleichen (Abbildung 1).

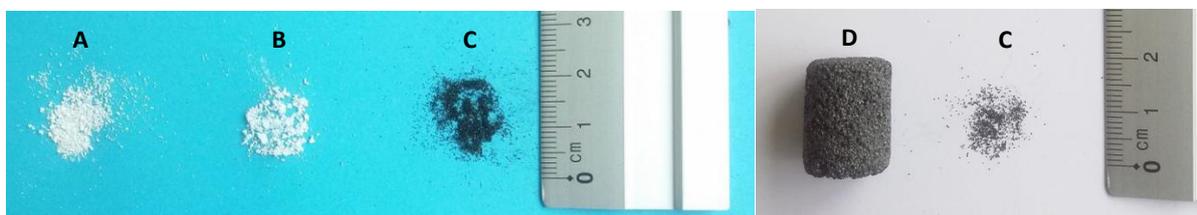


Abbildung 1: Trägermaterialien zur Immobilisierung von Enzymen. A: Relizyme™EA403/S, B: Relizyme™ HG403/S, C: synthetisiertes hochporöses Kohlenstoffgranulat, D: zylindrischer Monolith aus hochporösem Kohlenstoff.

Mittels Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorption wurden Poren mit einem mittleren Durchmesser von 5 nm gemessen und eine BET-Oberfläche von 614 m^2/g bestimmt. Das mit dieser Methode bestimmte Porenvolumen betrug 0,77 cm^3/g . Mittels Böhm-Titration konnte eine Beladung des Materials mit Carboxylgruppen von 1,1 mmol/g nassem Material bestimmt werden. Darüber hinaus wurden zylindrische Monolithe ($h=2\text{ cm}$; $d=1\text{ cm}$) mit vergleichbaren Eigenschaften hergestellt (Abbildung 1,D).

Adsorptiv wurde die TLL an das Kohlenstoffgranulat und zwei kommerziell erhältliche Trägermaterialien auf Polymethacryl-Basis mit Ethylendiamin- sowie Diolgruppen gebunden. In drei unabhängigen Experimenten konnten am Kohlenstoffgranulat Aktivitäten von bis zu 8,6 U/g gegenüber *p*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Aktivität in einem neu etablierten artifizielles Zwei-Phasen System mit Ethylpalmitat als Substrat in einer Hexan/ 2 mM Na-Phosphat Puffer (pH 7,0) Emulsion bestimmt. Mit der adsorptiv gebundenen TLL am Kohlenstoffmaterial konnten dabei Aktivitäten von bis 1,1 U/g nachgewiesen werden (Tabelle1). Dem gegenüber wurde die Eignung der zylindrischen Monolithen als Trägermaterial für die *T. lanuginosus* Lipase getestet. Bei einer adsorptiven Immobilisierung konnten Aktivitäten von 0,6 U/g Material gegenüber *p*-NPP erreicht werden.

Tabelle 1: Spezifische Aktivitäten der adsorptiv gebundenen Lipase von *Thermomyces lanuginosus* an drei verschiedenen Trägermaterialien gegenüber zwei verschiedenen Substraten. n.b.-nicht bestimmt

Substrat	<i>p</i> -Nitrophenyl Palmitat			Ethylpalmitat		
	Kohlenstoffgranulat	ReliZyme™ HG403	ReliZyme™ EA403	Kohlenstoffgranulat	ReliZyme™ HG403	ReliZyme™ EA403
Spez. Akt/Material [U/g]						
Exp. 1	0,9	0,1	1,4	1,1	0,03	0,04
Exp. 2	2,5	1,8	1,8	n.b.	n.b.	n.b.
Exp. 3	8,6	4,5	5,5	0,29	0,06	0,09

Eine Alternative ist die kovalente Immobilisierung. Das selbst hergestellte Kohlenstoffmaterial sowie die Polymethacryl-Kugeln mit der Hydroxyl-funktionalisierten Oberfläche wurden mittels *N*-3-Dimethylaminopropyl-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) aktiviert und in einem weiteren Schritt mit den primären Aminen an der Enzymoberfläche gekoppelt. Dabei konnten in drei unabhängigen Experimenten Aktivitäten von bis zu 21 U/g Kohlenstoffmaterial und ebenfalls 34 U/g Polymethacrylmaterial mit Hydroxylfunktionalisierung gegenüber *p*-NPP erreicht werden. Im Zwei-Phasen Emulsionssystem konnten Aktivitäten von bis zu 0,13 U/g Kohlenstoffmaterial ermittelt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Spezifische Aktivitäten der kovalent gebundenen Lipase von *Thermomyces lanuginosus* an zwei verschiedenen Trägermaterialien gegenüber zwei verschiedenen Substraten.

Substrat	<i>p</i> -Nitrophenyl Palmitat		Ethylpalmitat	
	Kohlenstoffgranulat	ReliZyme™ HG403	Kohlenstoffgranulat	ReliZyme™ HG403
Spez. Akt/Material [U/g]				
Exp. 1	20,5	33,5	0,13	0,24
Exp. 2	20,4	23,5	0,13	0,18

Zusammenfassung und Ausblick:

Im Projektzeitraum konnten zwei verschiedene Enzym-Immobilisierungsmethoden am selbst hergestellten hochporösen Kohlenstoffmaterial etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Kohlenstoffmaterial unter Nutzung beider Methoden ein geeigneter Träger für die TLL ist. Vergleichend mit kommerziellen Trägermaterialien konnten Aktivitäten in der gleichen

Größenordnung gegenüber zwei verschiedenen Substraten erreicht werden. Zukünftig könnte das Porenvolumen des Materials sowie die Makroporosität erhöht werden, um Diffusions- und Durchströmungsbarrieren im Monolithen abzubauen. Ein Einsatz des Materials mit immobilisierter TLL in einem Bioreaktor ist durch die einfache Anpassung des Materials in Größe und Form geplant. Das Trägermaterial könnte weiterhin für andere auch komplexere Enzyme zur Immobilisierung genutzt werden.

Die Arbeit diene als „*Proof-of-Concept*“, um die Möglichkeit der Anwendung des Kohlenstoffmaterials als Enzymträger abzuschätzen. Dies kann als erfolgreich eingeschätzt werden. In nachfolgenden Projekten könnten wissenschaftlich Bindungseigenschaften zwischen Material und Enzym sowie Durchströmungseigenschaften im Bioreaktor untersucht werden.

Veröffentlichung:

Die Arbeit wurde im Rahmen der ProcessNet-Jahrestagung und der 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016 als Vortrag und Poster präsentiert.

Barig S., Utgenannt S., Heine A., Reichardt C., Klepel O., Schnitzlein K., Stahmann K.-P.; Poröses Kohlenstoffmaterial zur Immobilisierung von Lipase – Vergleichende Messungen mit Methacryl-Beads. *CIT Vol. 88,9 p. 1243*; 2016.

Referenzen:

[1] Mohamad N.R. et al.; An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, Vol. 29,2 p.205-220*; 2015.

[2] Cao, L.; Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. WILEY-VCH Verlag, 2005.

[3] Luangon et al.; Flow-through immobilization of *Candida rugosa* lipase on hierarchical micro-/macroporous carbon monolith. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 75 p.80– 85*; 2012.

[4] Taubert et al.; Attempts to design porous carbon monoliths using porous concrete as a template; *Microporous and Mesoporous Materials Vol. 197 p.58–62*; 2014.

[5] Barig et al., Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports. *Enzyme and Microbial Technology Vol. 60 p.47–55*; 2014