

Diss. ETH No. 6542

THE DEACTIVATION BEHAVIOR OF IMMOBILIZED GLUCOSE-OXIDASE/
CATALASE ON HYDROGEN PEROXIDE DECOMPOSING SUPPORTS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of Doctor of Technical Sciences

Presented by
ROBERT STEVE CARTER
Dipl. Chem. Ing. ETHZ
born May 5, 1952
citizen of Luxembourg

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. J.R. Bourne, referee
Prof. Dr. P.L. Luisi, co-referee

1980

SUMMARY

The production of gluconic acid from glucose is a potential industrial application of immobilized glucose oxidase. This enzymatic reaction also yields hydrogen peroxide, which is normally catalytically decomposed by the catalase contained in crude glucose oxidase. Unfortunately, both catalase and glucose oxidase are deactivated by hydrogen peroxide, so that the life-times of immobilized glucose oxidase preparations have so far been insufficient for process purposes. The goal of this work is to determine whether increased stabilities can be obtained if inorganic catalysts are used as supports to replace the unstable catalase and decompose the hydrogen peroxide.

Seventeen catalysts, chosen in three groups (transition metal oxides, platinum metals, activated carbons) are screened for their hydrogen peroxide decomposing activity. The most promising among them appear to be a Pittsburgh coal activated carbon and, above all, ruthenium. The impregnation of three different supports (a controlled pore silica, titania and a Pittsburgh coal activated carbon) with ruthenium is optimized. The highest activities towards hydrogen peroxide decomposition and the lowest ruthenium loadings are obtained with the controlled pore silica as support.

The life-times of various immobilized glucose oxidase preparations are compared in miniature trickle bed reactors. If controlled pore silica is used as a support for glucose oxidase, low stabilities and high peroxide concentrations in the effluent are observed, unless the support is coated with ruthenium or the enzyme contains excess catalase. Activated carbon bound enzyme has average hydrogen peroxide levels in the effluent and average life-times (whether or not the carbon is coated with ruthenium). The highest stability is obtained with crude glucose oxidase with a large excess of catalase bound to controlled pore silica. The addition of superoxide dismutase to the enzyme mixture has no effect on its stability. The use of

electron acceptors (e.g. ethanol, hexacyanoferrate (II)) to influence the catalase reaction has either a negative effect or no effect at all. Although large stability increases have been achieved by increasing the hydrogen peroxide decomposing activity of the immobilized preparations, the life-times obtained are still unsatisfactory for an economic process. The inorganic catalysts used are all poisoned in the long run by the gluconate produced by the reaction. Further productivity increases appear to be difficult.

Included in this thesis are an extensive review on the literature on the immobilization of glucose oxidase/catalase and a novel method for the study of enzymes by their reflection fluorescence in a microscope fluorometer.

KURZFASSUNG

Trägergebundene Glucose Oxidase könnte zur industriellen Herstellung von Gluconsäure aus Glucose gebraucht werden. Diese enzymatische Reaktion produziert auch Wasserstoffperoxid, das normalerweise von der in der Glucose Oxidase enthaltenen Katalase zersetzt wird. Sowohl Katalase als auch Glucose Oxidase werden von Wasserstoffperoxid desaktiviert. Die Stabilitäten immobilisierter Glucose Oxidase waren deshalb bisher für industrielle Anwendungen unzureichend. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob erhöhte Stabilitäten erreicht werden können, falls das Peroxid in der Mikroumgebung der Glucose Oxidase mittels anorganischer Katalysatoren, statt der unstabilen Katalase, zersetzt wird.

Siebzehn Katalysatoren aus drei Gruppen (Uebergangsmetalloxide, Platinmetalle, Aktivkohlen) wurden auf ihre katalytische Aktivität gegenüber Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung untersucht. Dabei erwiesen sich eine Aktivkohle (aus Pittsburgh Steinkohle) und insbesondere Ruthenium Katalysatoren als besonders versprechend. Die Imprägnierung von drei verschiedenen Trägern (ein Silikagel mit besonders enger Porenradienverteilung, Titanoxid und die bereits erwähnte Aktivkohle) mit Ruthenium wurde optimiert. Die höchste katalytische Aktivität gegenüber Wasserstoffperoxid und gleichzeitig die niedrigste Beladung mit Ruthenium wurde dabei beim Silikagel-Ruthenium Katalysator beobachtet.

Die Lebensdauer verschiedener immobilisierter Glucose Oxidase Präparate wurde in kleinen Rieselfilmreaktoren untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass, wie erwartet, sowohl die Ruthenium Beschichtung am Trägermaterial als auch die Anreicherung der Glucose Oxidase mit Katalase die Peroxidkonzentrationen senken und eine entsprechende Stabilitätserhöhung des Enzyms bewirken konnten. Wesentlich bessere Resultate wurden mit Ruthenium auf Silikagel als mit Ruthenium auf Aktivkohle erzielt.

Die höchsten Stabilitäten wurden bei technischer, mit Katalase angereicherter Glucose Oxidase (auf Silikagel) beobachtet. Der Zusatz von Superoxid Dismutase zum Enzymgemisch hatte keine Wirkung auf die Stabilität des Präparats. Der Zusatz von Elektronenakzeptoren (Aethanol, Kaliumhexazyanoferat (II) u.a.), um die Katalasereaktion zu beeinflussen, hatte entweder eine negative oder gar keine Wirkung auf die Lebensdauer des Enzyms. Obwohl die Stabilität trägergebundener Glucose Oxidase stark verbessert werden konnte, sind die erreichten Betriebsdauern für ein wirtschaftliches Verfahren noch immer unzureichend. Alle untersuchten anorganischen Katalysatoren wurden mit der Zeit (in ihrer Aktivität gegenüber Wasserstoffperoxid) von dem bei der Reaktion entstandenen Gluconat vergiftet. Weitere Produktivitätserhöhungen der Glucose Oxidase scheinen problematisch.

Diese Arbeit enthält ebenfalls eine umfassende Literaturübersicht über die Immobilisierung von Glucose Oxidase und Katalase und eine neuartige Methode zur Untersuchung trägergebundener Enzyme mittels ihrer Reflektionsfluoreszenz.