



Doctoral Thesis

The theory and practice of a multi-enzyme process a novel approach for the synthesis of fructose from starch

Author(s):

Moradian, Aydin

Publication Date:

1990

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000569417> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 9278

**The Theory and Practice of a Multi-Enzyme Process;
A Novel Approach for the Synthesis of Fructose from Starch**

**A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(ETH) Zürich**

**for the degree of
Doctor of Natural Sciences**

**presented by
Aydin Moradian
dipl. nat. wiss. ETH
born on June 25, 1965
in Tehran, Iran**

**accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Steven A. Benner, examiner
Prof. Dr. John R. Bourne, co-examiner**

Zürich 1990

Summary

A multi-enzyme process for the production of fructose from starch is presented. The process is based on the phosphorylative cleavage of starch yielding glucose-1-phosphate using phosphorylase α . This intermediate is then converted to fructose-6-phosphate via glucose-6-phosphate by phosphoglucomutase (E.C. 5.4.2.2) and phosphoglucose isomerase (E.C. 5.3.1.9).

The last step of the process requires the specific dephosphorylation of fructose-6-phosphate to produce fructose in high yields. However, at the outset of this work, no enzyme was known to specifically hydrolyze fructose-6-phosphate. Three attempts to obtain such a catalytic activity are presented. Fructokinase, an enzyme that phosphorylates fructose on the 6-position, was found to be unable to catalyze the reverse reaction at an acceptable rate. 5'-Nucleotidase, an enzyme specific for mono-nucleotides, was found to accept fructose-6-phosphate as a substrate. The activity was enhanced with the addition of pyridine as a cofactor. Imidazole was also found to enhance the reaction. A comparison with other compounds suggested that pyridine and imidazole presumably function by inducing a conformational change in the active site, thus enhancing the activity.

A "fructose-6-phosphatase" system was developed by the combination of transaldolase (E.C. 2.2.1.2) and glycerate-3-phosphate phosphatase (E.C. 3.1.3.38). This system utilizes an unnatural reaction of transaldolase in which fructose-6-phosphate and glyceraldehyde are converted to fructose and glyceraldehyde-3-phosphate. Subsequent dephosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate in an exergonic

reaction provides the driving force necessary for the reaction to proceed towards the production of fructose.

The multi-enzyme system using transaldolase and glycerate-3-phosphate phosphatase was run for 170 hours in a semi-continuous mode. Glyceraldehyde functioned as a required cofactor for the reaction. The process converted 61% of the starch to fructose.

Zusammenfassung

Ein Reaktionsprozess bestehend aus fünf verschiedenen Enzyme von tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Quellen für die Produktion von Fruktose aus Stärke wird vorgelegt. Stärke wird dabei mit dem Enzym Phosphorylase α (E.C. 2.4.1.1) in Anwesenheit von Phosphat zu Glukose-1-phosphat gespalten. Glukose-1-Phosphat wird mittels den Enzymen Phosphoglucomutase (E.C. 5.4.2.2) und Phosphoglukose-Isomerase (E.C. 5.3.1.9) zu Glukose-6-Phosphat und anschliessend zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt.

Der letzte Schritt des Prozesses benötigt eine spezifische Abspaltung der Phosphatgruppe von Fruktose-6-Phosphat. Am Anfang dieser Arbeit war ein solches Enzym unbekannt. Diese Arbeit beinhaltet drei verschiedene Versuche, um eine solche katalytische Aktivität zu erhalten. Das Enzym Fruktokinase, das Fruktose an der C-6 Stelle phosphoryliert, wurde nur mit geringem Erfolg für die Abspaltung dieser Phosphatgruppe benutzt. Ein anderes Enzym, 5'-Nucleotidase, das 5'-Mononukleotide spezifisch dephosphoryliert, wurde für unsere Zwecke untersucht. 5'-Nucleotidase war in der Lage Fruktose-6-phosphat als ein Substrat zu akzeptieren. Diese Aktivität wurde in der Anwesenheit von Pyridin weiter verstärkt. Ein Vergleich mit anderen gewählten organischen Substanzen hat ergeben, dass Pyridin und Imidazol vermutlich als Kofaktoren, die eine konformationelle Aenderung der aktiven Stelle des Enzyms hervorrufen, wirken und so die Enzymaktivität erhöhen.

Ein "Fruktose-6-phosphatase-System" wurde anschliessend mittels der Enzyme Transaldolase (E.C. 2.2.1.2) und Glycerat-3-phosphat-Phosphatase (E.C. 3.1.3.38) entwickelt. Dieses System basiert auf der Fähigkeit von Transaldolase, Fruktose-6-Phosphat in der Anwesenheit

von Glyceraldehyde-3-phosphat zu Fruktose und Glyceraldehyde-3-Phosphat umzuwandeln. Eine exergonische Abspaltung der Phosphatgruppe von Glyceraldehyde-3-Phosphat ist die treibende Kraft für die Produktion von Fruktose. Dieser "Multi-Enzym-Prozess" konnte während 170 Stunden in einem semi-kontinuierlichen Reaktorprozess benutzt werden, um 61% der eingesetzten Stärke zu Fruktose umzuwandeln.