

Enzymimmobilisierung: ein Weg zu verbesserten Biokatalysatoren

Uwe T. Bornscheuer*

Stichwörter:

Biotransformationen · Enzymkatalyse · Immobilisierung · Lipase · Magnetische Nanopartikel

Enzyme sind vielseitige Biokatalysatoren, die zunehmend Einsatz in vielen Bereichen wie der organischen Synthese finden. Wichtigste Vorteile von biokatalytischen Umsetzungen sind die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität sowie die milden Reaktionsbedingungen.^[1] Allerdings ist die industrielle Anwendung eines Enzyms – falls es für eine bestimmte Reaktion als geeignet identifiziert wurde – oft durch eine mangelhafte Langzeitstabilität unter Verfahrensbedingungen und durch Schwierigkeiten beim Recycling eingeschränkt. Diese Schwachstellen können durch eine Immobilisierung umgangen werden, die folgende Vorteile umfasst:

- gesteigerte Stabilität,
- mehrfacher oder kontinuierlicher Einsatz,
- einfache Abtrennung vom Reaktionsgemisch,
- Möglichkeit zur Beeinflussung katalytischer Eigenschaften,
- Vermeidung einer Proteinkontamination im Produkt,
- einfache Vermeidung von mikrobiellen Verunreinigungen.

Seit den ersten Anwendungen von Biokatalysatoren in der organischen Synthese vor fast einem Jahrhundert beschäftigt sich die Forschung mit Methoden, um eine Verbindung zwischen Enzym und Träger herzustellen. Eine Vielzahl von Enzymen und Reaktions-

systemen (sowohl wässrige Systeme als auch organische Lösungsmittel) ist in der Literatur dokumentiert.^[2] Dies belegt einerseits die Bedeutung der Biokatalyse, macht aber auch deutlich, dass die Einführung einer generellen, breit anwendbaren Methode zur Enzymimmobilisierung noch aussteht. Die am häufigsten eingesetzten Techniken lassen sich in vier Kategorien einteilen:

- nichtkovalente Adsorption oder Deposition,
- kovalente Verknüpfung,
- Einschluss in einem polymeren Gel, einer Membran oder Kapsel,
- Vernetzung mit einem polyfunktionalen Reagens.

Jede dieser Strategien bildet einen Kompromiss zwischen der Erhaltung hoher katalytischer Aktivität und den genannten Vorteilen einer Immobilisierung. Zwei aktuelle Trends beruhen auf 1) der Anwendung neuer Reagentien und/oder Träger und 2) Ansätzen, die das zunehmende Datenmaterial zu Enzymstrukturen und -mechanismen einbeziehen.

Bereits 1995 beschrieben Reetz und Mitarbeiter, dass die Verwendung von Sol-Gelen die Aktivität von Lipasen bis zu 100fach steigern kann.^[3] Bei vernetzten Enzymkristallen (cross-linked enzyme crystals, CLECs)^[4] wurde sogar über einen Anstieg der Enantioselektivität im Vergleich zum nativen Enzym berichtet,^[5] der aber hauptsächlich der Entfernung eines weniger selektiven Isoenzymes während der CLEC-Herstellung zugeschrieben wurde. Eine einfache Alternative zur experimentell schwierigen Kristallisation von Proteinen könnten die kürzlich beschriebenen vernetzten Enzymaggregate (cross-linked enzyme aggregates, CLEAs) sein,

die durch Fällung des Proteins und nachfolgende Vernetzung mit Glutaraldehyd erhalten werden. Das CLEA einer Penicillin-Acylase zeigte in der Synthese von Ampicillin eine ähnliche Aktivität wie ein CLEC und katalysierte die Reaktion darüber hinaus in einer Reihe von organischen Lösungsmitteln.^[6]

Eine vielversprechende Kombination aus einfacher Abtrennung und hoher Stabilität wurde für eine Lipase beschrieben, die auf magnetischen γ - Fe_2O_3 -Nanopartikeln immobilisiert ist.^[7] Die Verwendung magnetischer Partikel ist nicht neu,^[8] allerdings gelang Ulman und Mitarbeitern nun die Herstellung von Nanopartikeln mit einer Durchschnittsgröße von $20 \pm 10 \text{ nm}$ (statt der üblichen $75\text{--}100 \text{ }\mu\text{m}$), die nach Thiophen-Funktionalisierung kovalent mit einer Lipase aus *Candida rugosa* verbunden wurden. Der so erhaltene Biokatalysator, der in der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylbutyrat eingesetzt wurde (Abbildung 1), zeichnet sich durch eine deutlich höhere Stabilität (fast einen Monat stabil) gegenüber dem nativen Enzym aus. Zusätzlich kann das immobilisierte Enzym leicht durch Anlegen eines magnetischen Feldes, das entweder das Immobilisat festhält oder es entfernt, vom Reaktionsgemisch abgetrennt werden, da die Nanopartikel sehr hohe Magnetisierungswerte aufweisen.

Das zunehmende Datenmaterial zu Enzymstrukturen und -mechanismen sollte für eine steuerbare Immobilisierung anwendbar sein. Beispielsweise wurde eine Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* auf vier unterschiedlichen Trägern immobilisiert.^[9] Zwei der trägerfixierten Lipasepräparationen zeig-

[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer

Institut für Chemie und Biochemie
Technische Chemie & Biotechnologie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Soldmannstraße 16
17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-4346
E-mail:
uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

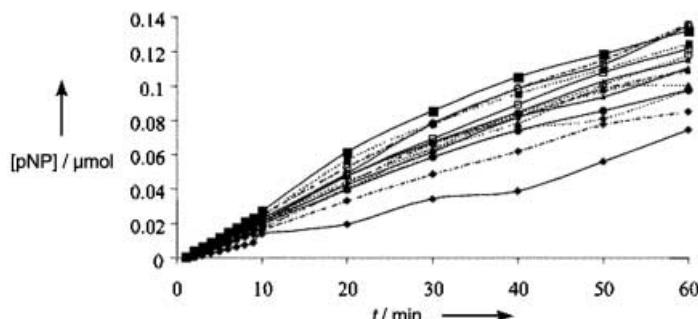
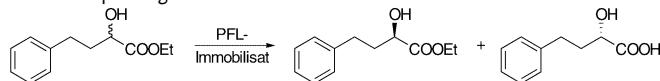


Abbildung 1. Aktivität einer Lipase aus *Candida rugosa*, immobilisiert auf magnetischen γ -Fe₂O₃-Nanopartikeln, in der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylbutyrat.^[7] Die Konzentrations-Zeit-Verläufe (*p*NP = *p*-Nitrophenol), die nach 1 (□) bis 27 Tagen (◆, untere Kurve) aufgezeichnet wurden, verdeutlichen die hohe Stabilität der immobilisierten Lipase. Wiedergabe in veränderter Form mit Genehmigung der American Chemical Society.

ten nahezu unveränderte Aktivität und Enantioselektivität in der Hydrolyse eines racemischen Carbonsäureethylesters. Mit zwei weiteren Immobilisaten konnten jedoch deutlich veränderte Eigenschaften erreicht werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ansätze zur gesteuerten Immobilisierung einer Lipase aus *Ps. fluorescens* (PFL) am Beispiel der Racematspaltung eines Carbonsäureesters.^[9]



Träger	Aktivität [U mg ⁻¹] ^[a]	Enantiomerenüberschuss [%] ^[b]	Enantioselektivität
– (nativ)	0.5	59	7
Dextran-Agarose	0.45	58	6.9
Glyoxyl-Agarose	0.35	74	20
IHA-Octyl-Agarose ^[c]	3.5	92	79
IHA-Decaoctyl-Sepharose ^[c]	3.4	92.5	86

[a] μ mol Substrat, hydrolysiert pro Minute pro mg immobilisiertes Protein. [b] Enantiomerenüberschuss des nichtumgesetzten (*R*)-Esters. [c] IHA = interfacial hydrophobic adsorption.

Die spezifische Aktivität wurde versebenfacht, und die Enantioselektivität stieg von $E=7$ auf $E=86$ für die Decaoctyl-Sepharose-immobilisierte Lipase. Die Autoren nehmen an, das die Lipase bei dieser (zudem sehr viel schnelleren) Immobilisierungsmethode ihre Konformation von der geschlossenen hin zur offenen Struktur ändert. Ein hydrophober „Deckel“, der in fast allen Lipasen vorhanden ist, wird durch eine durch den Träger und die Immobilisierungsmethode verursachte Grenzflä-

chenaktivierung verschoben und ermöglicht den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum. Mit einer ähnlichen Strategie gelang der gleichen Arbeitsgruppe die Modulierung der Eigenschaften von Penicillinacylasen aus drei

unterschiedlichen Organismen, die ebenfalls ihre Konformation bei Bindung des Acyldonorsubstrates ändern.^[10]

Zukünftig sollten Informationen zu Proteinsequenzen, 3D-Strukturen und Reaktionsmechanismen verstärkt mit den Eigenschaften des Trägers (funktionelle Gruppen, Hydrophobie, magnetische Eigenschaften) und physikalisch-chemischen Methoden mit dem Ziel einer gerichteten Immobilisierungsstrategie verknüpft werden.

- [1] a) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694–1697; b) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268; c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4. Aufl., Springer, Berlin, **2000**; d) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regional and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

- [2] a) T. Boller, C. Meier, S. Menzler, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 509–519; b) J. Lalonde, A. Margolin in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Vol. 2 (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 163–184; diese Übersicht enthält auch umfangreiche weiterführende Literatur zur Enzymimmobilisierung.

- [3] a) M. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 373–376; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 301–303; b) M. T. Reetz, P. Tielmann, W. Wiesenhöfer, W. Könen, A. Zonta, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 717–728.

- [4] a) N. Khalaf, C. P. Govardhan, J. J. Lalonde, R. A. Persichetti, Y. F. Wang, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5494–5495; b) T. Zelinski, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 746–748; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 722–724.

- [5] J. J. Lalonde, C. Govardhan, N. Khalaf, A. G. Martinez, K. Visuri, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6845–6852.

- [6] L. Cao, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361–1364.

- [7] A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S. W. Chang, C. Spagnoli, K. V. P. M. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R. A. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1684–1685.

- [8] a) L. Cao, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *J. Mol. Catal. B* **1999**, *6*, 279–285; b) R. F. H. Dekker, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989**, *22*, 289–310.

- [9] G. Fernández-Lafuente, M. Terreni, C. Mateo, A. Bastida, R. Fernández-Lafuente, P. Dalmases, J. Huguet, J. M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 389–396.

- [10] a) M. Terreni, G. Pagani, D. Ubiali, R. Fernández-Lafuente, C. Mateo, J. M. Guisan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2429–2432; b) S. Rocchietti, A. S. V. Urrutia, M. Pregnolato, A. Tagliani, J. M. Guisan, R. Fernández-Lafuente, M. Terreni, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 88–93.