

Biokatalyse

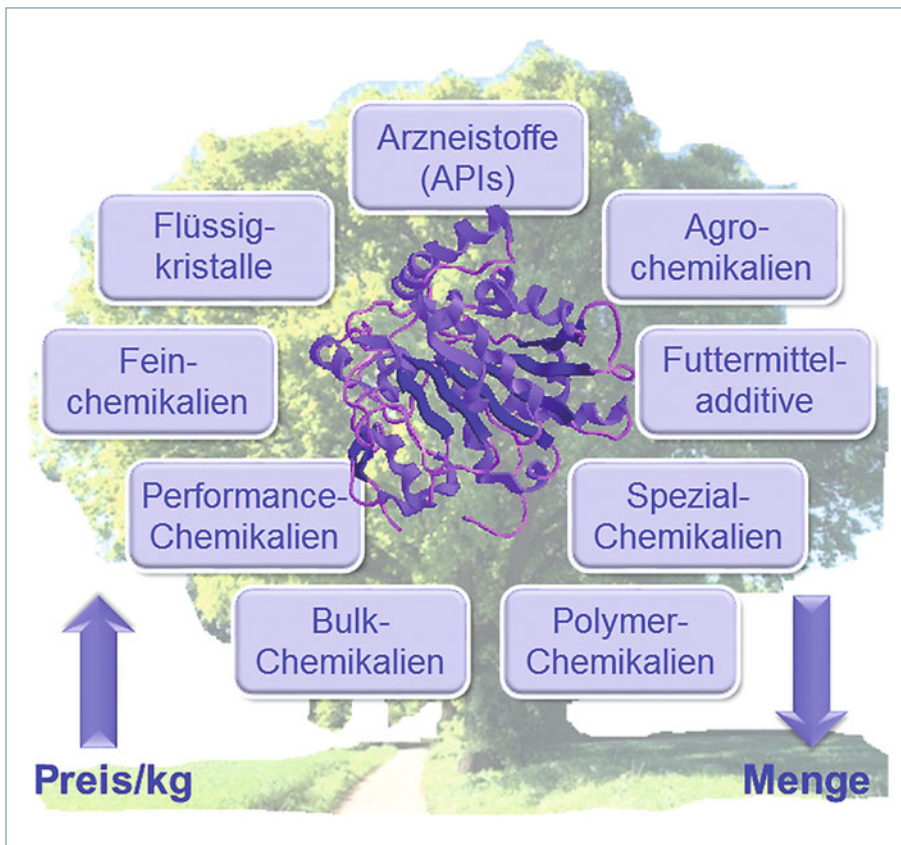
Lösungsansätze entlang der chemischen Wertschöpfungskette

HARALD GRÖGER

LEHRSTUHL FÜR INDUSTRIELLE ORGANISCHE CHEMIE UND BIOTECHNOLOGIE,
FAKULTÄT FÜR CHEMIE, UNIVERSITÄT BIELEFELD

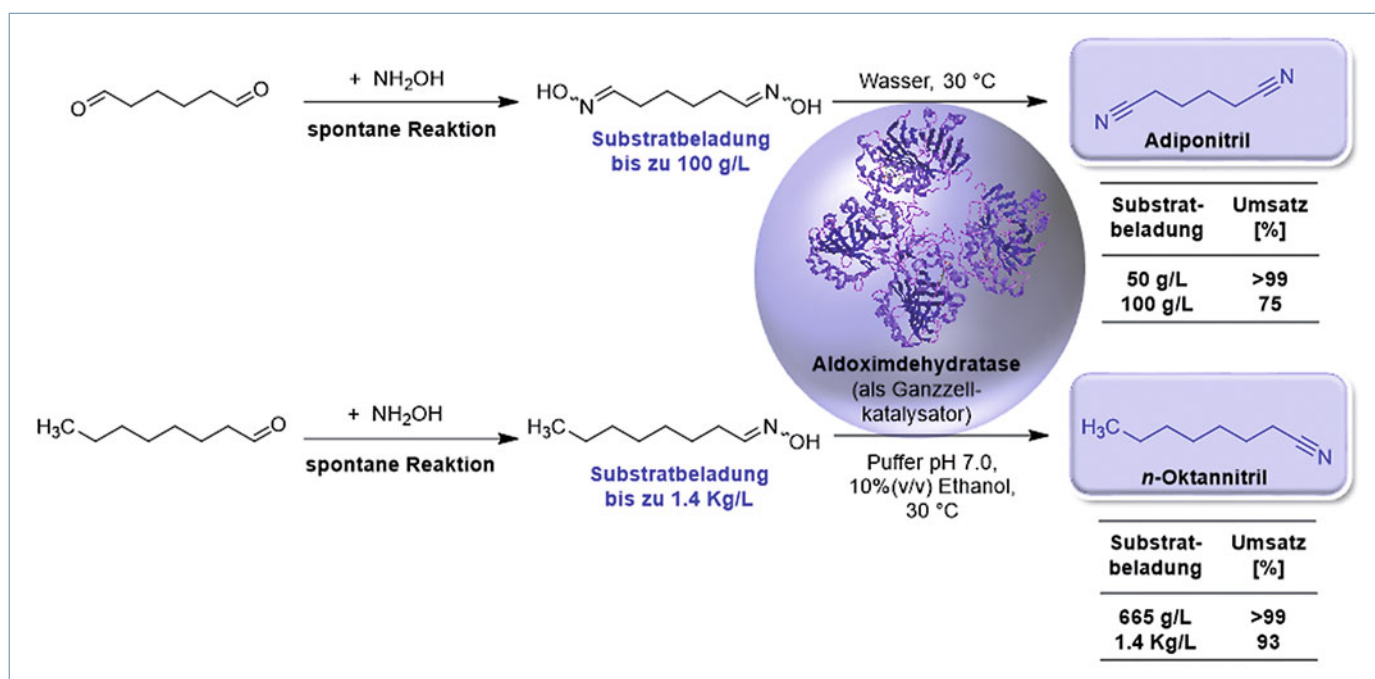
In this article, the high potential of biocatalysis as a versatile tool to address industrial challenges is illustrated by three examples from our own research, which was done, in part, jointly with companies from the chemical industry. In these examples, biocatalytic processes were developed for products from different industrial segments. In detail, the products being obtained by the presented bioprocesses are from the areas of polymer building blocks, lubricant components and pharmaceuticals.

DOI: 10.1007/s12268-019-0093-3
© Springer-Verlag 2019



▲ **Abb. 1:** Der industrielle Produktstammbaum umfasst *high volume–low cost–* bis zu *low volume–high cost–*Anwendungen und bietet Perspektiven für die Nutzung von Enzymen als Katalysatoren in Verfahren zur Herstellung von Industriechemikalien.

Die Industrielandschaft der Chemie ist breit diversifiziert, beginnend mit hochvolumigen, aber im niedrigen Preisbereich liegenden Basischemikalien über Spezialchemikalien und Feinchemikalien bis zu hochpreisigen, komplexen Produkten, wie z. B. Arzneistoffe (**Abb. 1**, [1]). Als Herstellungsverfahren kommen insbesondere katalytische Reaktionen zum Einsatz, die insgesamt mehr als 85 Prozent der Verfahren in der chemischen Industrie darstellen [2]. Auch die Biokatalyse hat dabei ihren Platz gefunden und sich im Bereich der Feinchemikalien und pharmazeutischen Zwischen- und Endprodukte als eine dominierende Technologie insbesondere für chirale Vertreter dieser Produktklasse etabliert [3]. Neben der klassischen Racematspaltung sind es insbesondere Enzym-katalysierte Verfahren, die heute hierfür eingesetzt werden. Besondere Vorteile sind die milden, oftmals umweltschonenden Reaktionsbedingungen sowie – vielleicht in diesem Produktsegment noch entscheidender – die exzellenten Selektivitäten, die mit diesen „Katalysatoren aus der Natur“ erzielt werden und in vielen Fällen denen der Chemokatalysatoren überlegen sind. Allerdings wären weit mehr Anwendungen denkbar, und ein seit Langem bestehender *bottleneck* besteht in der fehlenden Einbindung von biokatalytischen Reaktionen als Schlüsselschritte bei der Entwicklung von Retrosynthesen für die komplexen Arzneiwirkstoffe. Eine weitere Herausforderung für die Biokatalyse besteht in der Erweiterung des Anwendungsspektrums außerhalb der chiralen Verbindungsklassen, etwa für den Bereich der Basis- bzw. Spezialchemikalien. Auf diesen Gebieten spielt die (Enantio-)Selektivität im Allgemeinen keine bzw. eine untergeordnete Rolle. Entsprechend sind in diesem Segment bislang Biokatalyse-Anwendungen die Ausnahme geblieben, mit der enzymatischen Acrylamidproduktion im Multi-Zehntausend-Tonnen-Maßstab als prominentestes Beispiel. Dennoch bietet auch hier die Biokatalyse Chancen für wirtschaftliche Ansätze, und



▲ **Abb. 2:** Chemoenzymatische Synthesepattform unter Einsatz einer enzymatischen Aldoxim-Dehydratisierungsreaktion zur Herstellung aliphatischer Nitrile am Beispiel der Polymervorstufe Adiponitril (oben) und der Aminvorstufe *n*-Oktannitril (unten).

zwar sowohl bei Anwendungen in der chemischen Großindustrie als auch im Mittelstand in der Chemie sowie Biotechnologie.

Im Folgenden wird an drei Beispielen für ausgewählte, an unserem Lehrstuhl und in Teilen mit Partnern aus der mittelständischen Wirtschaft durchgeführten Arbeiten exemplarisch aufgezeigt, wie Biokatalyse für unterschiedlichste Industrieproduktbereiche von *high volume – low cost* bis zu *low volume – high cost* (Abb. 1) einen vielversprechenden Lösungsansatz darstellen kann. Die drei vorgestellten Produkte entstammen den Bereichen Polymerbausteine (Basis-/Bulk-Chemikalie), Schmierstoffkomponenten (Spezialchemikalien) und moderne Pharmazeutika (Feinchemie/Wirkstoffe) und adressieren somit völlig verschiedene Herausforderungen, was die Vielseitigkeit der Biokatalyse als Lösungsansatz unterstreicht.

Biokatalyse für Polymerbausteine: enzymatische Herstellung von Adiponitril

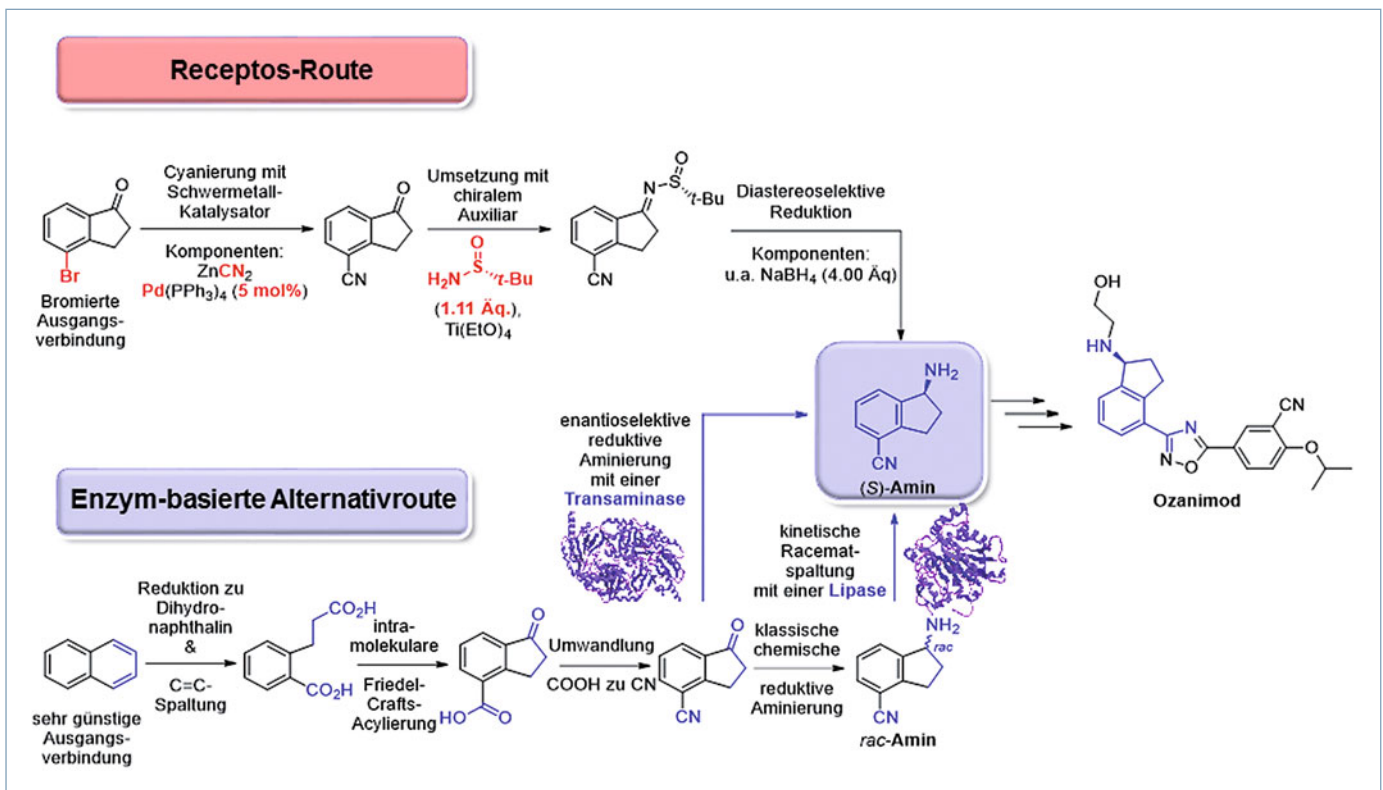
Im Bereich der Basis-/Bulk-Chemikalien kommt den bifunktionalisierten Verbindungen aufgrund deren Verwendung im Polymerbereich eine besondere Rolle zu. Einer der bedeutendsten Vertreter stellt Hexamethyldiamin dar. Dieser Polymerbaustein wird aus Adiponitril hergestellt, welches wiederum im Maßstab von 1,3 Millionen Tonnen und davon 70 Prozent gemäß dem

DuPont-Prozess produziert wird [1]. Allerdings werden hierfür heute ca. 0,5 Millionen Tonnen hochtoxische Blausäure für dessen Umsetzung mit Butadien im Verhältnis 2:1 benötigt. Ein konzeptionell andersartiger und auf Biokatalyse als Schlüsselschritt basierender Herstellungsweg wurde von uns kürzlich entwickelt, wobei dieses Verfahren zudem perspektivisch die Rückintegration auf die Herstellung dieses heute petrochemisch basierten Bausteins auf zukünftig CO₂, Wasser und molekularen Stickstoff aus der Luft bietet [4]. Im Detail stellt der Schlüsselschritt die Umwandlung von Hexandialdoxim unter Ausbildung des gewünschten Bausteins Adiponitril dar (Abb. 2, obere Reaktionsgleichung). Als Enzymkomponente kommt eine Aldoximdehydratase zum Einsatz, welche die Dehydratisierung von Aldoximen in Wasser und bei Raumtemperatur katalysiert. Eine solche Reaktion erfüllt eine Reihe von Kriterien einer nachhaltigen Chemie, da unter anderem lediglich Wasser als Solvens benötigt wird und die Reaktion unter milden Bedingungen ohne Energieaufwand bei Raumtemperatur durchgeführt wird. Auch sei erwähnt, dass ein chemischer Katalysator für eine solche Reaktion unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen bislang unbekannt ist. Die Katalyse mit dieser Enzymklasse der Aldoximdehydratasen wird von uns seit vielen Jahren gemeinsam im Rahmen einer langjährigen Zusammenarbeit mit Yasuhisa

Asano, Toyama Prefectural University, Japan, untersucht [5], wobei auch ein Einblick in die ungewöhnliche Stereochemie der durch diese Enzymklasse katalysierten Reaktionen eröffnet werden konnte [6]. Bereits in den einleitenden Prozessentwicklungsarbeiten für Adiponitril zeigte sich eine hohe katalytische Effizienz mit über 99 Prozent Umsatz bei einer Substratbeladung von 50 Gramm pro Liter. Die Umsetzung verlief zudem auch bei 100 Gramm pro Liter, allerdings in diesem Fall mit bislang etwas niedrigerem Umsatz von 75 Prozent. Einen weiteren Vorteil des Verfahrens stellt die glatt verlaufende Bildung des als Substrat benötigten Bis-Aldoxims dar. Eine aktuelle Herausforderung besteht in der Entwicklung eines effizienten chemischen Zugangs zum stabilitätslabilen Bis-Aldehyd, wobei dieser ggf. *in situ* gebildet und unter Kondensation mit Hydroxylamin und Ausbildung des Bis-Aldoxims „abgefangen“ werden kann.

Biokatalyse für Schmierstoffkomponenten: enzymatische Herstellung von Fettnitrilen

Als Beispiel für eine perspektivische industrielle Anwendung dieser Enzymklasse im Bereich der Spezialchemikalien sei die Produktion von Fettnitrilen auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen genannt. Fettnitrile stellen Ausgangsverbindungen für die unter



▲ **Abb. 3:** Alternative Herstellverfahren des pharmazeutischen Wirkstoffs Ozanimod durch chemoenzymatische Synthesen mit biokatalytischen Schlüsselschritten unter Einsatz einer Transaminase bzw. Lipase.

anderem als Schmierstoffe, Dispersionsmittel und Emulgatoren industriell eingesetzten Fettamine dar und wurden bereits im Jahr 2011 im 800.000-Tonnen-Maßstab benötigt [7]. In einem vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) sowie der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) geförderten gemeinsamen Forschungsprojekt mit dem Schmierstoffunternehmen Klüber Lubrication gelang uns hierbei der Zugang zu solchen Fettnitrilen ausgehend von Fettaldehyden als attraktive Substratklasse mit außerordentlich hohen Substratkonzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten (**Abb. 2**, untere Reaktionsgleichung, [8, 9]). So verläuft in Gegenwart des Biokatalysators die Umsetzung von 665 Gramm Substrat pro Liter quantitativ, und selbst bei einer Substratmenge von 1,4 Kilogramm des Aldoxims pro Liter Reaktionsmedium wird das gewünschte Produkt *n*-Oktannitril mit 93 Prozent Umsatz gebildet [8]. Diese Umsetzungen stellen eine der höchsten bislang in der Biokatalyse berichteten Substratkonzentrationen dar. Ein weiterer Vorteil der Synthese im Hinblick auf industrielle Anwendungen ist die äußerst einfache Aufarbeitung. So kann die organische Produktphase nach erfolgter Reaktion durch einfache Phasentrennung abgetrennt werden, optional gefolgt von weiteren Extrak-

tionsschritten. Zudem sind die als Substrat benötigten Fettaldoxime durch eine einfache Kondensationsreaktion ausgehend vom entsprechenden Aldehyd und Hydroxylamin in einer spontan verlaufenden Umsetzung zugänglich. Für Fettaldehyde wiederum gibt es im Allgemeinen eine Vielzahl von effizienten Syntheseverfahren.

Biokatalyse für Pharmazeutika: chemoenzymatische Herstellung von Ozanimod

In Bezug auf Produktionsvolumen und Stückkosten befinden sich die Fein- und Pharmachemikalien im industriellen Produktstammbaum entgegengesetzt zu den Bulkchemikalien. Diese Fein- und Pharmachemikalien weisen in zahlreichen Fällen eine komplexe, oftmals erst durch viele Reaktionsstufen zugängliche Produktstruktur auf, werden aber in deutlich niedrigeren Mengen hergestellt. Die Herstellung findet dabei oftmals in Mehrzweckanlagen statt. Eine aktuelle Herausforderung für die Biokatalyse besteht darin, wie diese möglichst vorteilhaft in ein solches von klassisch chemischen oder chemokatalytischen Reaktionsstufen geprägtes Gesamtverfahren integriert werden kann. Hierbei spielt nicht nur die Effizienz der Bio-transformation eine Rolle, sondern auch der

Einbezug attraktiver Ausgangsverbindungen. Die vielseitigen Möglichkeiten der Biokatalyse für die Realisierung neuartiger Arzneistoffsynthesen seien nachfolgend am Beispiel eines kürzlichen Kooperationsprojekts mit dem Unternehmen PharmaZell aufgezeigt (**Abb. 3**, [10]). Als Zielprodukt fungierte das (*S*)-4-Cyano-1-aminoindan („(*S*)-Amin“ in **Abb. 3**), das eine Schlüsselzwischenstufe für den in Phase III befindlichen und vom Unternehmen Receptos entwickelten Wirkstoff Ozanimod bildet [11]. Der Arzneistoff Ozanimod gilt als vielversprechendes Medikament gegen multiple Sklerose, und dessen pharmazeutische Bedeutung sowie das damit verbundene ökonomische Potenzial wird durch die kürzliche Übernahme der Firma Receptos durch das Unternehmen Celgene für 7,2 Milliarden US-Dollar unterstrichen [11]. Im Rahmen unserer Arbeiten für eine Alternativsynthese dieses (*S*)-Amins als Schlüsselbaustein bestanden die Herausforderungen darin, durch gezielte Veränderung der Syntheseroute ausgehend von einer äußerst kostengünstigen Ausgangs-Verbindung zu starten, den Einsatz problematischer Reagenzien und teurer Katalysatoren zu vermeiden und eine effiziente Einführung des Chiralitätszentrums zu ermöglichen [10]. So erforderte die bisherige Route von Receptos beispielsweise eine öko-

nomisch aufwendige und mit Selektivitätsfragen verbundene Bromierung zur Herstellung der Ausgangsverbindung. Die Einführung des Bromatoms wurde zur nachfolgenden Substitution mit Cyanid unter Verwendung erheblicher Mengen von Palladium als Schwermetallkatalysator benötigt. Durch Änderung der Gesamtsyntheseroute gelang uns der Verzicht auf diese problematischen bzw. ökonomisch anspruchsvollen Komponenten. Dabei wurde ausgehend von dem zudem wesentlich günstigeren Naphthalin mit anschließender „Standardchemie“ das gewünschte Keton erhalten [10]. Bei der Einführung des Chiralitätszentrums zeigte sich die Biokatalyse als überlegen gegenüber der bisherigen chemischen Methode unter Einsatz des teuren chiralen und in stöchiometrischen Mengen benötigten Ellman-Auxiliars. Dabei zeigten sich zwei enzymatische Lösungsansätze als grundsätzlich geeignet. So ermöglicht der Einsatz einer Transaminase eine direkte Überführung des Ketons in das gewünschte (S)-Amin. Trotz guten Umsatzes von 83 Prozent erwies sich bei dieser Biotransformation allerdings die niedrige Enantioselektivität von 25 Prozent ee (Enantiomerenüberschuss) als limitierend. Als erfolgreiche enzymatische Alternative zeigte sich eine Lipase-katalysierte Racematspaltung des chemisch gut zugänglichen racemischen Amins. Bereits in einleitenden Ver-

suchen gelang die Durchführung der Reaktion bei einer hohen Substratkonzentration von 1 M, wobei bei einem Umsatz von 58 Prozent das verbleibende, gewünschte (S)-Amin mit 99 Prozent ee erhalten wurde. Dieses Beispiel ist ein weiterer Beleg für den erfolgreichen Einsatz von Lipasen bei der Herstellung von chiralen Aminen, die z. B. bei BASF bereits seit Langem mit großem Erfolg im Multi-Tausend-Tonnen-Maßstab praktiziert wird [12].

Zusammenfassend stellt die Biokatalyse einen attraktiven Lösungsansatz für vielfältige Anwendungen im industriellen Produktstammbaum dar. ■

Literatur

- [1] Arpe H-J (2010) *Industrial Organic Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim
- [2] European Cluster on Catalysis (2016) *Science and Technology Roadmap on Catalysis for Europe – A Path to Create a Sustainable Future*, http://lib.sioc.ac.cn/tsg_admin/upload/myupload_4622.pdf
- [3] Drauz K, May O, Gröger H (Hrsg) (2012) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Band 1–3, Wiley-VCH, Weinheim
- [4] Betke T, Maier M, Gruber-Wöfler H et al. (2018) Biocatalytic production of adiponitrile and related aliphatic linear α,ω -dinitriles. *Nat Commun* 9:5112
- [5] Betke T, Higuchi J, Rommelmann P et al. (2018) Biocatalytic synthesis of nitriles through dehydration of aldoximes: the substrate scope of aldoxime dehydratases. *Chembiochem* 19:768–779
- [6] Betke T, Rommelmann P, Oike K et al. (2017) Cyanide-free and broadly applicable enantioselective synthetic platform for chiral nitriles through a biocatalytic approach. *Angew Chem Int Ed Engl* 56:12361–12366
- [7] Breitbach ZS, Weatherly CA, Woods RM et al. (2014) Development and evaluation of gas and liquid chromatograph-

ic methods for the analysis of fatty amines. *J Sep Sci* 37:558–565

[8] Hinzmann A, Glinski S, Worm M et al. (2019) Enzymatic synthesis of aliphatic nitriles at a substrate loading of up to 1.4 kg/L: a biocatalytic record achieved with a heme protein. *J Org Chem* 84:4867–4872

[9] Plass C, Hinzmann A, Terhorst M et al. (2019) Approaching bulk chemical nitriles from alkenes: a hydrogen cyanide-free approach through a combination of hydroformylation and biocatalysis. *ACS Catal* 9:5198–5203

[10] Uthoff F, Löwe L, Harms C et al. (2019) Chemoenzymatic synthesis of a chiral ozanimod key intermediate starting from naphthalene as cheap petrochemical feedstock. *J Org Chem* 84:4856–4866

[11] Jarvis L (2015) Celgene buys Receptos to capture potential immunology drug. *Chem Eng News* 93:9

[12] Breuer M, Ditrich K, Habicher T et al. (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:788–824



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Harald Gröger
Lehrstuhl für Industrielle Organische Chemie und Biotechnologie
Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25
D-33615 Bielefeld
Tel.: 0521-106-2057
harald.groeger@uni-bielefeld.de