

Biokatalyse

Kompartimentierung bei den Enzymkaskaden: statisch oder Durchfluss

SELIN KARA¹, JAN VON LANGERMANN²

¹ DEPARTMENT OF ENGINEERING, UNIVERSITÄT AARHUS, DÄNEMARK

² INSTITUT FÜR CHEMIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK

Development of efficient enzymatic reaction cascades necessitates individual and careful handling of reaction conditions, which may differ from one enzymatic step to another one. Compartmentalization is a key solution that can be either done under static or flow conditions. The recent developments enable the use of different strategies, materials and set-ups, which can be applied based on the requirements of different bioprocesses.

DOI: 10.1007/s12268-020-1348-8

© Die Autoren 2020

■ Enzymatische Kaskadenreaktionen bzw. Multienzymreaktionen (MERs) setzen sich aus zwei oder mehr biokatalytischen Reaktionssystemen zusammen und ermöglichen die mehrstufige Synthese interessanter Zielprodukte ohne eine Isolierung der intermediären Verbindungen [1–3]. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Enzymkaskaden für unterschiedlichste chemische Anwendungen entwickelt und erfolgreich bis in den technischen Maßstab hochskaliert.

Das Syntheseprinzip der Enzymkaskaden entspricht im Grundprinzip den natürlichen

Synthesestrategien in biologischen Systemen, welche ebenso stark integrierte Reaktionswege für die unterschiedlichsten Synthesewege beinhalten. Diese involvieren zusätzlich innerhalb der physiologischen Organisation in einer Zelle die Kompartimentierung und Ko-Lokalisierung, womit eine Unterteilung separater Reaktionsräume gewährleistet wird. Die Größenordnung der Kompartimentierung bewegt sich dabei üblicherweise von Zellmembranen bis hin zu ganzen Organsystemen, wobei auch membranfreie Systeme für die Kompartimentierung

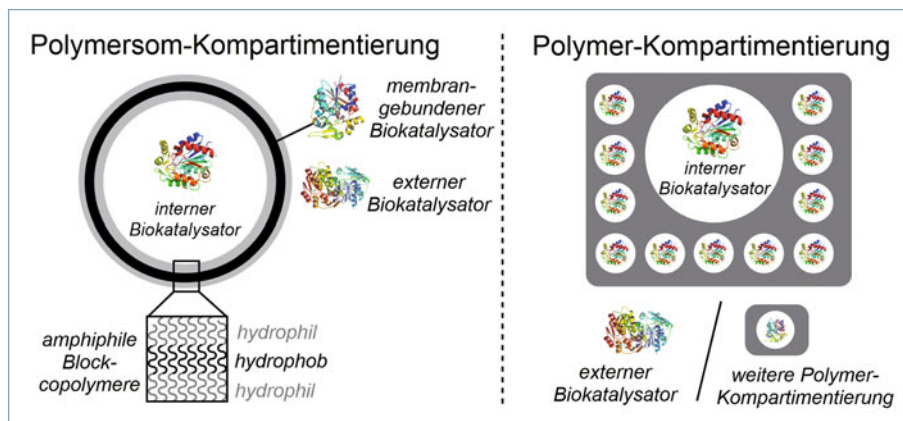
beschrieben wurden. In der einfachsten Definition stellen damit Organellen innerhalb einer Zelle eine Kompartimentierung gegenüber dem umgebenden innerzellulären Medium dar.

Für die Anwendung in synthetischen Fragestellungen werden dagegen bevorzugt chemische Varianten der Kompartimentierung und Ko-Lokalisierung eingesetzt, welche aber prinzipiell analog zu den biologischen Systemen betrachtet werden können [4]. In diesem Übersichtsartikel werden aktuelle Entwicklungen zur Kompartimentierung und deren Anwendung für statische und Durchfluss-Anwendungen vorgestellt sowie die entsprechenden Vorteile und Limitierungen besprochen.

Kompartimentierung von Enzymkaskaden – „statisch“

Die grundlegende Abtrennung einer inkludierten Phase (des Kompartiments) von einem äußeren Reaktionsmedium erfolgt in synthetischen Enzymkaskaden über Membranen bzw. membranähnliche Strukturen, welche dabei ggf. eine Trennstufe im Sinne eines thermischen Trennverfahrens darstellen. In diesem Zusammenhang sind in der Fachliteratur verschiedenste Techniken beschrieben worden, die eine Trennung von Reaktionsräumen beschreiben. Beispiele beinhalten unter anderem Proteinkäfige, Viruskapside, Polymersome, Pickering-Emulsionen und makroskopische Polymerkompartimentierungen [5]. Der Stofftransport der Reaktanden erfolgt in der Regel diffusiv oder durch gerichtete Prozesse in und aus dem Kompartiment. Durch die gezielte Auswahl bzw. Modifikation der Grenzfläche können zudem gerichtete Transportvorgänge für Lösungsmittel und Reaktanden eingestellt werden. Dies ermöglicht eine weitere Kontrolle der Kaskadenreaktion.

Beschrieben wurde beispielsweise die Verwendung von Polymersomen für biokatalytische Kaskadenreaktionen, die eine zellähnliche Kompartimentierung von Reaktionsphasen ermöglichen. Polymersome stellen sphärische Hohlvesikel aus amphiphilen



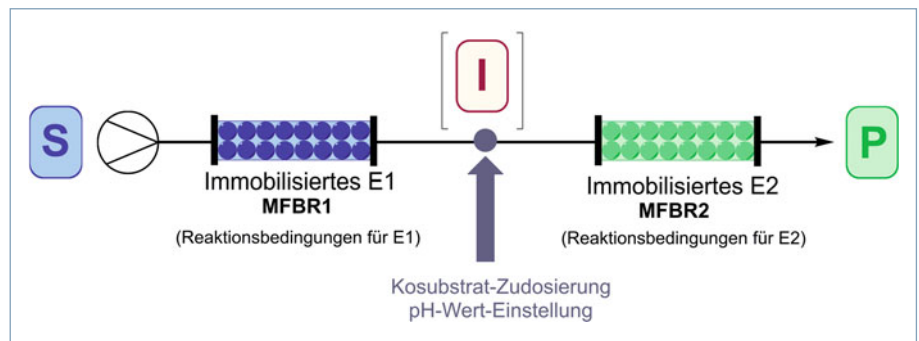
▲ **Abb. 1:** Exemplarische Darstellung von Polymersom- (links) und Polymer-Kompartimentierungen (rechts) für biokatalytische Kaskadenreaktionen. Die interne Reaktionsphase ist über die Kompartimentierung vollständig vom externen Lösungsmittel abgetrennt, während die relevanten Reaktanden sich frei zwischen den Lösungsmittelphasen bewegen können.

Block-Ko-Polymeren dar, welche durch Selbstorganisation eine wässrige Phase einschließen und hierüber separierte Reaktionsräume für Enzymkaskaden generieren (**Abb. 1**, links, [6]). Weitere biokatalytische Reaktionssysteme können innerhalb der Kaskadenreaktion als membrangebundene oder externe Biokatalysatoren hinzugegeben werden. Zum Beispiel beschrieben L. Klermund et al. die kompartimentierte Verwendung einer Kaskade aus N-Acylglucosamin-2-Epimerase, N-Acetylneuraminatylase und CMP-Sialinsäuresynthetase für die Darstellung von CMP-N-Acetylneuraminsäure [7]. Zum Einsatz kam das membranfunktionalisierte ABA-Triblock-Ko-Polymer Poly(2-methyl-oxazolin)-poly(dimethylsiloxan)-poly(2-methyl-oxazolin), welches über die Integration des *outer membrane protein F* (OmpF) die Diffusion einiger Reaktanden kontrolliert.

Eher makroskopische Lösungen sind z. B. durch den Einsatz von polymerbasierten Kompartimentierungslösungen möglich, die ein biokatalytisches Reaktionssystem innerhalb einer kontinuierlichen Polymerphase einschließen (**Abb. 1**, rechts). Die Darstellung erfolgt entweder mit einer vorgeformten Polymerhülle, welche dann mit dem Biokatalysator befüllt wird, oder durch Bildung einer temporären Emulsion aus dem hydrophoben Präpolymer und der wässrigen Lösung mit einer anschließenden Wärme- oder UV-Licht-induzierten Aushärtung. Ein Beispiel sind Reaktionskaskaden mit einer Alkoholdehydrogenase-Hydroxynitrilase-Kombination in separierten Reaktionsräumen [8]: Hier verbleiben die Biokatalysatoren in separierten Reaktionsräumen mit den jeweiligen optimalen Reaktionsbedingungen, während die Reaktanden frei zwischen den Kompartimenten diffundieren. Das Konzept findet darüber hinaus Anwendung in chemoenzymatischen Reaktionen, z. B. beschrieben durch N. Zumbrägel und H. Gröger für eine Asinger-Multikomponentenreaktion mit einer nachgeschalteten Iminreduktase-katalysierten Reduktion zum finalen zyklischen Amin [9].

Kompartimentierung von Enzymkaskaden – „Durchfluss“

Die kontinuierliche Durchflusstechnologie ist zu einem schnell wachsenden Forschungsgebiet geworden und hat in kurzer Zeit großes Interesse für die enzymatische Synthese von Pharma- und Feinchemikalien geweckt [10–12].



▲ **Abb. 2:** Darstellung eines kontinuierlichen Durchflussverfahrens, wobei das Enzym 1 (E1) und Enzym 2 (E2) auf festen Trägern immobilisiert sind und von einer Lösungsmittelphase inklusive der gelösten Reaktanden überströmt werden. Zwischen den Enzymen erfolgt eine Zudosierung der Ko-Substrate sowie eine Einstellung des pH-Wertes. Das Produkt wird nach der Umsetzung durch E2 aufgefangen. MFBR: miniaturisierter Durchflussbioreaktor (*miniaturized flow bioreactor*); S: Substrat; I: Intermediat; P: Produkt.

Miniaturisierte Durchflussbioreaktoren (*miniaturized flow bioreactors*, MFBRs) können für kontinuierliche Bioprozesse eingesetzt werden und haben gegenüber satzbetriebenen klassischen Rührkesselreaktoren folgende Vorteile:

- höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und verkürzte Reaktionszeiten aufgrund eines besseren Wärme- und Stoffübergangs,
- geringer Platzbedarf aus Sicht der Ausrüstung,
- Erleichterung der Kapazitätserhöhung durch *Numbering-up*,
- reduziertes Risiko im Zusammenhang mit der Ansammlung und Lagerung gefährlicher Zwischenprodukte,
- verminderter Verlust der Enzymaktivität im Vergleich zur Verwendung von immobilisierten Enzymen in Rührkesselreaktoren und
- reduzierte Produkthemmungsprobleme durch kontinuierliches Entfernen von Produkt(en).

MFBRs ermöglichen darüber eine nachhaltige Synthese, da die Optimierung der Reaktionsparameter im Hochdurchsatzmaterial-, zeit- und energieeffizient durchgeführt werden können. Es handelt sich um Mikromaßstab- oder Mesomaßstabreaktoren, deren charakteristischen Vor- und Nachteile bekannt sind [13, 14]. Erstere betreffen hauptsächlich mikrofluidische Geräte mit Kanälen oder Röhrchen mit Innendurchmessern von 10–500 Mikrometern und Reaktorvolumina im Mikroliterbereich, während die Mesomaßstabreaktoren Innendurchmesser von 500 Mikrometern bis zu wenigen Millimetern aufweisen, die Volumina von wenigen Millilitern entsprechen. Insbesondere bei Enzymkaskadenreaktionen hat die kon-

tinuierliche Strömungstechnologie großes Aufsehen erregt, da eine mehrkatalytische und -stufige Reaktion eine Mehrparameteraufgabe darstellt, die gleichzeitig ganzheitlich und effizient gehandhabt werden muss. Die enzymkatalysierten Reaktionsschritte, die verschiedene Reaktionsbedingungen benötigen, können durch MFBRs im seriellen Aufbau durchgeführt werden (**Abb. 2**). Die Einstellung des pH-Wertes oder der Temperatur sowie die Zudosierung des Ko-Substrats ist direkt zwischen MFBRs möglich, womit Enzymreaktionen bei jeweils optimalen Reaktionsbedingungen stattfinden können.

Bei einem aktuellen Beispiel für die Strömungstechnologie einer multienzymatischen Kaskade mit vier Enzymen in einem zweistufigen Eintopfsystem enthielt jeder „Topf“ zwei Enzyme, die gemeinsam immobilisiert wurden. Die Oxidation von Chenodesoxycholsäure zum Zwischenprodukt 7-Oxolithocholsäure wurde durch eine ko-immobilisierte 7α -Hydroxysteroiddehydrogenase und Lactatdehydrogenase im ersten MFBR katalysiert. Die anschließende selektive Reduktion zu Ursodesoxycholsäure durch ko-immobilisierte 7β -Hydroxysteroiddehydrogenase und Glucosedehydrogenase erfolgte hingegen im zweiten MFBR [15]. Unter den optimierten Bedingungen konnte eine Ausbeute von ca. 100 Prozent erreicht werden bei einer Umsetzungsdauer von 12 Stunden im MFBR.

Es müssen jedoch die folgenden Herausforderungen im Zusammenhang mit der Durchflusstechnik beachtet werden:

- effiziente Kontrolle der Reaktionsbedingungen;
- effiziente Versorgung mit gasförmigen Substraten für Enzyme, z. B. Sauerstoff für Oxidasen, Oxygenasen etc.;

- potenzielle Akkumulation verbleibender bzw. nicht umgesetzter Reaktionszwischenprodukte, die zu einer Kreuzhemmung und einer schwierigen Produktisolierung führen.

Die oben aufgeführten Einschränkungen können mit verschiedensten bioverfahrenstechnischen Ansätzen überwunden werden. Beispielsweise können mit Rohr-in-Rohr-Reaktoren, bei denen das gasförmige Substrat über eine Membran diffundiert, die erforderlichen Gase in das wässrige Medium eingeleitet werden [16]. Wenn ein organisches Lösungsmittel als Substratreservoir und/oder Produktsenke in einem Zwei-Flüssigphasen-System benötigt wird, ist die kontinuierliche Strömungstechnologie gegenüber diskontinuierlichen Vorgängen von erheblichem Vorteil. Mithilfe eines kontinuierlichen Flusses kann eine feine Dispersion einer organischen Phase erreicht werden. Dies führt zu hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnissen, was eine hohe Substratbelastung und eine verbesserte Extraktion der Produkte ermöglicht. In Rührkesselreaktoren können hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnisse durch schnelles Rühren erreicht werden, wobei durch das Auftreten hoher Scherkräfte Enzymdesaktivierungen oder Schäden an Trägermaterialien auftreten können [14]. Daher bieten kontinuierlich betriebene MFBRs im Zusammenspiel mit der Kompartimentierung insgesamt ein großes Potenzial für die Prozessintensivierung.

Fazit und Perspektiven

Die Kompartimentierung von biokatalytischen Reaktionen und deren Einsatz in Enzymkaskaden kann sowohl unter statischen als auch Durchfluss-Bedingungen synthetisch sinnvoll eingesetzt werden. Die entscheidenden Vorteile für die Integration einer Kompartimentierung sind dabei die Verhinderung von Inkompatibilitäten in den Kaskadenreaktionen und damit verbunden

höhere Effizienzen und geringere Energie- und Materialeinsätze im Vergleich zu den Einzelreaktionen. Eine Grundbedingung ist selbstverständlich der inerte Charakter der Kompartimentierungslösung gegenüber dem biokatalytischen Reaktionssystem.

Des Weiteren ist Kompartimentierung perspektivisch eng mit anderen Schlüsseltechnologien aus dem Bereich der Materialwissenschaften, Mikroreakorttechnologien sowie der *On-line*-Analytik (*process analytical technologies*, PAT) verbunden, womit weitere Synergieeffekte zu erwarten sind. Dies schließt insbesondere die Verwendung von 3D-Druck-Technologien ein, welche optimale Reaktorgeometrien und darauf basierend bessere Prozessdurchführungen ermöglichen.

Literatur

- [1] Ricca E, Brucher B, Schrittwieser JH (2011) Multi-enzymatic cascade reactions: overview and perspectives. *Adv Synth Catal* 353:2239–2262
- [2] France SP, Hepworth LJ, Turner NJ et al. (2016) Constructing biocatalytic cascades: *in vitro* and *in vivo* approaches to *de novo* multi-enzyme pathways. *ACS Catal* 7:710–724
- [3] Schrittwieser JH, Velikogne S, Hall M et al. (2018) Artificial biocatalytic linear cascades for preparation of organic molecules. *Chem Rev* 118:270–348
- [4] Rabe KS, Muller J, Skoupi M et al. (2017) Cascades in compartments: en route to machine-assisted biotechnology. *Angew Chem Int Ed Engl* 56:13574–13589
- [5] Klermund L, Castiglione K (2018) Polymersomes as nano-reactors for preparative biocatalytic applications: current challenges and future perspectives. *Bioprocess Biosyst Eng* 41:1233–1246
- [6] Letchford K, Burt H (2007) A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* 65:259–269
- [7] Klermund L, Poschenrieder ST, Castiglione K (2017) Biocatalysis in polymersomes: improving multienzyme cascades with incompatible reaction steps by compartmentalization. *ACS Catal* 7:3900–3904
- [8] Uhrich D, von Langermann J (2017) Preparation and characterization of enzyme compartments in UV-cured polyurethane-based materials and their application in enzymatic reactions. *Front Microbiol* 8:2111
- [9] Zumbrägel N, Gröger H (2018) Merging heterocyclic chemistry and biocatalysis in one-pot processes through compartmentalization of the reaction steps. *Bioengineering (Basel)* 5, doi: 10.3390/bioengineering5030060
- [10] Tamborini L, Fernandes P, Paradisi F et al. (2018) Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification. *Trends Biotechnol* 36:73–88
- [11] Britton J, Majumdar S, Weiss GA (2018) Continuous flow biocatalysis. *Chem Soc Rev* 47:5891–5918

[12] Sheldon RA, Woodley JM (2018) Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem Rev* 118:801–838

[13] Bolivar JM, Nidetzky B (2013) Smart enzyme immobilization in microstructured reactors. *Chim Oggi/Chem Today* 31:50–54

[14] Žnidaršič-Plazl P (2014) Enzymatic microreactors utilizing non-aqueous media. *Chim Oggi/Chem Today* 32:54–60

[15] Zheng MM, Chen FF, Li H et al. (2018) Continuous production of ursodeoxycholic acid by using two cascade reactors with co-immobilized enzymes. *ChemBiochem* 19:347–353

[16] Tomaszewski B, Schmid A, Buehler K (2014) Biocatalytic production of catechols using a high pressure tube-in-tube segmented flow microreactor. *Org Process Res Dev* 18:1516–1526

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Jan von Langermann und Selin Kara

Korrespondenzadressen:

Dr. Jan von Langermann
Biokatalytische Synthese
Institut für Chemie
Universität Rostock
Albert-Einstein-Straße 3a
D-18059 Rostock
jan.langermann@uni-rostock.de

Assoc. Prof. Dr. Selin Kara
Department of Engineering
Biological and Chemical Engineering Section
Biocatalysis and Bioprocessing Group
Aarhus Universität
Gustav Wieds Vej 10
DK-8000 Aarhus
selin.kara@eng.au.dk