

3 Einleitung

3.1 Biokatalyse

Der Grundstein der Biokatalyse wurde im frühen 19. Jahrhundert mit der Entdeckung der sogenannten Diastase, einer Mischung von Amylasen, gelegt, die Stärke zu Dextrose und Zucker zersetzte (Bornscheuer und Bucholz 2005). Mit Entdeckung und Charakterisierung der Enzyme im späten 19. Jahrhundert wurden wichtige Kenntnisse über die Natur biokatalytischer Prozesse erlangt. So war bereits Emil Fischer 1894 davon überzeugt, dass Enzyme Proteine sind. Er erkannte die Substratspezifität als eines der Hauptmerkmale von Enzymen und leitete daraus das bekannte Bild von „Schlüssel und Schloss“ ab. Einige Jahre später entdeckte Eduard Buchner, dass für die alkoholische Fermentation keine ganzen Hefezellen, sondern nur eine lösliche Substanz, zweifelsfrei mit den Eigenschaften eines Proteins, die er „Zymase“ nannte, notwendig war (Buchner und Rapp 1898). Der endgültige Nachweis, dass Enzyme Proteine sind, konnte in den zwanziger und dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts von Sumner, durch die Kristallisierung von Urease, und von Kunitz und Northrup durch die Kristallisierung von Trypsin und anderen Enzymen, erbracht werden (Sumner und Myrbäck 1950).

In den 1930er Jahren wurden gezielt enzymatische Reaktionen in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Die geringe Lebensdauer und die mangelnde Möglichkeit die Enzyme aus den Reaktionsansätzen zurückzugewinnen, veranlasste um 1950 einige Arbeitsgruppen, Enzyme an festen Phasen zu immobilisieren (Grubhofer und Schleith 1953; Manecke und Gillert 1955). Im Jahr 1972 wurden immobilisierte Enzyme erstmals industriell in der Produktion von Aminosäuren eingesetzt (Mori *et al.* 1972). Der industrielle Einsatz von Enzymen wurde dadurch wirtschaftlicher, denn die bis dato in der Gewinnung sehr teuren Enzyme konnten, an Membranen oder größere Partikel adhärirt, aus den Produktionsansätzen zurückgewonnen und somit wiederverwendet werden (Hartmeier 1985; Sheldon 2007). Die Immobilisierung brachte zudem in den meisten Fällen eine Erhöhung der Stabilität der Enzyme mit sich (Khalaf *et al.* 1996; Boller *et al.* 2002; Drauz und Waldmann 2003). Durch die Möglichkeiten der rekombinanten Expression von Enzymen in sich schnell replizierenden Organismen wie Bakterien und Hefen, erlangte die Biokatalyse im ausklingenden 20. Jahrhundert ihren heutigen Stellenwert (Bornscheuer und Bucholz 2005). Heute werden neue Enzyme aus den verschiedensten Quellen isoliert, charakterisiert und auf eine Anwendungsmöglichkeit überprüft. Mittels gentechnischer Methoden wie der gezielten oder zufälligen Mutagenese und der Erstellung ganzer Bibliotheken gelingt es durch

„high throughput screening“ und künstliche Selektion immer effektivere Varianten eines Enzyms zu finden. Somit kann die Effizienz eines entdeckten oder schon verwendeten Enzyms fortwährend verbessert werden (Bornscheuer 2005). Die Vorteile der Verwendung von Enzymen in der organischen Synthese im Vergleich mit den herkömmlichen chemischen Methoden liegen klar auf der Hand. So katalysieren Enzyme die Reaktionen spezifisch, es fallen weniger schädliche Nebenprodukte an. Die Prozesse laufen meist in wässrigem Milieu ab, so dass auch Lösungsmittel gespart werden. Vor allem aber reichen für die enzymatischen Umsetzungen milde Bedingungen aus, wohingegen für chemische Synthesewege oft hohe Temperaturen und Drücke erforderlich sind. Der Gebrauch von Enzymen ist somit gleichbedeutend mit geringeren Kosten und einer umweltschonenden und nachhaltigen Produktion (Schmid *et al.* 2001; Liese *et al.* 2006).

Große Bedeutung hat der biokatalytische Einsatz von Enzymen heute vor allen Dingen in der Synthese chiraler Komponenten. So ist es durch enzymatische Synthese möglich, gezielt enantiomerenreine Ausgangsstoffe zur Darstellung von Arzneistoffen zu gewinnen (Patel 2001). Synthesen zur Gewinnung von Enantiomeren laufen enzymatisch katalysiert um ein Vielfaches gezielter, ökonomischer und ökologischer ab, als auf klassischem, chemischem Wege (Breuer *et al.* 2004). Für die Produktion von Feinchemikalien setzt sich dieser Trend fort und so wurden bereits im Jahr 2005 mehr als 140 biokatalytische Prozesse zur Herstellung von Feinchemikalien, wie z.B. Ausgangsstoffen für Antibiotika oder L-Aminosäuren, industriell genutzt (Bornscheuer und Buchholz 2005).

3.1.1 Oxidoreduktasen in der Biokatalyse

Für eine Vielzahl biokatalytisch ausgeführter Prozesse werden Oxidoreduktasen eingesetzt. So kann mit Hilfe von Oxygenasen die Insertion von ein oder zwei Molekülen Sauerstoff in ein Substrat z.B. in Hydroxylierungs- oder Epoxidierungsreaktionen katalysiert werden (Li *et al.* 2002). Auch die Degradation bestimmter Umweltgifte, wie z. B. polychlorierter Biphenyle, Azofarbstoffe oder verschiedener anderer polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe, geschieht mit Hilfe von Peroxidasen oder Laccasen (May 1999; Pizzul *et al.* 2009). In der Gewinnung von Bioethanol aus cellulosehaltigem Pflanzenabfall bedient man sich der Lignin-spaltenden Eigenschaften von Laccasen und Peroxidasen pilzlichen Ursprungs (Larsson *et al.* 2001).

Von besonderem Interesse, unter anderem in der Vorstufensynthese bestimmter Arzneistoffe, wie z. B. Fluoxetin oder Atorvastatin, ist die gezielte Gewinnung chiraler Alkohole und Hydroxysäuren durch die entsprechenden Dehydrogenasen. (Kula und Kragl 1999; Panke *et al.* 2004; Broussy *et al.* 2009). Deren Abhängigkeit von

Pyridinnukleotid-Cofaktoren macht ihren Einsatz jedoch sehr teuer. Für eine wirtschaftliche, biokatalytische Anwendung von Dehydrogenasen sind somit kosteneffiziente Regenerationsmöglichkeiten für Nicotinamid-Cofaktoren erforderlich (Bornscheuer und Buchholz 2005).

3.1.1.1 Möglichkeiten zur Regenerierung von Pyridinnukleotid-Cofaktoren

Die reduzierte Form der Cofaktoren, NADH, bzw. NADPH ist teurer und weniger stabil als die oxidierte Form. Daher sind auch die Möglichkeiten zur Regenerierung von NADH und NADPH bislang erschöpfender untersucht und zur Nutzung gebracht worden. Die augenscheinlich eleganteste Lösung stellt sicherlich die Nutzung der Rückreaktion der ohnehin eingesetzten Dehydrogenase unter Verwendung eines zweiten Substrates dar. Bei dieser Methode tritt jedoch häufig eine Enzymhemmung durch die hohen Mengen des eingesetzten „Hilfs-Substrates“ ein (Kroutil *et al.* 2004). Eine stabilitätsverbesserte Weiterentwicklung dieses Modells stellen sogenannte „cross-linked-enzyme-crystals“ (CLECS) dar. Zu ihrer Erzeugung wird die Dehydrogenase in Anwesenheit des reduzierten Cofaktors NADH kristallisiert und die erhaltenen Kristalle werden mit Glutaraldehyd behandelt um die entsprechenden CLECS zu erhalten. Die Regenerierung des Cofaktors erfolgt auch hier durch den Einsatz eines „Hilfs-Substrates“ (St. Clair *et al.* 2000).

Die am häufigsten verwendete Methode zur Regenerierung von NADH ist aber der so simple wie effektive Einsatz einer zweiten Dehydrogenase. Diese setzt mit hoher Spezifität ein zweites Substrat um, welches vom eigentlichen Produktionsenzym nicht genutzt wird. Im industriellen Rahmen wird dazu bereits die Formiat-Dehydrogenase verwendet (Bommarius *et al.* 1994; Bommarius *et al.* 1998). Neueren Ergebnissen zu Folge kann eine Phosphonat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* zur effizienten Regenerierung von NADPH eingesetzt werden (Johannes *et al.* 2007).

Eine elegante Möglichkeit einer sozusagen „In-Prozess“- Regenerierung von NADH bzw. NADPH bietet sicherlich der Einsatz von Dehydrogenasen in Ganzzellsystemen (Zhao *et al.* 2002; Blank *et al.* 2010). So werden einerseits die arbeitsreiche Aufreinigung der rekombinant produzierten Dehydrogenasen vermieden und andererseits intrazelluläre Reaktionen zur Cofaktorregenerierung ausgenutzt. Die Verwendung solcher Ganzzell- Ansätze ist jedoch häufig limitiert durch zu geringe enzymatische Aktivitäten und eine begrenzte Kapazität zur Cofaktorregenerierung im Zellinneren. Außerdem muss die Membrangängigkeit von eingesetztem Substrat und erhaltenem Produkt gewährleistet sein. Ebenfalls limitierend wirken sich eine Inhibierung des Zellwachstums durch das eingesetzte Substrat oder das entstehende Produkt, und ein Wiederabbau des Produktes durch Nebenreaktionen im Zellinneren,

sowie die Entstehung von unerwünschten und schwer abtrennbaren Nebenprodukten aus (Duetz *et al.* 2001; Park 2007).

Die Regenerierung der oxidierten Reduktionsäquivalente NAD^+ bzw. NADP^+ hingegen ist bei weitem noch nicht so ausschöpfend untersucht und entwickelt. Die Regenerierung oxidierter Cofaktoren ist z. B. relevant für den Einsatz von Dehydrogenasen zur Trennung von Racematen chiraler Alkohole oder Aminosäuren. Die Trennung erfolgt dabei durch die Oxidation eines Enantiomers mit Hilfe der Dehydrogenase wobei NADH entsteht. Mit Hilfe von Dehydrogenasen können auch Ketone synthetisiert werden, die chemisch schwierig zu präparieren sind (Van Der Donk und Zhao 2003).

Zur Regenerierung von NADP^+ kann ebenfalls eine zweite Dehydrogenase und ein zweites Substrat eingesetzt werden. Zur Verwendung kommt dabei eine Glutamatdehydrogenase. Die Glutamatdehydrogenase katalysiert die Umwandlung von α -Ketoglutarat und Ammonium zu Glutamat unter Oxidation von NADPH . Für die *in situ* Regenerierung von NAD^+ aus NADH stellt die simultane Verwendung von NADH -Oxidasen eine attraktive Möglichkeit dar. Da manche dieser Oxidasen auch NADPH als Substrat akzeptieren, ist so auch die Regenerierung von NADP^+ möglich (Van Der Donk und Zhao 2003).

3.1.2 NADH-Oxidasen

NADH -Oxidasen katalysieren die Oxidation von NADH unter gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff zu a) Wasserstoffperoxid in einem zwei Elektronen übertragenden Schritt oder zu b) Wasser in einer vier Elektronen übertragenden Reaktion (Abbildung 1).

NADH -Oxidasen sind Flavoproteine und enthalten einen oder mehrere FAD -Cofaktoren, die für die Elektronenübertragung verantwortlich sind. Sie sind in der Natur weit verbreitet und kommen in den verschiedensten Organismen vor. Dabei enthalten Bakterien sowohl H_2O_2 -bildende als auch H_2O -entwickelnde NADH -Oxidasen.