

Protein- und Zell-Engineering für umweltfreundliche biokatalytische Prozesse

Protein and Cell Engineering for Eco-Friendly Biocatalytic Processes

Robert Kourist

Enzyme sind die Katalysatoren der Natur. Sie katalysieren anspruchsvolle Reaktionen unter sehr milden Reaktionsbedingungen. Eine Optimierung im Hinblick auf synthetische Anwendungen erfordert eine gute Kenntnis der molekularen Mechanismen – und eine geschickte Einbindung des Zufalls.

Zur Bewältigung der Komplexität des natürlichen Stoffwechsels entstanden in der Evolution Biokatalysatoren mit herausragender Selektivität, die man heute für biotechnologische Prozesse nutzen kann. Die Möglichkeit, zwischen Molekülen zu unterscheiden oder von mehreren möglichen Reaktionsprodukten nur eines herzustellen, erlaubt oft die Einsparung von Reaktionsschritten und vereinfacht die Aufreinigung der Reaktionsprodukte. Es reduziert Kosten, Energiebedarf und die Entstehung von Abfall. Biokatalyse kann so einen erheblichen Beitrag zur Entwicklung umweltfreundlicher Prozesse für die chemische und pharmazeutische Industrie leisten. Die Fähigkeit vieler Enzyme, nicht-natürliche Substrate umzusetzen, erlaubt ihren Einsatz zur Herstellung eines breiten Produktspektrums. Zudem katalysieren Enzyme viele Reaktionen, die für chemische Synthese zu anspruchsvoll wären. So können Enzyme selektiv Sauerstoffatome in unreaktive Moleküle einführen und stabile Bindungen wie Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen unter milden Reaktionsbedingungen selektiv brechen.

Wie bei allen katalytischen Prozessen stehen den Vorteilen der Aufwand und die Kosten der Herstellung des Katalysators gegenüber. Oft lässt sich ein Enzym mit seinen natürlichen Eigenschaften nicht einfach technisch einsetzen. Enzyme werden heute hauptsächlich im Bereich von Hochwertprodukten wie Pharmaka, Kosmetikprodukten und Lebensmittelzusätzen eingesetzt. Die Komplexität der Chemikalien und die hohen Anforderungen an die Produktreinheit führen bei chemischen Prozessen zu drastischen Abfallmengen und hohem >

Enzymes are the catalysts of nature. They catalyze challenging chemical reactions under very mild reaction conditions. An optimization of synthetic applications requires a good knowledge of their structure and their mechanisms – and a fortuitous contribution of chance.

An essential feature of the cellular metabolism is its immense complexity. To cope with this complexity, nature developed biocatalysts with outstanding selectivity. This selectivity can be utilized for the development of efficient biotechnological processes. The possibility to discriminate between very similar molecules or to selectively produce one compound from several possible products allows the number of reaction steps or synthetic routes to be reduced and the separation and purification of the reaction products to be greatly facilitated. This results in tremendous savings in terms of cost, energy and waste accumulation. Biocatalysis thus makes a significant contribution to the development of sustainable processes for the chemical and pharmaceutical industries. The capacity of many enzymes to convert non-natural substrate allows their application in the synthesis of a wide spectrum of products. On top of this, many enzymes catalyze reactions that would not be possible or would be too challenging for chemical catalysts. This includes the selective introduction of oxygen atoms into unreactive molecules and the breaking of highly stable chemical bonds, such as those between carbon-carbon atoms.

As in all catalytic processes, these advantages have to justify the cost and effort of the production of the catalyst. A large number of enzymes catalyze highly interesting reactions but do not meet all the requirements for a successful process. Nowadays, most synthetic applications of enzymes aim to manufacture high-value products, such as pharmaceutical ingredients, cosmetics and food and feed additives. The complexity of these chemicals and the high requirements regarding the purity of >



Robert Kourist leitet das Institut für Molekulare Biotechnologie und beschäftigt sich mit der molekularen Optimierung von Zellen und Enzymen und deren Einsatz für umweltfreundliche biotechnologische Prozesse.

Robert Kourist is head of the Institute of Molecular Biotechnology and specializes in the molecular optimization of cells and enzymes and their use in eco-friendly biotechnological processes.

Energiebedarf. Enzyme können hier die Nachhaltigkeit eines Prozesses deutlich verbessern. Die Biokatalyse ist in diesem Bereich oft die Methode der Wahl. Hochwertprodukte werden allerdings in relativ geringen Mengen hergestellt. Chemische Prozesse zur Herstellung von Massenprodukten produzieren generell weniger Abfall, sodass sich geringere Einsparungsmöglichkeiten ergeben. Dazu ist der Preis für Plattformchemikalien und Spezialchemikalien geringer, sodass Enzyme oft zu teuer sind. Bei der Nutzung erneuerbarer Rohstoffe in einer zukünftigen Bioökonomie kann die Biokatalyse einen wichtigen Beitrag leisten, da Enzyme zur Umsetzung biobasierter Stoffe hervorragend geeignet sind. Die Erhöhung der Effizienz biokatalytischer Prozesse zur Herstellung von biobasierten Massenprodukten und damit eine effektive Verbesserung der Kohlenstoffbilanz werden aktuell erforscht.

the products lead to considerable consumption of energy and accumulation of polluting waste. The potential of biocatalytic methods in the improvement of the environmental footprint is here very high. For the production of high-value products, biocatalysis is thus very competitive and often the method of choice. High-value products, however, are often manufactured in relatively small quantities. Due to higher cost pressure, processes for the production of specialty chemicals and commodities are usually more efficient and produce less waste. In turn, this allows less savings to be made by enzymes. Moreover, the lower price for mass products makes it more difficult to afford the cost for the catalyst production. This is an important factor in view of potential applications of biotechnological processes for the utilization of renewable resources in the future bioeconomy. In principle, enzymes are highly suitable for the conversion of bio-based molecules. The utilization of bio-based chemicals only has a beneficial effect when this can be done in large quantities. This requires a considerable increase in the efficiency of biocatalytic processes in terms of cost, waste accumulation and energy consumption.

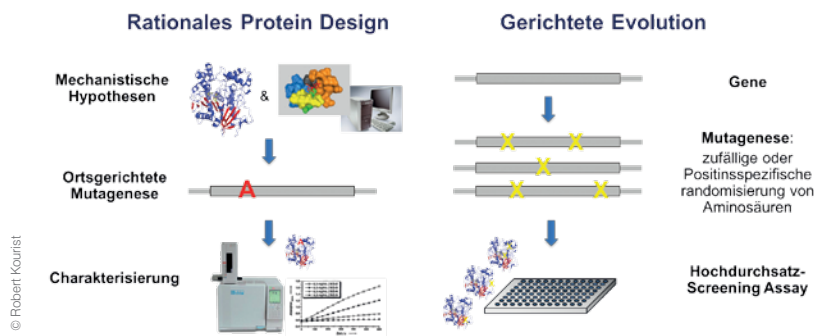


Abbildung 1:
Verständnisbasiertes und daher „rationales“ Protein-Design und molekulare Optimierungsalgorithmen wie „gerichtete Evolution“ sind komplementäre Ansätze zur Optimierung von Enzymen für biotechnologische Anwendungen.

Figure 1:
Knowledge-based and thus “rational” design of proteins and molecular optimization algorithms, such as “directed evolution”, are complementary approaches for the optimization of enzymes for biotechnological applications.

Optimierung von Enzymen

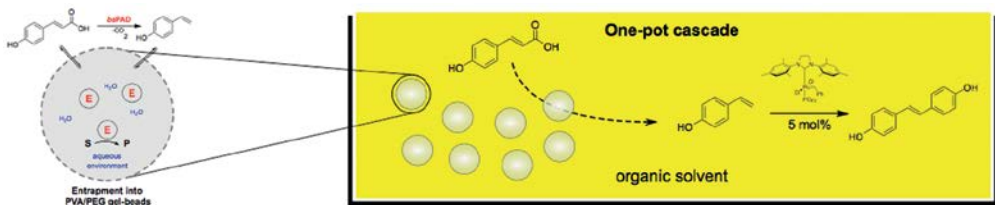
Biokatalysatoren wurden durch die Evolution für ihre Funktion unter natürlichen Bedingungen angepasst, die sich oft erheblich von denen in industriellen Prozessen unterscheiden. Eine Optimierung von Biokatalysatoren kann entweder über eine Anpassung der Reaktionsbedingungen oder ein molekulares Design erfolgen. Bei Letzterem werden Mutationen in das Gen eingefügt, die in einer veränderten Zusammensetzung des Enzyms und so in neuen Eigenschaften resultieren. Das ermöglicht eine Aktivitätssteigerung, eine angepasste Selektivität, eine höhere Stabilität oder ein erweitertes Substratspektrum. Da das molekulare Verständnis oft keine akkuraten Vorhersagen über den Effekt einer Veränderung des Enzyms erlaubt, sind randomisierte Optimierungsverfahren wichtig. Molekulare Techniken führen über das Gen verteilt oder an ausgewählten Positionen eine Reihe verschiedener Aminosäuren ein. Die so entstehende kombinatorische Vielfalt wird in Hochdurchsatz-Screening-Assays durchmustert. Eine Kombination randomisierter Verfahren mit vorhandenem Wissen ist oft Schlüssel zum Erfolg. Rationales Protein-design und gerichtete Evolution erlaubten so maßgeschneiderte Enzymvarianten.

Optimization of enzymes

Enzymes have evolved to function optimally with their natural substrates and their natural reaction conditions. These often differ significantly from those that are required for industrial processes. In principle, the optimization of a biocatalyst can be done either by reaction engineering or by molecular design. In the latter, mutations in its gene alter the structure of an enzyme, which results in modified catalytic properties. Examples for successful molecular optimizations include an adjustment of the selectivity, an increase of the stability or an expansion of the substrate spectrum. Molecular design also allows new functions to be introduced to enzymes. In many cases, our understanding of enzyme catalysis on a molecular level is not sufficient to make accurate predictions on the outcome of mutations. Therefore, randomized optimization methods play an important role in biotechnology. Introduction of sets of amino acids whether randomly or site-specifically allows mutant libraries to be generated. An evaluation of the resulting combinatory diversity in high-throughput screening assays allows enzyme variants with the desired properties to be identified. A well-planned combination of randomized approaches with the available knowledge on structure and mechanism is in many cases straightforward for the generation of tailor-made enzyme variants for catalytic processes.

Enzymes as components

Since many enzymes show outstanding activities in water and under mild reaction conditions, their



© Robert Kourist

Abbildung 2:
Die Verbindung chemischer und biokatalytischer Katalysatoren ermöglicht neue, umweltfreundliche biotechnologische Prozesse. Das Beispiel zeigt die Kombination einer enzymatischen Decarboxylierung mit der Olefin-Metathese zur Synthese biobasierter Antioxidantien. Die Abtrennung des Enzyms in Polymerkapseln ermöglichte eine Kompatibilität mit den Reaktionsbedingungen der chemischen Reaktion im organischen Lösemittel.

Figure 2:
Combining chemical and biocatalytic catalysts allows new eco-friendly biotechnological processes to be created. This example shows the combination of an enzymatic decarboxylation using olefin metathesis for the synthesis of bio-based antioxidants. The separation of the enzyme in polymeric capsules allows compatibility with the reaction conditions of the chemical reaction in the organic solvent to be achieved.

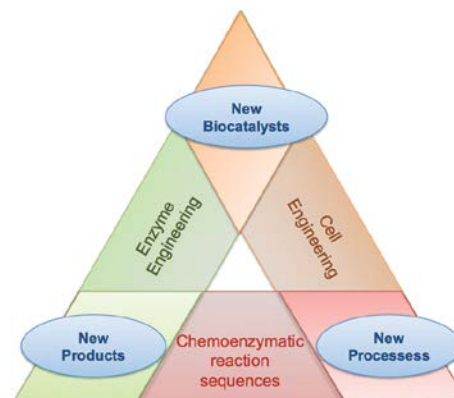
Enzyme als Bausteine

Da die meisten Enzyme in wässrigen Systemen und unter sehr moderaten Reaktionsbedingungen hervorragende Aktivitäten zeigen, können Enzyme zu Reaktionskaskaden zusammengestellt werden. Das ist ein Unterschied zu vielen chemischen Syntheserouten, in denen sich die Bedingungen der Reaktionsschritte oft drastisch unterscheiden und Kompatibilität nicht erreichbar ist. Die Aufarbeitung der intermediären Reaktionsprodukte in den Kaskadenreaktionen ist so nicht mehr nötig, was die Prozesse effizienter gestaltet. Ein weiterer Ansatz ist die Kombination von Enzymen mit chemischen Katalysatoren. Das erlaubt die Kombination der synthetischen Stärken beider Gebiete.

Enzyme aus verschiedenen Organismen unterscheiden sich oft in ihren optimalen Reaktionsbedingungen und katalysieren oft die Umsetzung der Reaktionspartner von anderen Reaktionsschritten der Kaskade. Eine erfolgreiche Etablierung und Skalierung von multi-katalytischen Reaktionskaskaden ist daher erheblich anspruchsvoller als bei Einzelreaktionen. Der Schlüssel liegt hier im erfolgreichen Zusammenspiel molekularer Ansätze wie Protein- und Zell-Engineering und verfahrenstechnischer Methoden. Trotz dieser Schwierigkeiten zeichnet sich ab, dass die Stärke von Biokatalysatoren in ihrer einfachen Anknüpfbarkeit an andere Reaktionen liegt. Das immense metabolische Potenzial von Reaktionskaskaden in lebenden Zellen und zellfreien Systemen ist nicht ausgeschöpft. Beispiele wie die Kombination von Enzymen mit chemischen Katalysatoren in Tandemreaktionen oder die Anknüpfung von Enzymen an die natürliche Photosynthese als Energiequelle unterstreichen das synthetische Potenzial der Biokatalyse. Die Komplexität der Reaktionssysteme erfordert aber eine stärkere interdisziplinäre Integration von molekularen Methoden und Prozesstechnik. Protein-Engineering ist ein effizientes Werkzeug, um Enzyme im Hinblick auf Aktivität, Selektivität und Stabilität für den Einsatz in Kaskadenreaktionen zu optimieren. ■

assembly regarding reaction cascades is often straightforward. This is different to chemical synthesis routes, where the reaction conditions differ considerably in many cases. This makes it very difficult to achieve a compatibility of the subsequent steps. Cascade reactions allow the work-up and purification of intermediate products to be saved. This results in a significant increase in the efficiency of the overall process. An extension of the concept is the combination of enzymes with chemical catalysts. This allows the strengths of both fields to be combined.

Enzymes from different organisms often show some differences regarding their optimal reaction conditions. Moreover, they often interact with the reagents of other reaction steps of the cascade. A successful establishment and scaling of a multi-step reaction cascade is therefore more difficult compared to single-step enzyme reactions. The key here is a successful integration of molecular methods, such as cell and protein engineering and process engineering. Despite these technical differences, the



© Robert Kourist

Abbildung 3:
Forschung an der Arbeitsgruppe für Biokatalyse und Enzym Engineering am Institut für Molekulare Biotechnologie. **Figure 3:**
Research in the Biocatalysis and Enzyme Engineering working group at the Institute of Molecular Biotechnology.

combination of enzymes with other catalysts is emerging as a particular strength of biocatalysis. The immense metabolic potential of reaction sequences in living cells and cell-free systems is still unexploited. Examples such as the combination of enzymes with chemical catalysts and the coupling of biocatalysts with photosynthesis as energy source underline the synthetic potential of biocatalysis. The higher complexity of these reaction systems, however, requires an interdisciplinary approach. Molecular engineering is a highly efficient tool to design biocatalysts with the desired activity, selectivity and stability for applications in cascade reactions. ■