

Biokatalyse - enzymer til organisk syntese

Brug af enzymer til organisk syntese er ikke nødvendigvis en sidste udvej når traditionelle kemiske metoder fejler. En række enzymatisk katalyserede transformationer er veldokumenterede og udføres let med kommercielt tilgængelige enzymer. Det illustreres her med eksempler på reaktioner katalyseret af en immobiliseret lipase, *Novozym 435*

Af Jesper Brask, Novozymes A/S

Katalyse i organisk kemi har potentiale til at levere hurtigere reaktioner under mildere betingelser i færre trin (uden beskyttelsesgrupper, m.m.). Katalytiske reaktioner kan opdeles i de kemisk katalyserede og de biokatalyserede. For førstnævntes vedkommende har der i de seneste årtier været meget fokus på overgangsmetalkomplekser [1]. Biokatalyse området kan opdeles i brug af isolerede enzymer eller hele celler. Hele, døde eller levende celler anvendt til organisk syntese katalyserer ofte kun et enkelt procestrin. I modsætning hertil benyttes "metabolic engineering" til at få levende mikroorganismer til at omdanne simple substrater til komplekse produkter [2]. Denne artikel fokuserer dog udelukkende på brugen af isolerede enzymer som et værktøj til organisk syntese.

Blandt syntesechemikere var det i mange år en udbredt opfattelse at enzymer er skrøbelige molekyler som kun virker i vandig opløsning. De seneste 20 år er der dog publiceret talrige eksempler på enzymer, der virker under betingelser, der ligger meget langt fra hvad enzymerne er designet til fra naturens side. "Opdagelsen" at nogle enzymer også har aktivitet i organiske solventer tillægges ofte Klivanov, selvom der er tidligere eksempler. Ofte er ikke-vandige solventer påkrævet

p.g.a. opløselighedsproblemer eller for at drive en reaktion til en ønsket ligevægt (f.eks. lipase-katalyseret hydrolyse/kondensation). Mens biokatalyse tidligere ofte blev anset som en sidste og usandsynlig udvej når alle andre muligheder var udtømte, er det nu en etableret disciplin der sideløbende komplementerer klassisk organisk syntese inden for farma- og anden kemisk industri. Fordelene ved biokatalyse er da også indlysende, idet enzymer ofte tilbyder fremragende kemo-, regio- og/eller enantioselektivitet under milde reaktionsbetingelser.

Populære enzymer til biokatalyse

Mange farmaceutiske virksomheder har nu egne mikrobiologiske- og molekylærbiologiske afdelinger, der kan levere enzymer til screening af ønskede transformationer. I universitetsmiljøerne er lignende samarbejder ofte mulige. Alternativt kan kommercielt tilgængelige enzymer afprøves. Heldigvis findes de i stort antal, hvor de kan købes direkte fra de store producenter (som Novozymes), eller – specielt hvis der er tale om små mængder – fra distributører og mindre enzymproducenter der fokuserer på biokatalyse (BioCatalytics, Amano, etc.). Her kan man også ofte købe "kits" indeholdende en række enzymer med ►

Kontinuerlig måling af viskositet

Unikt in-line viskosimeter for alle typer væsker og flydende medier, som f.eks. mayonaise, ketchup, sennep, yoghurt, sirup salatdressing og gelatine.

Viskosimetret måler ved høj frekvens, og giver derfor en nøjagtig og repeterbar måleværdi, der er egnet til processtyring og kontrol.



Sensorstave og transmitter

- Kontinuerlig måling i alle typer pumpbare og flydende medier.
- Kan monteres ganske tæt på rør- eller tankvæg.
- Standard-, sanitære-, højtemperatur-, Ex og specialsensorer til ethvert formål (også laboratorie).
- Transmitter med indgang for proces-temperatur til korrektion af viskositet.

Bygstubben 6 | 2950 Vedbæk

Telefon: +45 39 903 905 | www.contech.dk

CONTECH
INSTRUMENTERING

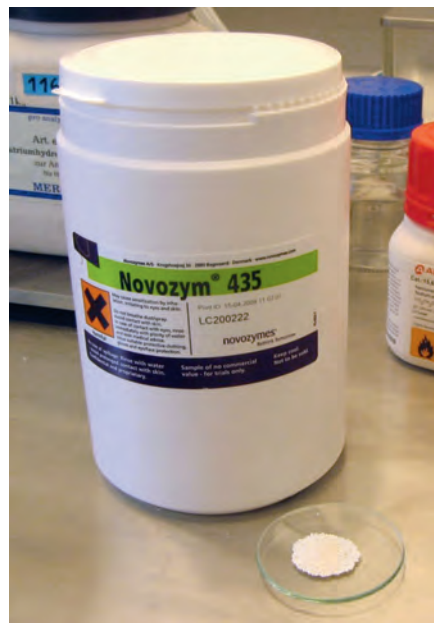
Faktaboks 1: Enzymklassificering

Enzymer kan klassificeres efter deres funktion efter EC systemet, hvor en 4-cifret kode angiver hovedklasse og underklasser. De seks EC hovedklasser er:

- 1) Oxidoreduktaser. Disse enzymer katalyserer redox-reaktioner. Eksempler er oxidaser der katalyserer oxidationer ved at reducere O_2 og peroxidaser der reducerer H_2O_2 , laccaser (EC 1.10.3.2) der er oxidaser der katalyserer oxidationen af (poly)phenoliske substrater, og reduktaser og dehydrogenaser (EC 1.1.1) der reducerer carbonyl-forbindelser v.h.a. NADH/NADPH co-faktorer.
- 2) Transferaser. Disse enzymer flytter en gruppe (f.eks. alkyl eller glycosyl) fra substrat til acceptor-forbindelse.
- 3) Hydrolaser. Katalyserer hydrolyse af C-O og C-N (og få andre) bindinger. Eksempler på underklasser er: 3.1 esteraser (inklusiv 3.1.1.3 lipaser), 3.2 glycosidaser, 3.4 peptidaser.
- 4) Lyaser. Disse enzymer kløver typisk C-C, C-O eller C-N bindinger ved elimination, hvorved der typisk efterlades dobbeltbindinger.
- 5) Isomeraser. Et industrielt vigtigt eksempel er glucose isomerase (EC 5.3.1.18) der katalyserer isomeriseringen af D-glucose til D-fructose.
- 6) Ligaser. Kobler hydrolyse af ATP eller lignende til dannelsen af højenergi-bindinger mellem to substrater.

forskellige specificitet. Kemikalieleverandøren Sigma-Aldrich har en bred vifte af enzymer til biokatalyse, inklusiv Novozym 435, der omtales senere.

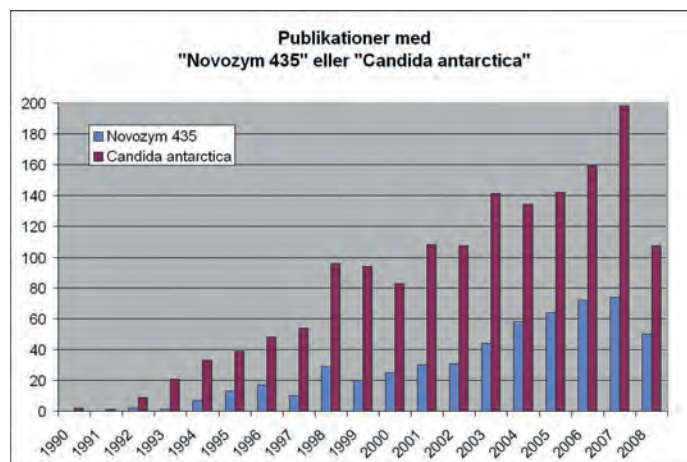
Enzymer katalyserer forskellige klasser af meget forskellige reaktioner (se Faktaboks 1), men ikke alle er lige relevante eller egnede til organisk syntese. De mest populære enzymer til biokatalyse synes at være:



Figur 1. Novozym 435 består af lipasen CALB adsorberet på en porøs poly-methylmethacrylat resin og kan anvendes til en række organisk syntese reaktioner.

1) Lipaser. Den mest anvendte enzymklasse til biokatalyse, eftersom lipaser typisk accepterer en lang række substrater og er meget stabile i ikke-vandige systemer. Lipaser udnyttes således i hydrolyse og acyleringsreaktioner, hvor ligevægten er kontrolleret af vand aktiviteten, og ofte med kemo-, regio-, og/eller enantioselektiv kontrol. Med amin-nucleophiler kan lipaser tillige lave amider, d.v.s. syntesen af disse er ikke begrænset til peptidaser. Serinhydrolase lipaser og peptidaser testes da også ofte til de samme biokatalytiske

reaktioner. Til acyleringsreaktioner benyttes typisk aktiverede acyl-donorer som vinyl estre eller syreanhydrid. Med vinyl



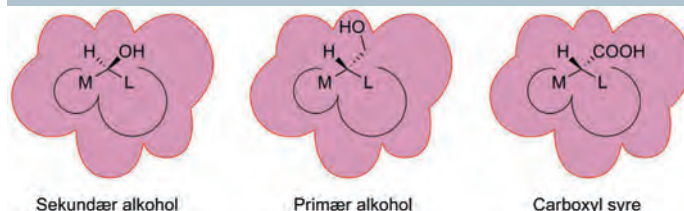
Figur 2. Det årlige antal publikationer med Novozym 435 eller Candida antarctica er stadig stigende. Disse er stort set alle relateret til biokatalyse. "Web of Science" søgning juli 2008.

estre er reaktionen drevet af, at vinyl alkohol tautomeriserer til flygtig acetaldehyd. Sådanne aktiverede acyl-donorer reagerer dog spontant med primære aminer, hvorfor ethylacetat typisk benyttes til acylering (acetylering) i disse tilfælde.

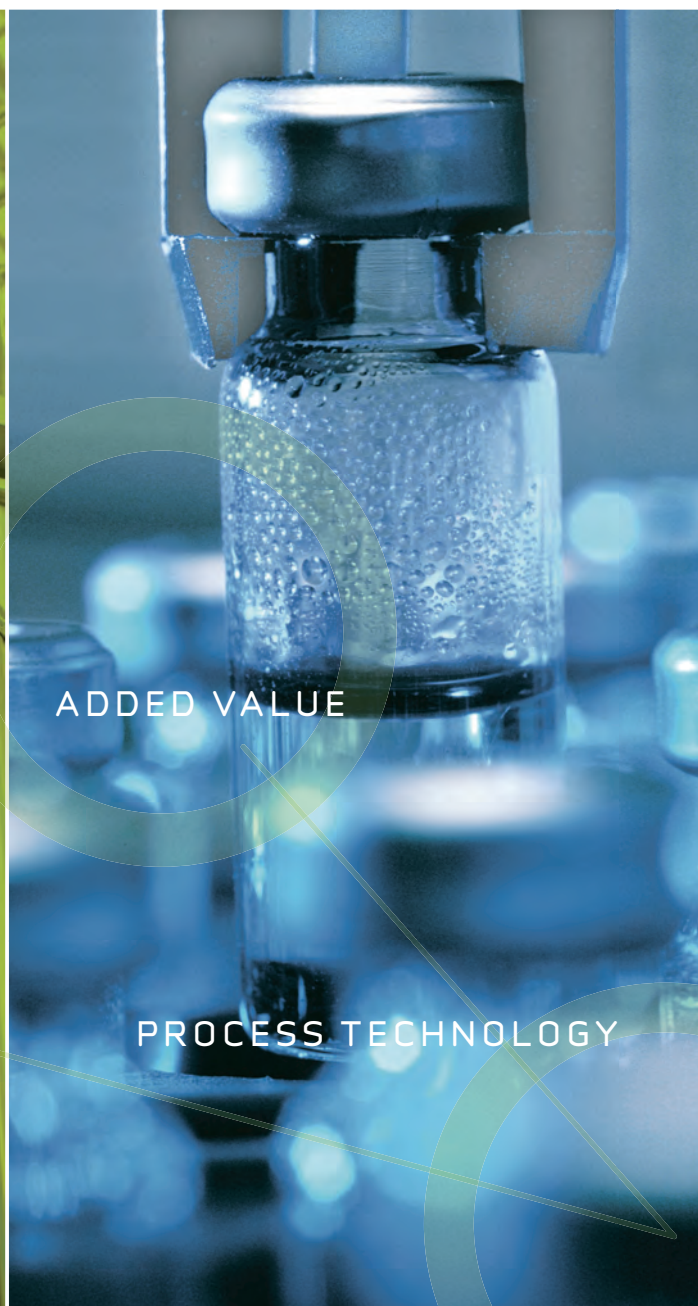
2) Oxidoreduktaser. Alkohol dehydrogenaser (ADH) har fundet værdifulde anvendelser inden for enantioselektive keton reduktioner, der sammen med enantioselektive hydrolyse og acyleringsreaktioner dominerer farma-områdets brug af biokatalyse. Oxidaser som cyclohexanonmonooxygenase (CHMO) anvendes til selektive Baeyer-Villiger reaktioner og laccaser har ▶

Faktaboks 2: Kazlauskas' regel

Lipaser udviser ofte fremragende enantioselektivitet ved kinetisk resolvering af sekundære alkoholer, mens primære og tertiære alkoholer generelt er mere udfordrende. "Kazlauskas' regel" forudsiger hvilken enantiomer der reagerer hurtigst ved acylering af en sekundær alkohol [10]. Modellen er gengivet nedenstående (Figur 4) sammen med tilsvarende, men mindre pålidelige modeller for visse chirale primære alkoholer [11] og carboxylsyre [12]. "M" og "L" angiver "medium" og "large" substituent. Ifølge denne model er det typisk (R)-formen af en sekundær alkohol der acyleres hurtigst, eller – for den modsat rettede hydrolyse reaktion – (R)-formen af den modsvarende ester, der hydrolyseres hurtigst. Jo større størrelsesforskellen er mellem "M" og "L", jo bedre enantioselektivitet. Meget store, forgrenede substituent kan dog betyde at substraterne ikke kan være i enzymets aktive site og derfor ikke omsættes. Kazlauskas's regel gælder også for isosteriske primære aminer (M-CHNH₂-L), og har vist sig at passe for en meget bred vifte af lipase-katalyserede resolveringer.



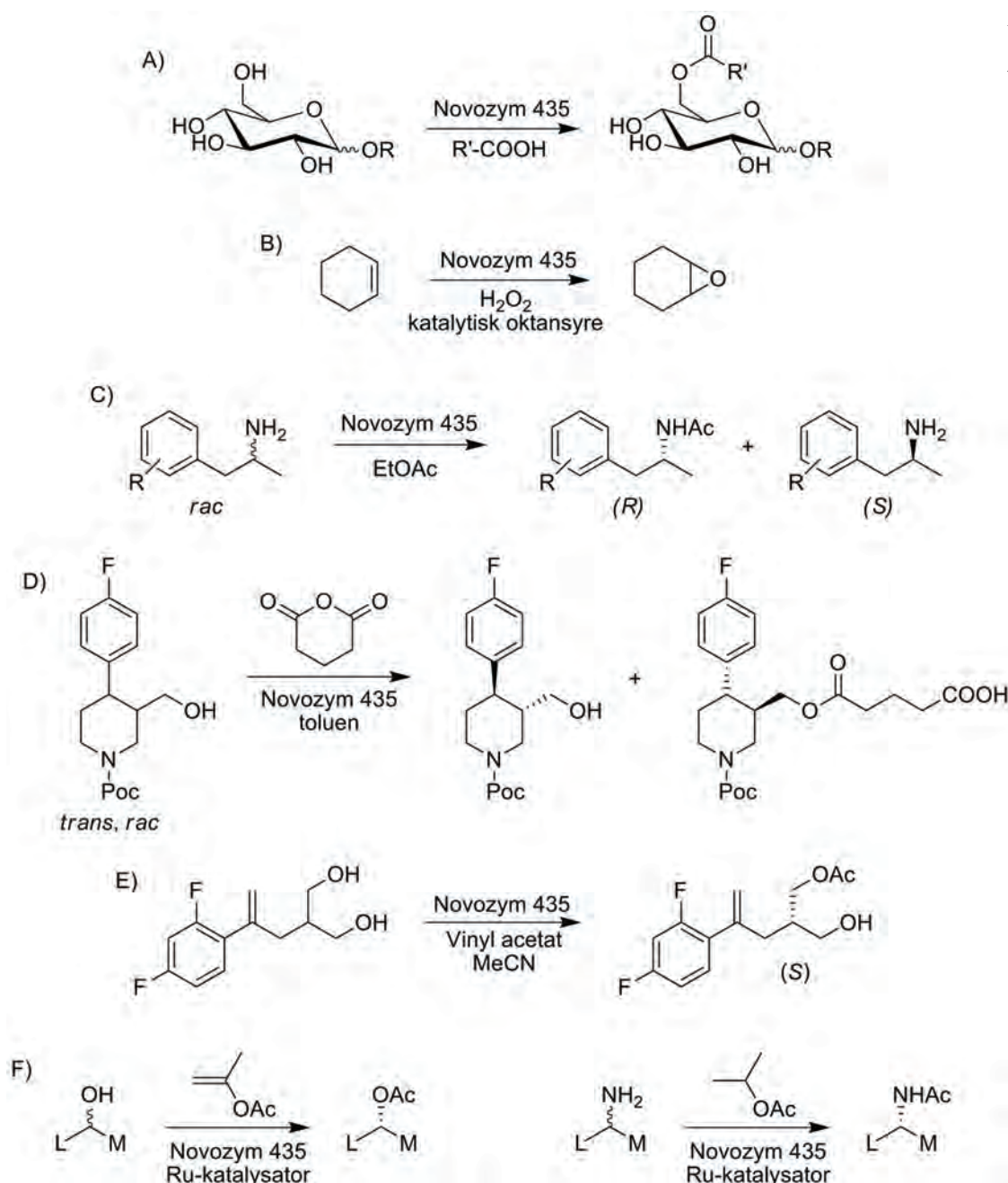
Figur 4. Skematisk repræsentation af det aktive site i en lipase, med lommer for "medium" og "large" substituent. Den viste enantiomer vil reagere hurtigst.



foodpharmatecho8

11 - 13 November 2008

www.foodpharmatech.dk



Figur 3. Et udvalg af forskellige reaktioner katalyseret af Novozym 435.

fundet anvendelse til TEMPO-medieret oxidation af primære alkoholer til aldehyder. Som gruppe er der således voksende interesse for oxidoreduktaser til organisk syntese, selvom de traditionelt er anset for mere besværlige end f.eks. lipaser. Dette hænger sammen med at mange kræver co-faktorer som NADH. Benyttes hele celler er co-faktoren inkluderet, men med isolerede enzymer må det tilsættes. Co-faktorer er kommercielt tilgængelige, men dyre. På det seneste er der dog publiceret flere gode procedurer til regenerering, f.eks. af NADH via *in situ* ADH-katalyseret oxidation af 2-propanol.

3) Nitrilaser. Disse enzymer hydrolyserer nitriler til carboxylsyre. En relateret aktivitet findes hos nitril hydrataser, der hydrolyserer nitriler til amider. Begge er meget efterspurgt inden for biokatalyse, når milde betingelser til nitril hydrolyse er påkrævet. En immobiliseret nitril hydratase benyttes industrielt i meget stor skala til at producere acrylamid ud fra acrylonitril.

Eksempler med Novozym 435

Den mest kendte og anvendte lipase til biokatalyse er fra gæren

Candida antarctica. Den såkaldte "lipase B" (CALB) blev oprenset og karakteriseret af forskere hos Novozymes i 1993 [3] og strukturen blev opklaret i 1994. CALB sælges af Novozymes i både flydende formulering, såvel som immobiliseret, hvor den kaldes Novozym 435 (Figur 1 og 2). Novozym 435 kan opbevares ved stuetemperatur i årevis uden aktivitetstab og i reaktionsblandinger kan enzymet fungere ved op til 90 °C (f.eks. med toluen som solvent). Enzymet har høj aktivitet (og ofte også selektivitet) på en række forskellige substrater som illustreret med nedenstående appetitvækkende eksempler.

En tidlig anvendelse af Novozym 435 er syntesen af 6-O-acylglucopyranosider [4]. CALB foretrækker selektivt den primære alkohol i 6-positionen (Figur 3A). Disse "sukker estre" har fundet anvendelse som bionedbrydelige surfaktanter. Det blev ligeledes hurtigt opdaget at CALB accepterer H₂O₂ som nucleofil og således kan katalysere dannelsen af peroxycarboxylsyre fra estre eller carboxylsyre [5]. Persyren kan f.eks. anvendes *in situ* til epoxideringer (Figur 3B).

Der er talrige eksempler på kinetiske resolveringer, specielt ►

Maximum Performance



... at Maximum Speed

Analytical Power and Speed for:

- Fast chromatography applications
- Trace analysis studies
- Small molecule ID
- Metabolomics
- Quantitative proteomics

**** >40.000 FWHM resolution ** <1 ppm mass accuracy ** 20 spectra/second ****

It's time to embrace a new concept of what is possible with a mass spectrometer. The maXis Ultra High Resolution (UHR) - TOF is the only tandem mass spectrometer able to provide maximum information at the very highest speeds delivered by latest Ultra Performance Liquid Chromatography. No other mass spectrometer is better equipped to acquire definitive data for small molecule identification, proteomics and metabolomics applications.

Contact us now and get involved with the maXis today at www.bdal.com/maxis

think forward

UHR-TOF MS

Faktaboks 3: Enzymimmobilisering

Hvis vand i reaktionsblandingen ikke er et problem, kan enzymkatalysatoren tilsættes i form af en vandig opløsning (typisk med en buffer indstillet til enzymets pH-optimum). Alternativt kan enzymet frysetørres, men det er risikabelt, da indånding af enzymstøv kan medføre udvikling af allergi. En god løsning, især hvis det er vigtigt ikke at introducere vand i reaktionen, kan være at bruge et immobiliseret enzym. Immobiliserede enzymer har således også en række andre fordele:

- Kan fjernes fra reaktionsblandingen ved simpel filtrering
- Kan let genanvendes i en ny batch reaktion
- Let håndtering og dosering
- Immobiliserede enzymer er stabile og kan typisk opbevares ved stuetemperatur
- Mulighed for at pakke immobiliserede enzymer i kolonner

På den anden side er der også visse ulemper:

- Tab af aktivitet som følge af immobiliseringsprocessen
- Nedsat reaktivitet som følge af diffusionsbegrænsninger
- Kan ikke bruges sammen med uopløselige substrater
- Ekstra arbejde/omkostninger i.f.m. immobilisering

Mange immobiliserede enzymer er kommercielt tilgængelige. Alternativt er det relativt enkelt selv at immobilisere. Lipaser kan typisk immobiliseres ved simpel adsorption på en porøs hydrofob bærer (f.eks. polypropylen, "Accurel"). Immobiliserings-proceduren består her blot i at suspendere bæreren i en opløsning af enzymet, og filtrere det immobiliserede enzym fra når alt er adsorberet. I andre tilfælde udnyttes ioniske interaktioner mellem enzym og en ionbytter resin, eller enzymet bindes kovalent til bæreren (f.eks. ved reaktion med epoxy-grupper, "Eupergit").

Kom och besök oss på

Bella Center
Köpenhamn

BIOTECH
FORUM

Stand nr C2-26Q
23-25 september 2008



MediaScout®

- screening av Gelmedia från de flesta tillverkare
- underlättar val av Gelmedia för er process



GRACE

NQAD HPLC detektor
baserad på aerosolteknik

- universell detektor för de flesta analyter
- hög känslighet ned till sub-nanogramområdet
- linjär respons över mer än 4 dekader i koncentration



Tel. 3691 5160 • Fax 3691 5161
scantec.info@scanteclab.dk

Scantec Lab

Filial af Scantec Lab AB, Sverige
www.scanteclab.dk

med sekundære alkoholer. Som nævnt kan ethylacetat benyttes både som solvent og acyl-doner ved acylering af aminer (Figur 3C) [6]. Den viste reaktion udviser Kazlauskas selektivitet (se Faktaboks 2). I et andet eksempel, med en primær alkohol, benyttes et cyclisk syreanhydrid som acyl-doner, idet produktet da let separeres ved simpel basisk ekstraktion (Figur 3D) [7].

Kinetiske resolveringer kan maksimalt give 50% udbytte. Benyttes prochirale substrater eller *meso*-former kan udbyttet komme op på teoretisk 100%. Det er bl.a. udnyttet af forskere fra Schering-Plough i en Novozym 435 katalyseret forestring af en 2-substitueret-1,3-propandiol (Figur 3E). Reaktionen er rapporteret til at give >95% ee med <2% diol tilbage [8]. Alternativt kan en resolvering kombineres med hurtig *in situ* racemerisering af substratet i en dynamisk kinetisk resolvering (DKR). Kombinationen af biokatalyse (lipase-katalyseret resolvering) og overgangsmetal-katalyseret racemerisering er bl.a. udviklet af Bäckvall [9]. Udbyttet op til 99% med ee >99% er rapporteret for både sekundære alkoholer og primære aminer (Figur 3F).

Konklusion

Enzymatiske processer er veletablerede med en lang historie inden for en række industrier, men brugen af enzymer til organisk syntese er stadig en relativt ung disciplin under udvikling. Udviklingen af en enzymatisk proces kan være en endog meget stor opgave, der involverer screening og test af tusindvis af enzymvarianter under forskellige betingelser. I andre tilfælde er reaktionen mere standard, og et kommercielt tilgængeligt enzym kan anvendes som et hvilket som helst andet laboratoriekemikalie. Den immobiliserede lipase Novozym 435 har således vist sig at være et meget alsidigt værktøj til organisk syntese.

Referencer:

- [1] R. Madsen, D. Tanner, M. Johannsen, *Dansk Kemi* 2001, 82, 19-21.
- [2] L. Olsson, J. M. Otero, K. Patil, J. Nielsen, *Dansk Kemi* 2007, 88, 24-26.
- [3] Patkar, S. A. Björklund, F. Zündel, M. Schulein, M. Svendsen, A. Heldt-Hansen, H. P. & Gormsen, *Indian J. Chem., Sect. B* 1993, 32, 76-80.
- [4] K. Adendorp, F. Björklund, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Synthesis* 1990, 112-115.
- [5] F. Björklund, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990, 1301-1303.
- [6] J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* 2002, 13, 1315-1320.
- [7] G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, *J. Org. Chem.* 2003, 68, 333-3336.
- [8] B. Morgan, D. R. Dodds, A. Zaks, D. R. Andrews, R. Klesse, *J. Org. Chem.* 1997, 62, 7736-7743.
- [9] O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3247-3261.
- [10] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* 1991, 56, 2656-2665.
- [11] A. N. E. Weissfloch, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* 1995, 60, 6959-6969.
- [12] S. N. Ahmed, R. J. Kazlauskas, A. H. Morinville, P. Grochulski, J. D. Schrag, M. Cygler, *Biocatalysis* 1994, 9, 209-225.

Nyt om...

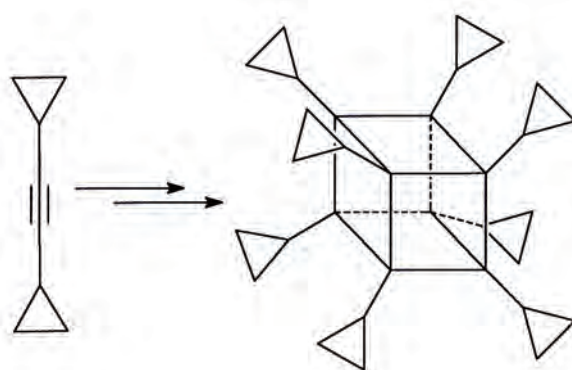
Octacyclopropylcuban, et usædvanligt carbonhydrid

Cuban blev fremstillet første gang i 1964, siden er en række substituerede cubaner blevet fremstillet, senest octacyclopropylcuban ud fra dicyclopropylethylen. Det er et krystallinsk stof, der smelter under decomposition over 300°. Octacyclopropylcuban har en bemærkelsesværdig stabilitet med en halveringstid på ca. 3 timer ved 250°, medens cuban selv ved denne temperatur har en halveringstid på kun 24 min.

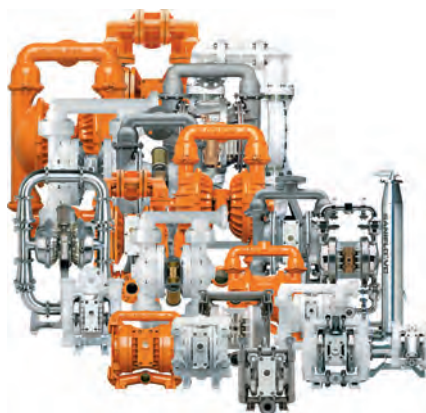
Carl Th.

Octacyclopropylcuban und einige seiner isomere, *Angewandte Chemie* 119 2007 side 4658.

W/dak/09/344



www.pumpegruppen.dk Tlf. +45 45 93 71 00 Fax +45 45 93 47 55



info@pumpegruppen.dk

Mindre luftforbrug?

Den velkendte trykluftdrevne membranpumpe fra Wilden, fås nu med det patenterede EMS (Efficiency Management System), som introducerer en integreret luftventil til styring af luftflow og pumpeeffektivitet, hvilket resulterer i mindre luftforbrug, bedre ydelse, længere membranlevetid og dette helt uden meromkostninger.

PUMPE
GRUPPEN A/S