

Naar traditioneel recept

De organische chemie loopt tegen grenzen aan en enzymen kunnen de oplossing zijn. Tijdens de IBOS Open conferentie in Lunteren was dit het onderwerp van gesprek. De deskundigen verwachten niet dat enzymen het werk van traditionele syntheses compleet zullen overnemen.

Door Els van den Brink, gepubliceerd in C2W op 21 mei 2011

“Chemici zijn sterk geneigd naar chemische reagentia te grijpen. De drempel om met enzymen te werken is nog altijd hoog. Dat komt omdat je er op een andere manier mee moet werken, in water bijvoorbeeld, maar ook omdat ze minder beschikbaar zijn”, stelt Floris Rutjes, hoogleraar Synthetisch Organische Chemie aan de Radboud Universiteit Nijmegen en medeorganisator van de IBOS Open Conferentie die van 15 tot en met 17 mei in Lunteren plaatshad. Kurt Faber, hoogleraar Organische Chemie aan de Technische Universiteit van het Oostenrijkse Graz en een van de sprekers op de conferentie, heeft geen moeite voordelen van enzymen ten opzichte van traditionele katalysatoren op te sommen: “Enzymen zijn efficiënter, kosten minder energie, bevatten weinig of geen zware metalen, leveren een zuiverder product en hebben minder reactiestappen nodig.”

“Met enzymen is het gebruik van beschermgroepen niet meer nodig. Dat scheelt in het aantal reactiestappen, en in de hoeveelheid organisch afval”, vult Dick Janssen, hoogleraar Biotransformatie en Biokatalyse aan de Rijksuniversiteit Groningen, en een van de dagvoorzitters, aan. “Enzymen zijn de ultieme vorm van groene chemie. Ze zijn zeer efficiënt, bijna honderd procent selectief, werken onder milde condities en zijn biodegradeerbaar. Bijna op alle vlakken hebben enzymen alleen maar voordelen”, zegt de lyrische Tom Desmet, professor Biokatalyse en Enzymengineering bij Inbio.be, dat onderdeel uitmaakt van de Universiteit van Gent.

Beschikbaarheid bottleneck

Al die lovende woorden ten spijt, zijn volgens Rutjes nog lang niet alle organisch chemici overtuigd. “De voordelen van enzymen zijn talloos en aantoonbaar, maar de beschikbaarheid is een bottleneck.” Hoewel er duizenden enzymen bekend zijn, is het aantal enzymen onvoldoende als het gaat om het katalyseren van specifieke organische reacties. “Op dit punt is er wel veel gaande”, vertelt Janssen. “*Genomics* geeft een nieuwe *schwung* aan dit gebied. In de databases staan miljoenen nieuwe enzymsequenties. Door homologie kun je herkennen om welk type enzym het gaat, maar of het beter werkt, kun je niet zien. We zijn bezig dat beter voorspelbaar te maken.” Ook Faber ziet hierdoor veel nieuwe mogelijkheden. “We ontdekken tal van enzymen uit het plantenmetabolisme. In het verleden was het praktisch niet mogelijk die te gebruiken, maar nu kan dat heel eenvoudig.”

Dankzij genomics biedt is het mogelijk enzymen te zoeken in micro-organismen die leven onder extreme condities, zoals warmwatergeisers of op de oceaانبodem. “Deze enzymen zijn per definitie zeer stabiel. Desnoods kunnen we er nog een beetje aan sleutelen”, zegt Desmet. Dat sleutelen aan enzymen is meestal noodzakelijk om ze toepasbaar te maken. Volgens Janssen is dat het tweede knelpunt. “De tijd die je nodig hebt om een enzym te ontwikkelen is groot, en de voorspelbaarheid is laag. We proberen de voorspelbaarheid wel te verhogen door een computerbenadering.”

“We zitten nu in een fase van trial en error, maar wereldwijd worden we steeds beter en gaan we naar een semirationele benadering. Alleen die voorspelbaarheid blijft lastig. Bij het ene enzym hebben we de stabiliteit in 3 maanden drastisch verbeterd, bij het andere zijn we al jaren bezig” licht Desmet toe. “Bij klassieke katalysatoren is dat niet anders, ook daar wordt soms jaren aan gesleuteld. Gelukkig hebben we tegenwoordig goede high-throughput screeningstechnieken”, relateert zijn collega Wim Soetaert, hoogleraar industriële biotechnologie bij Inbio.be.

Rutjes stelt dat er een duidelijk onderscheid is ten opzichte van chemische katalysatoren: “Deze zijn beter beschikbaar en over het algemeen minder substraatspecifiek, waardoor je in de meeste

gevallen met bestaande katalysatoren uit de voeten kunt. Vaak is het meer een kwestie van procesoptimalisatie dan van katalysatoroptimalisatie.”

Spiegelbeeldenzym

Sleutelen aan enzymen heeft natuurlijk zijn grenzen. De stabiliteit van enzymen is goed te verbeteren door *protein engineering*, maar voor andere eigenschappen ligt dat moeilijker. Dat geldt bijvoorbeeld voor het enantioselectieve karakter van het enzym, ofwel het feit dat een enzym alleen één vorm van een molecuul maakt, en niet een mix van spiegelbeeldmoleculen. De enantioselectiviteit is vaak een voordeel, bijvoorbeeld voor de productie van geneesmiddelen, waarbij maar één van beide enantiomeren de gewenste werking heeft. Het enantioselectieve karakter kan echter ook ongunstig uitpakken, namelijk als het enzym precies het ongewenste enantiomeer maakt.

“Voor de ene toepassing heb je het ene enantiomeer nodig, maar voor een andere toepassing juist het andere. Voor de synthese van cyaanhydrinen, veelzijdige bouwstenen om nieuwe moleculen te synthetiseren, hebben we toevallig twee totaal verschillende enzymen gevonden waarmee we beide enantiomeren kunnen maken. Maar dat is niet altijd het geval”, verklaart Rutjes. Faber beaamt: “Helaas kun je niet het spiegelbeeld van een enzym maken. Omdat wij enzymen een andere rol geven dan die ze in de natuur hebben, is het enantiomeer dat ze maken niet altijd het gewenste. Als we geen enzym vinden voor het andere isomeer, moeten we uitwijken naar een chemische syntheseroute.”

Desmet is een andere mening toegedaan: “De enantioselectiviteit van een enzym kan worden verbeterd, en zelfs omgedraaid, zodat het andere enantiomeer wordt verkregen.” Eenvoudig is dat echter zeker niet.

De novo enzymontwerp

“Over een jaar of tien speelt de beperking van beschikbaarheid van enzymen niet meer”, verwacht Soetaert. Hij ziet namelijk belangrijke doorbraken op het vlak van de synthetische biologie. “Tot voor kort moesten we in de natuur op zoek naar een enzym, en dat was niet altijd te vinden.

Tegenwoordig worden we steeds onafhankelijker van de natuur. We gebruiken de natuur als inspiratiebron en knutselen zelf wat in elkaar. Door gestuurde evolutie kunnen we veel varianten maken van natuurlijke enzymen, die we vervolgens testen met *high throughputs screening* om de beste variant eruit te halen. De *novo* enzymontwerp wordt realiteit: zeg ons wat je wilt, en wij zullen het enzym maken. Het is nu nog niet zo ver, maar het gaat sneller dan menigeen denkt.”

Desmet is minder stellig: “De eerste stappen in de richting van *de novo* enzymontwerp zijn gezet. Ik denk dat het de ultieme droom is, maar het zal nog wel even duren voordat het werkelijkheid is.”

Stapsgewijs

Synthetische biologie biedt de mogelijkheid om meerdere enzymen te combineren. “De traditionele chemie voert reacties stapsgewijs uit, waarbij je tussendoor het tussenproduct opzuivert en dan doorgaat met de volgende reactiestap. Dat kost veel tijd. Enzymen hebben als voordeel dat ze in tandem kunnen functioneren. Dat zie je overal in de natuur. Tegenwoordig kunnen biokatalytici vier of vijf enzymen tegelijkertijd laten functioneren, waardoor tussentijds opzuiveren overbodig wordt”, legt Faber uit. “Je kunt deze enzymen samen in een micro-organisme tot expressie brengen. In een reactor gebruik je dan geen losse enzymen meer, maar complete cellen.” Hij verwacht veel van deze ontwikkeling. Ook Soetaert ziet veel voordelen van deze nieuwe technologie: “Sommige enzymen zijn in de cel veel actiever dan daarbuiten. Bovendien is het eenvoudiger cofactoren te regenereren in een levende cel, als je die nodig hebt voor een reactie.”

Janssen hoopt uiteindelijk op een dergelijke route uit te komen, het liefst op basis van eenvoudige groene grondstoffen. Je zou het dan ook fermentatie kunnen noemen. “Dat is uiteindelijk het gunstigste, een eenvoudige grondstof direct omzetten met een organisme in het eindproduct. Dat is het doel van ons onderzoek in Groningen. Een fermentatieve route is meestal efficiënter en duurzamer, maar niet altijd eenvoudig te realiseren. We ontwikkelen bijvoorbeeld enzymen die beta-aminozuren kunnen maken, die bruikbaar zijn als bouwsteen voor het kankermedicijn taxol.” Nu

gebeurt de synthese van verschillende geneesmiddelen deels fermentatief en deels chemisch. Janssen wil het mogelijk maken een deel van de chemische routes te vervangen door enzymatische stappen. “Maar ons uiteindelijke doel is samen met de industrie tot fermentatieve routes te komen.”

Van groot naar klein

Naast de ontwikkeling in de richting van complete cellen, ziet Faber tegengestelde ontwikkelingen, in de richting van kleine moleculen. “De organokatalyse is een ontwikkeling die je in de gaten moet houden, dat is biokatalyse in een notedop. Het probleem van enzymen is namelijk dat ze zo groot zijn, waardoor ze vatbaar zijn voor degradatie.” Bij organokatalyse gaat het om kleine organische moleculen die lijken op het katalytisch centrum van een enzym. Rutjes heeft daar zelf al ervaring mee, zoals met het aminozuur proline. “In feite hebben we de enzymactiviteit beperkt tot één aminozuur. Dat werkt zeker niet in alle gevallen, maar het is een mooie complementaire technologie. De omzetting is enantioselectief en je wordt niet beperkt door de ruimte in de *active site*, zoals bij een enzym.”

Geen van de deskundigen verwacht dat enzymen het werk van traditionele katalysatoren compleet zullen overnemen. “Dat lijkt me te veel gevraagd. Ik zie het meer als aanvullend. Voorlopig hebben we de goede organische chemie gewoon nodig”, zegt Janssen. “Het zal altijd een mix zijn van traditionele katalyse, biokatalyse en misschien organokatalyse”, verwacht Faber. Soetaert denkt dat enzymen aan een opmars bezig zijn in de organische chemie. “Maar sommige reacties zijn onmogelijk door enzymen te bewerken, bijvoorbeeld doordat het enzym zelf wordt aangetast door een erg reactief substraat of product. De chemie kan altijd bepaalde trucjes die biokatalyse niet kan en omgekeerd.” Rutjes noemt als voorbeeld de synthese van heterocyclische aromaten, die deel uitmaken van veel medicijnen. “Voor de meeste stappen in de synthese van zo’n medicijn, zoals het functionaliseren van die aromaten, kun je enzymen überhaupt niet gebruiken en ben je aangewezen op chemische methoden.” Maar de verhoudingen verschuiven wel volgens Desmet: “Ik geloof in samenwerking van beide velden. Maar ik verwacht dat het aandeel biokatalyse zal stijgen, naarmate we steeds meer enzymen ontdekken.”