



Angewandte Biokatalyse

Applied Biocatalysis

Biokatalyse – der Einsatz von Enzymen und Mikroorganismen zur Durchführung von chemischen Reaktionen – gewinnt immer mehr an Bedeutung, nicht nur im Laboratorium, sondern auch für die industrielle Synthese, wie kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen. Neben der Umweltfreundlichkeit – häufig wird Wasser als Lösungsmittel verwendet – haben in den letzten Jahren besonders die über biokatalytische Methoden erzielbaren Selektivitäten zur Entwicklung industrieller Verfahren geführt.

Das Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse mit dem Schwerpunkt an der Technischen Universität Graz bündelt für Österreich Grundlagenforschung und industriennahe Entwicklung auf diesem Gebiet.

Biokatalyse als Teil der Biowissenschaften (Biotechnologie) ist einer der zukunftsweisenden Bereiche für die technologische Entwicklung. Weltweit gibt es hier größte Forschungsinvestitionen. Einige Unternehmen produzieren mit Hilfe von Enzymen Produkte bereits im Vieltonnenmaßstab. Die Tendenz ist steigend, weil durch die Biokatalysatoren einzelne Schritte vielfach ökonomischer und unter größtmöglichem Schutz der Umwelt umgesetzt werden können. So lag der Umsatz für chemisch und biokatalytisch gewonnene Feinchemikalien und Zwischenprodukte für den Agrobereich und Pharmazeutika im Jahr 2000 weltweit bei rund € 6.5 Milliarden. Mit den neuen Möglichkeiten könnte er bis 2007 auf weltweit € 18 Milliarden ansteigen. Doch die Integration biokatalytischer Schritte in bewährte Produktionsprozesse erfordert viel Entwicklungsarbeit.

Warum Biokatalyse ?

Ein Katalysator ist ein Stoff, der eine chemische Reaktion beschleunigt. In der lebenden Natur laufen die Vorgänge im Organismus, beispielsweise die Gewinnung von Energie aus der eingenommenen Nahrung, ebenfalls unter der Beteiligung von Katalysatoren ab. Diese Katalysatoren der lebenden Natur, die Enzyme, sind Einweißstoffe. Diese Biokatalysatoren werden im Organismus selbst produziert und besitzen eine extrem hohe Wirksamkeit.

Seit etwa 20 Jahren ist bekannt, dass es möglich ist, diese Biokatalysatoren auch für Reaktionen von Verbindungen einzusetzen, die nicht in der Natur vorkommen oder die zumindest nicht die natürlichen Substrate der Enzyme darstellen. In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts setzte hierauf eine stürmische Entwicklung ein, zumindest im rein wissenschaftlichen Bereich. Später erkannte man auch die große industrielle Bedeutung von biokatalytischen Verfahren.

Was sind die Gründe für dieses weltweite Interesse an Biokatalyse ?

1) Ökologie und Wirtschaftlichkeit

- Keine Umweltproblematik, da die Biokatalysatoren wie erwähnt Proteine sind, natürliche Stoffe, deren biologischer Abbau keine Schwierigkeiten bereitet. Auch ist es in der Regel möglich, diese Biokatalysatoren für viele Reaktionszyklen zu verwenden, was die Notwendigkeit für eine, ohnedies ohne Schwierigkeiten durchzuführende, Entsorgung in Bezug auf die Häufigkeit reduziert,
- im Gegensatz zu anderen technischen Prozessen sind keine starken Säuren oder Basen notwendig. Dadurch erübrigt sich für das Abwasser eine Neutralisation, die zur Erhöhung der Salzfracht des Abwassers führen würde,
- keine giftigen Schwermetalle als Katalysatoren,

- die biokatalytischen Reaktionen können mit Wasser als Lösungsmittel unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, wenn auch der Einsatz organischer Lösungsmittel möglich ist,
- milde Reaktionsbedingungen, dadurch Energiebedarf niedrig,
- bei eventuellen Störfällen in der Produktion keine oder nur geringe Gefährdung für das Personal und die Umgebung.

2) Hohe Selektivität

Biokatalysatoren zeigen die einzigartige Eigenschaft, von vielen potentiell möglichen Reaktionswegen nur einen einzigen zu katalysieren und dadurch zu bewirken, dass nur dieser einzige Reaktionsweg beschritten wird.

Von besondere Bedeutung ist hierbei die so genannte Enantioselectivität. Viele organisch-chemische Verbindungen zeigen die Struktureigenschaft, dass sie in zwei Formen vorkommen können, Enantiomere genannt, die sich zueinander so verhalten wie Bild und Spiegelbild. Ein allgemein einleuchtendes Beispiel ist hier der Vergleich zwischen rechter und linker Hand. Für sich betrachtet sehen rechte und linke Hand gleich aus, jedoch ist die eine das Spiegelbild der anderen.

Abb 1 zeigt die chemischen Formeln verschiedener Verbindungen. Details sind hier nicht wichtig, sondern nur die Tatsache, dass die rechtsstehende Formel das Spiegelbild der linksstehenden Formel darstellt. Man sieht, dass die biologischen Eigenschaften von Bild und Spiegelbild (von Enantiomeren) in der Regel unterschiedlich sind (bei den Beispielen bitter oder süß, teratogen (embryoschädigend) oder sedativ, β -Blocker oder geringe kontrazeptive Wirkung).

Es ist daher verständlich, dass von jenen Wirkstoffen von Pharmaka, die aufgrund ihrer Struktur in zwei zueinander spiegelbildlichen Formen vorkommen, nur eine dieser Formen den Wirkstoff darstellt, während die andere für Nebenwirkungen verantwortlich ist bzw. im besten Fall den Organismus unnötig belastet.

Biokatalytische Reaktionen eröffnen die Möglichkeit, dass durch sie nur eine der beiden möglichen Formen, das Bild oder das Spiegelbild, erhalten wird. Die Abb. 2 zeigt die sich daraus ergebende wirtschaftliche Bedeutung der Biokatalyse und die Forschungsausgaben für Biotechnologie, Biokatalyse ist ein Teil davon, für KMUs (kleine und mittlere Unternehmen).

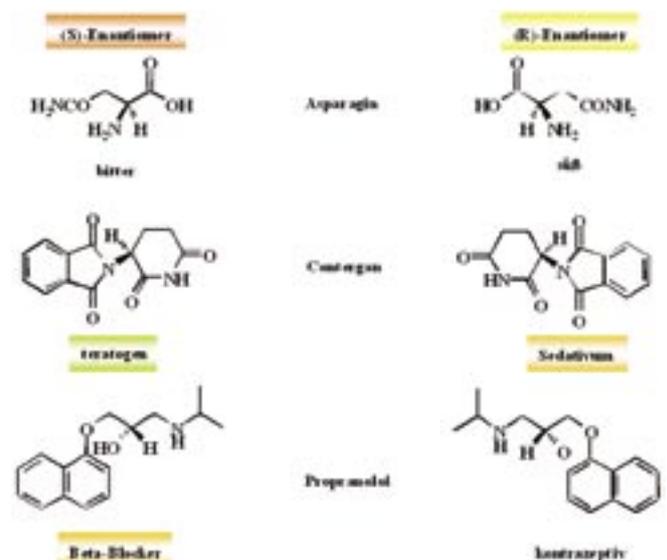




Abb. 2

Biokatalyse in Graz

Die Beschäftigung mit Fragen der Biokatalyse hat in Graz eine lange Tradition. Waren die Arbeiten zunächst vorzugsweise biotechnologisch ausgerichtet und wurden am Institut für Biotechnologie durchgeführt, so wurde etwa 1984 mit eigentlichen biokatalytischen Forschungen am Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Graz begonnen. 1989 wurde an diesem Institut von den damaligen Austrian Industries ein Christian Doppler Laboratorium für den Bereich der Biokatalyse eingerichtet. 1993 folgte die Schaffung des Spezialforschungsbereichs Biokatalyse mit der Technischen Universität Graz als Trägeruniversität. Infolge der großen Interdisziplinarität dieses Forschungsbereichs sind an diesem Spezialforschungsbereich eine Reihe von Instituten sowohl der TU Graz wie der Karl-Franzens-Universität beteiligt.

In logischer Fortentwicklung kam es schließlich im heurigen Jahr zur Gründung des Kompetenzzentrums Angewandte Biokatalyse. Waren auch schon bisher Industriefirmen in die Forschungsarbeiten eingebunden, so wurde nun auch der Bereich der potentiellen Anwendung der Biokatalyse durch die Beteiligung von Firmen institutionalisiert. Um der Breite der Thematik Rechnung zu tragen, erfolgte auch eine neue Orientierung und Ausweitung der Forschungsbereiche.



Abb. 3

Organisationsstruktur des Kompetenzzentrums Angewandte Biokatalyse

Ziel des Kompetenzzentrums ist es, die gesamte Forschung auf

dem Gebiet der Biokatalyse in Österreich mit dem Zentrum in Graz zu bündeln. Für die Ausweitung der bearbeiteten Thematik wurden auch Arbeitsbereiche mit Forschungspartnern in Oberösterreich, Tirol und Wien einbezogen.

Als Rechtsform ist für Kompetenzzentren eine GesmbH vorgesehen. Für das Zentrum Angewandte Biokatalyse wird der Hauptgesellschafter die Technische Universität Graz sein. Weitere Gesellschafter sind die Karl-Franzens-Universität Graz, die Universität Linz, die Universität für Bodenkultur Wien und die beiden Landesforschungsgesellschaften JOANNEUM RESEARCH und Upper Austrian Research. Die Partner der Forschungsarbeiten sind in der Abb. 4 zusammengefasst. Die industriellen Partner sind dabei aktiv in die Forschungsarbeiten einbezogen. In Bezug auf das Förderungsvolumen ist das Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse das größte Kompetenzzentrum in Österreich.

Partner	
Industrielle Partner	Wissenschaftliche Partners
Graz	Graz University of Technology
Cerepharm, Graz	Biochemistry
JOM Research, Graz	Biochemistry
VTU Engineering, Graz	Mikrobiologie und Abfalltechnologie
Alcon, Graz	Biomedical Engineering
Styria	Machine Vision and Visualization
Leitoprint, Hartberg	Organic Chemistry
Lichtman, Kapfenberg	Chemistry and Technology of Organic Materials
Hoemcon, St.	Analytical Chemistry
Austria	University of Graz
DSM Fine Chemicals, Linz	Chemistry
Vögelbusch, Vienna	Medical Biochemistry
Biochemie, Kund	Molecular Biology
Gesner Bio-ana, Kremsmünster	Agricultural University Vienna
Medcol, Vienna	Food Technology
Joanneum, Vienna	University of Linz
Rohrer Kreuz, Linz	Biophysics
Europe	Joanneum Research
CBV Life Sciences, Basel	Upper Austria Research
Degussa, Hückel	
Proflon, Regensburg	

Abb. 4

Wissenschaftliches Arbeitsprogramm im Zentrum

Die Forschungsarbeiten konzentrieren sich auf einen sehr großen und breit angelegten strategischen Bereich mit acht grundlagenorientierten Einzelprojekten und drei darauf aufbauenden miteinander stark verknüpften Hauptforschungsgebieten (Area 1-3)

Zentrale Grundlagenforschung

Aufgabe des zentralen Bereichs ist die Durchführung von Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Biokatalyse. Neben grundlegenden Fragestellungen soll damit auch die Basis für die „vertikalen“ Bereiche gelegt werden, wo zwar auch präkompetitive Forschung betrieben wird, jedoch mit einem stärkeren anwendungstechnischen Aspekt. Nachstehend sind einige der Forschungsgebiete aus dem strategischen Bereich herausgehoben.

Die Entwicklung von Biochips im Kplus-Zentrum soll neue Perspektiven der Enzymanalytik in der Chemie, Biotechnologie und Medizin eröffnen. Dieses Vorhaben steht im Zusammenhang mit dem derzeit hochaktuellen Gebiet der „Functional Genomics“, das alle Anstrengungen zusammenfasst, die zu einem umfassenden Verständnis der zellulären Funktionen auf der Basis der vorgegebenen genetischen Anlagen sowie der „umweltbedingten“ Einflüsse führen sollen.

Im strategischem Projekt „Enzyme reaction engineering“ wird versucht, die bisherigen Kenntnisse so weiterzuentwickeln, dass enzymtechnologische Produktionsverfahren eine echte wirtschaftli-

che Alternative zu den bisherigen chemisch katalysierten Prozessen bieten können.

Area 1: Biokatalytische Synthese

Die interdisziplinären Forschungsarbeiten befassen sich mit neuen Anwendungen von Enzymen zur Darstellung organischer Verbindungen. Besonderes Augenmerk gilt dabei der Selektivität und der Wirtschaftlichkeit.

Schwerpunkt ist die Gewinnung von enantiomerenreinen Verbindungen als Zwischenprodukte für die Synthese von Wirkstoffen für Arzneimittel oder Agrochemikalien.

Ein weiterer Bereich ist der biokatalytischen Modifikation von Polymeren gewidmet. Es ist auf diese Weise möglich, die Oberfläche der Polymere über schonende und umweltfreundliche Methoden zu modifizieren. Damit können verbesserte anwendungstechnische Eigenschaften erzielt werden.

Area 2: Enzymentwicklung und Analytik

Biokatalytische Verfahren können nur dann in industrielle Anwendungen umgesetzt werden, wenn die dafür benötigten Enzyme in ausreichenden Mengen verfügbar sind und genügend effizient arbeiten können. Die Zielstellung der in Area 2 geplanten Forschungsarbeiten ist, diese Voraussetzungen zu schaffen. Die generellen Ziele dabei sind effiziente Systeme für die Rekrutierung und Herstellung der benötigten Enzyme zu entwickeln und Verfahren aufzubauen, die es erlauben die Eigenschaften von Enzymen so zu verändern, dass diese den Erfordernissen von technischen Prozessen möglichst optimal angepasst sind.

Konkret werden in Area 2 folgende Forschungsprogramme bearbeitet:

Erschließung von neuen Enzymen

Ziel dieser Arbeiten ist, aus der breiten natürlichen Diversität an Enzymen solche herauszufiltern, die in der Lage sind, interessante biokatalytische Umsetzungen zu katalysieren. Dabei liegen die Enzyme als „rekombinante“ Systeme vor, das heißt, die entsprechenden Gene werden aus den ursprünglichen natürlichen Organismen isoliert und in gut charakterisierte, sowie einfach und sicher handzuhabende Mikroorganismen eingebaut (kloniert).

Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Enzymen

Ein hoher Wissensstand über den Aufbau und die Funktionsweise ist notwendig, um effizient Eigenschaften eines Enzyms verändern zu können. Moderne Methoden der Strukturbiologie und der Enzymkinetik kommen hier zum Einsatz.

„Engineering“ von Enzymen

Aus natürlichen Quellen isolierte Enzyme entsprechen in den meisten Fällen nicht den Anforderungen von technischen Anwendungen. Die moderne Gentechnik hat Möglichkeiten eröffnet, die Eigenschaften von Enzymen dadurch zu verändern, indem in ihren genetischen Bauplan eingegriffen wird. Dazu werden entweder einzelne Aminosäuren im Enzym ausgetauscht oder es wird sozusagen im Reagenzglas die evolutionäre Entwicklung des Enzyms stimuliert. Dabei wird, ausgehend von einem gut charakterisierten Enzym, auf Basis des klonierten Gens eine künstliche Population von zufällig veränderten Enzymvarianten geschaffen und diese durch geeignete Selektions- oder Screeningverfahren nach für den gewünschten Prozess verbesserten Varianten durchsucht („dirigierte Evolution“).

Entwicklung von Screening- und Selektionssystemen

Das Konzept der „dirigierten Evolution“ ist von besonderer Bedeutung für die Biokatalyse, da es möglich ist, in relativ kurzer Zeit und bei geringem Stand an Wissen über Struktur und Funktion eines Enzyms verbesserte Varianten zu gewinnen. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit von Systemen, die es erlauben, aus einer großen in vitro geschaffenen Population an Enzymvarianten solche Enzyme herauszufiltern, die verbesserte Eigenschaften zeigen. Ziel der Forschungsarbeiten hier ist, moderne Micro- und Nanomethoden (Microchips, Nanochips) zu entwickeln, die es ermöglichen, bei vertretbarem Aufwand große Mengen an Enzymvarianten zu screenen („High Throughput Screening“).

Area 3: Enzymatische Umwandlung von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate stellen eine wichtige, praktische unerschöpfliche Gruppe von erneuerbaren bzw. nachwachsenden Rohstoffen dar. Ihre Verwertung kann entweder auf makromolekularer Ebene ansetzen oder erfordert einen vorangehenden mehr oder weniger vollständigen hydrolytischen oder phosphorolytischen Abbau in die monomeren Bausteine. Die entsprechenden Mono- und Oligosaccharide können dann der Biotransformation unterworfen werden. Dabei stehen Enzyme als meist sehr spezifische Biokatalysatoren der Zellen im Mittelpunkt. Mit ihrer Hilfe werden die preiswerten Ausgangsstoffe für die Herstellung höherwertiger Verbindungen herangezogen, die im Bereich Lebensmittel, Gesundheit und Tierernährung eine bedeutende Rolle spielen. Der Ersatz bisheriger chemischer Syntheseverfahren bzw. die Herstellung neuartiger Verbindungen durch die meist sehr spezifischen Enzyme im industriellen Maßstab sind ein wesentliches Ziel dieses Schwerpunktprogramms.

Applied Biocatalysis

Biosciences are evolving as key areas of science and technology and are seen as important parts of future economic growth. Biocatalysis is part of this scientific domain, frequently crossing the interdisciplinary borderlines to physics as well as biology and medicine. It is the technique of using enzymes - either isolated or within the cell - as a means to perform synthetic chemical transformations. As these reactions are following the example of natural systems, similar high selectivities and mild reaction conditions are achievable in combination with increased eco-efficiency due to little problematic waste being left over in industrial applications. Connected with these aims are developments in enzyme analytics. In particular, recent progress in medical diagnosis and therapy was triggered by the application of biocatalysis to nanoarray techniques as an analytical tool for the determination of enzymes in biological fluids.

It is the intention of the Centre to cover all the aspects mentioned above for novel developments, to strengthen the competitiveness of its industrial partners, and to keep in touch with the international scientific and industrial community.

The main long-term targets are:

- *development of efficient syntheses using biocatalysts to a broadly applicable methodology also on an industrial scale (area 1)*
- *making available novel enzymes by molecular genetics, development of methods for identifying interesting enzymes in natural and artificial diversities at microscale and high-throughput level (screening/selection), establishing rapid and efficient strategies for enzyme engineering including exploitation of novel enzymatically functionalised nanostructures, functional, structural and molecular characterisation of enzymes, development of highly effective (recombinant) production systems*

- *for biocatalyst preparation (area 2)*
- *Preparation of biochips and biosensors for the qualitative and quantitative determination of enzymes in biological samples and the interaction of these enzymes with natural and synthetic substrates in biocatalytic reactions (area 2)*
- *conversion of carbohydrates by enzyme technology since in particular for these substrates the beneficial properties of biocatalysts, high selectivity and mild reaction conditions, offer tremendous advances as compared to conventional techniques (area 3)*
- *general basic research in the field of applied biocatalysis including development of tools for problem solutions in the areas above (central research area and strategic programmes)*

The Kplus Centre Applied Biocatalysis is aiming at making available these advanced methods for economic exploitation by industry working in this field by bundling major parts of the related high-standing expertise available in Austria. It is a continuation of a well-established multidisciplinary network of experts based on the Christian Doppler Laboratory of Chiral Compounds, Enzymatic and Microbial Synthesis of the Austrian Industries AG (1989-1994) and the Special Research Programme Biocatalysis of the Austrian Science Fund (1993-2003). With its centre of gravity in Graz, there will also be activities located in Linz and Vienna as well as involvement of international industrial partners. The Centre is designed to be developed into a contract RTD company and continued beyond the period subsidised by the Kplus programme.

The planned Competence Centre Applied Biocatalysis pursues three overall objectives: (i) it serves to strengthen the existing infrastructure for both precompetitive research (Kplus) as well as market oriented research and development and scientific services (non-Kplus) in specific areas of applied biocatalysis crucial for the future development of Austrian industries in this field; (ii) it is meant not only to enhance the competitiveness of the Austrian industry in this area but also of related service sectors in Austria; (iii) the Centre is to be seen as a long-term institution for precompetitive (Kplus) and competitive (non-Kplus) industrial research. The total budget (4 years) of the Centre is around 17 million EURO, employing nearly 50 scientists in the centre and a number of senior academic staff with part time contracts.

As a promotor of product and process innovation, the Kplus Centre Applied Biocatalysis is designed to perform the following specific functions:

- *Technology and know-how transfer between science and industry (in both directions) – both via project results, exchange of experienced specialists and expert training (educational programme)*
- *Specific support for the requirements of SMEs*
- *Providing feedback for adjustment of basic research and teaching at the academic institutions*
- *On-the-job training for graduates from the university and other educational institutions*
- *Initiation of spin-offs and the foundation of industrial companies by employees of the Centre.*

The proposed centre will bring together the scientific strength in the field and important industrial partners situated in Upper Austria, Styria, other parts of Austria and abroad. Thus, it constitutes an important project in the framework of technology policies of the two provincial governments.