



In dem Bioreaktor der c-LEcta werden Mikroorganismen kultiviert, mit deren Hilfe das Unternehmen Enzyme für den industriellen Einsatz gewinnt.

Bild: Matthias Baumbach

# Ressourcen sparen mit effizienten Enzymen

Der Einsatz von Enzymen ist in vielen Prozessen nicht mehr wegzudenken. Mit einem neuen Verfahren – der gerichteten Enzym-Evolution – lassen sich diese gezielt und effektiv verbessern. Dabei haben sich zwei Strategien durchgesetzt: hoher Durchsatz durch Automatisierung oder wissensbasiert, um wenig experimentieren zu müssen. Eine Leipziger Firma entwickelt mit dem wissensbasierten Ansatz erfolgreich Enzyme für die industrielle Anwendung.

*Andreas Vogel*

**E**nzyme sind Bestandteil unseres täglichen Lebens, seit die Menschheit die Vorteile der Umwandlung von Milch und Getreide in wohlschmeckende Produkte wie Joghurt, Käse, Bier und Brot gelernt hat. Diese Lebensmittelprozesse werden heute noch nach den gleichen Prinzipien durchgeführt, auch wenn sie mittlerweile durch

industriell hergestellte Enzyme unterstützt werden können.

Die Anwendung beschränkte sich bis zur Entwicklung molekularbiologischer Methoden auf sogenannte Wildtyp-Enzyme. Diese wurden direkt aus natürlichen Organismen gewonnen. Sie haben sich durch Mutation und Selektion gemäß den Prinzipien von Darwin für ihre Funktion im lebenden Organismus angepasst. Und

sie machen das, was sie müssen und nichts, was dem Organismus schaden könnte.

Für industrielle Anwendungen sind jedoch andere Anforderungen gefragt. Die Prozesse müssen hoch effizient und ökonomisch ablaufen: In einer Produktionsanlage möchte man bei gegebener Kesselgröße den Ausgangsstoff möglichst schnell in möglichst viel Produkt umsetzen.

## Gerichtete Evolution

Um ein gewünschtes Produkt mit einem bestimmten Prozess unter optimalen Bedingungen herstellen zu können, werden Methoden benötigt, Enzyme künstlich an diese Bedingungen anzupassen. Mit der Aufklärung der ersten dreidimensionalen Enzymstruktur 1965 eröffnete sich ein Weg, die Eigenschaften von Enzymen gezielt zu verändern, in dem einzelne Aminosäuren ausgetauscht werden. Dieses heute als „rationales Enzymdesign“ bezeichnete Vorgehen war jedoch von mäßigem Erfolg.

Der Durchbruch gelang, als Wissenschaftler Zufallselemente in die Mutationsstrategien mit einbezogen. Dieser Prozess der zyklischen Abfolge von zufälliger Mutation und Selektion ähnelt der natürlichen Evolution und wird als „gerichtete Evolution“ bezeichnet.

Die Erfolge mit dieser in den 1990er Jahren entwickelten Methode fanden schnell in der industriellen Enzymentwicklung Einzug und wurde 2018 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt. Nicht nur das: Es kam auch zu einer erquicklichen Befruchtung von rationalem und gerichtetem Enzym-Engineering, was schließlich zur Kombination beider Herangehensweisen geführt hat und heute als „semi-rationales Enzym Engineering“ bezeichnet wird.

## Schneller und größer

Die Einführung zufälliger Mutationen führt bei einem Enzym durchschnittlicher Größe, bestehend beispielsweise aus 250 Aminosäuren, schnell zu einer sehr hohen Zahl an Varianten. Sollte in diesem Beispiel jede der 250 Aminosäuren zu jeder der möglichen 20 Aminosäuren ausgetauscht werden, so erhält man bereits 5 000 mögliche Varianten. Erlaubt man zwei- und dreifach Varianten und berücksichtigt alle Permutationen, so steigt die Anzahl exponentiell auf 25 Mio. beziehungsweise auf 100 Mrd..

Um solche riesigen Bibliotheken zu durchmustern, kann man auf Hochdurchsatz-Screening und Automation setzen. Das aus der Diagnostik und Pharmaforschung bekannte Format der Mikrotiterplatten kommt dabei zum Einsatz. Für dieses Format stehen Pipettierroboter und Maschinenarbeitsplätze bereit, die hochautomatisiert Platten befüllen und verschiedene Vorgänge durchführen.



**Enzymprodukte** wie hier Denarase werden von Leipzig aus an Pharma-Kunden in aller Welt versandt.  
Bild: Matthias Baumbach

In so einem Setup ist ein Durchsatz von mehr als 10 000 Enzymvarianten pro Woche zu erreichen. Um dies zu verwirklichen, muss der komplette Arbeitsablauf darauf ausgerichtet sein. Das beginnt mit der Erzeugung der Variantenbibliothek, der Kultivierung der einzelnen Bakterienkolonien, der Aufarbeitung des Enzympräparats, dem Ansetzen der Enzymreaktion, der Probenvorbereitung sowie dem Sammeln und Aufarbeiten der Analyse-Daten. Dieser Arbeitsablauf muss fein abgestimmt sein, die Programmierung der Maschinen erfordert Geschick und legt die Bedingungen zeitlich fest.

Wenn Änderungen in einer Komponente gewünscht werden, wie eine längere Reaktionszeit oder andere Reaktionsbedingungen, so muss der gesamte Ablauf



**Der Hauptsitz der c-LEcta GmbH in Leipzig** mit derzeit 86 Mitarbeitern. Bild: Thomas Victor

neu abgestimmt werden. Solch ein Aufwand lohnt sich nur, wenn eine hohe Anzahl von mehr als 100 000 Varianten unter exakt gleichen Bedingungen durchmustert werden muss. Das System geht aber auf Kosten von Flexibilität. Zudem entsteht ein extrem hoher Ressourcenverbrauch an Energie und Einmalplastik.

## Schlauer und nachhaltiger

Das Gegenstück zum Hochdurchsatz ist, wissenschaftliche Elemente anzuwenden, um die Anzahl der zu durchmusterten Enzymvarianten zu minimieren. Dieses Verfahren verfolgt die c-LEcta GmbH aus Leipzig. Damit bewegt sich das Biotech-Unternehmen ein Stück in Richtung rationalem Design. Im Gegensatz zu den frühen Anwendungen von rationalem Design hat man jetzt die Stärke von zufälligen Mutationen erkannt und vereinigt diese beiden Elemente.

Konkret heißt das, dass Vorhersagen über jene Positionen in der Aminosäuresequenz, die am wahrscheinlichsten einen positiven Einfluss auf die gewünschte Enzymeigenschaft hat, benötigt werden. An diesen Positionen lässt sich die Anzahl der Aminosäureaustausche durch wissenschaftliche Ansätze weiter eingrenzen.

So lassen sich Bibliotheken von wenigen hundert bis tausenden von Varianten designen, bei denen der Anteil verbesserter Enzymvarianten deutlich höher ist als bei einer reinen Zufallsbibliothek.

Die computergestützte Modellierung der dreidimensionalen Enzymstruktur ist dabei eine wichtige Datenquelle. Sie erlaubt eine Aussage über die Aminosäuren,

die bestimmte Positionen einnehmen und Eigenschaften ausprägen. Mit einer molekulardynamischen Analyse lassen sich darüber hinaus bewegliche Elemente oder Enzym-Substrat-Wechselwirkungen erkennen, die für die Enzymkatalyse oft von entscheidender Bedeutung sind.

Eine weitere wichtige Quelle sind Sequenzen ähnlicher Enzyme, die sich in riesiger Anzahl in öffentlich zugänglichen Datenbanken finden lassen. Über diese Sequenzvergleiche lassen sich verschiedene Muster ableiten und Aminosäuren lokalisieren, die in allen Sequenzen unverändert sind und nicht mutiert werden sollten. Daneben sind das chemische Verständnis als auch die wissenschaftliche Intuition Komponenten, die in ein wissenschaftsbasiertes Bibliotheksdesign einfließen.

Auf der anderen Seite erlaubt das Sammeln von Daten aus Enzym Entwicklungsprojekten die Verfeinerung der Algorithmen für wissenschaftsbasiertes Enzymdesign. Die von c-LEcta selbst entwickelte Software Suite ASSET-DB erfüllt genau diesen Zweck. Die gesammelten Daten über Sequenz-Funktionsbeziehungen werden von Bioinformatikern statistisch analysiert und neue Zusammenhänge entdeckt.

Die Software bietet zudem die Basis für das künftige Nutzen von Korrelationsanalysen und maschinelles Lernen, wodurch c-LEcta einen weiteren Sprung in der Wirksamkeit der Anwendung von wissenschaftsbasierten Ansätzen sieht.

## Beispiel Babynahrung

Mit der wissenschaftsbasierten Plattform wurden bei c-LEcta mittlerweile eine Reihe von Enzymen für unterschiedliche Anwendungen verbessert.

Darunter befinden sich Enzyme, die gezielte Zucker wie Traubenzucker, Haushaltszucker und Milchzucker miteinander verbinden können. Enzyme sind im Gegensatz zu chemischen Verfahren dafür prädestiniert, Zuckern miteinander selektiv zu verknüpfen. Damit dies auch stabil in einer hohen Ausbeute gelingt, müssen die Enzyme noch angepasst werden, um etwa die Bildung von Nebenprodukten zu verringern.

Mit den bei der c-LEcta entwickelten Enzymen ist es der Firma Glycom A/S aus Dänemark nun möglich, ihr Portfolio an Oligosacchariden, die der menschliche Organismus produziert, zu erweitern, die wertvolle Zusatzstoffe für Babynahrung darstellen.

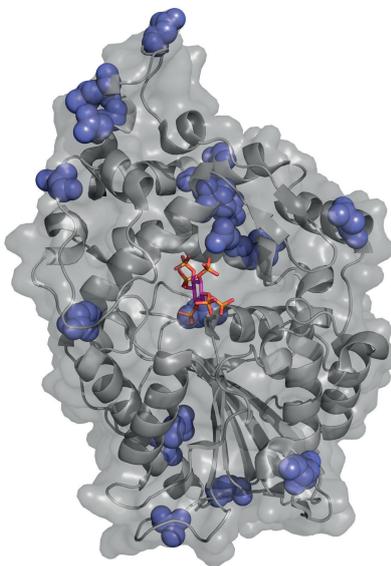


**Eine Mitarbeiterin von c-LEcta** nutzt die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), um Eigenschaften von bis zu 1000 Enzymvarianten mit hoher Qualität zu messen. Bild: c-LEcta



**Ein Blick** auf einen vollautomatisierten Hochdurchsatz-Screening-Maschinenpark.

Bild: Science Photo Library / Gustomages



**Darstellung des Phytase-Enzyms**, das mit dem wissenschaftsbasierten Ansatz der c-LEcta in seiner Wirkung verbessert wurde. Bild: c-LEcta

## Beispiel Phytase

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel ist die in der Tierernährung bereits seit mehr als 25 Jahren genutzte Phytase. Dieses Enzym setzt Phosphat aus der im Futtermittel enthaltenen Phytinsäure frei – die Säure dient in vielen Pflanzen als Spei-

cher für Phosphat und Kationen, die der Keimling zum Wachstum braucht. Durch diese Freisetzung erhöht die Phytase die Verwertbarkeit des Futters und senkt die Phosphatbelastung des Abwassers.

Obwohl es sich hier um ein Enzym handelt, an dem mehrere große industrielle Optimierungskampagnen durchgeführt wurden, um es für die Anwendung zu verbessern, konnte das Enzym mit der Plattform der c-LEcta in Zusammenarbeit mit der Firma Huvepharma mit Hauptsitz in Sofia, Bulgarien, noch weiter verbessert werden.

Das veränderte Enzym hat Huvepharma im letzten Jahr auf den Markt gebracht und ist ein Beleg dafür, wie schlagkräftig der wissenschaftsbasierte Ansatz im Vergleich zum Hochdurchsatzansatz ist.

## Fazit

Der Hochdurchsatz- und der wissenschaftsbasierte Ansatz sind beides berechnete und erfolgreiche Strategien, um Enzyme für industrielle Anwendungen anzupassen. Bei einem Hochdurchsatzverfahren wird vielfach angenommen, dass man die Potenziale aus evolutionärer Enzymentwicklung voll ausschöpft. Man muss jedoch viel Kraft und Geld in die Anschaffung und den reibungslosen Betrieb von Maschinenparks aufbringen und büßt auf der anderen Seite an Datenqualität und Flexibilität ein.

Der wissenschaftsbasierte Ansatz erlaubt hingegen, die für eine Anwendung notwendige Qualität des Screenings beizubehalten. Es erfolgt eine Anpassung der Bibliotheksgröße auf das praktisch handhabbare Maß unter gegebenen Laborbedingungen. Nicht zu unterschätzen ist der Effekt auf die Mitarbeiter. Der Wissenschaftler ist ein aktiver Bestandteil des Bibliotheksdesigns und sieht seine Ideen verwirklicht. Auch der deutlich verminderte Verbrauch von Plastikeinmalartikeln hat einen direkten Einfluss auf die Identifikation der Mitarbeiter mit dem Entwicklungsprojekt und damit auf den Projekterfolg. ■

[www.c-lecta.com](http://www.c-lecta.com)



**Andreas Vogel**

Leiter der  
F&E Enzymabteilung  
c-LEcta GmbH

[contact@c-lecta.com](mailto:contact@c-lecta.com)

Bild: c-LEcta