

## Biokatalyse en fijnchemie : grenzen en perspectieven

Meijer, E.M.

Gepubliceerd: 01/01/1987

### *Document Version*

Uitgevers PDF, ook bekend als Version of Record

### **Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the author's version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

### *Citation for published version (APA):*

Meijer, E. M. (1987). Biokatalyse en fijnchemie : grenzen en perspectieven. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

---

# Biokatalyse en Fijnchemie

grenzen en perspectieven

Prof. dr. E.M. Meijer

---

# Biokatalyse en Fijnchemie

grenzen en perspectieven

Rede, uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van buitengewoon hoogleraar in de Bio-organische chemie aan de faculteit der Scheikundige Technologie van de Technische Universiteit Eindhoven op 15 mei 1987.

Prof. dr. E.M. Meijer

Zeer gewaardeerde toehoorders,

Een aantal redenen heeft mij er toe bewogen om een intreedende, zij het wat laat, uit te spreken. In de eerste plaats ben ik het min of meer verschuldigd aan al die mensen, vooral in de privésfeer, die zich al jarenlang afvragen wat voor vak ik nu eigenlijk uitoefen. Deze bijeenkomst lijkt mij uitermate geschikt om dit uit te leggen. Het is niet uitgesloten dat U het allemaal wat saai vindt.

Waarschijnlijk zou deze rede beter vallen wanneer hij werd uitgesproken na de receptie. Dat zou echter wel een te grote inbreuk op het protocol betekenen.

In de tweede plaats wil ik ook van deze gelegenheid gebruik maken om mijn werkomgeving bij DSM nog eens duidelijk te maken welke ontwikkelingen er in het vakgebied biokatalyse gaande zijn. Binnen DSM wordt in de wandelgangen onze sectie Bio-organische chemie aangeduid als de afdeling waar ze iets doen met 'beestjes'. U begrijpt, uitleg is dan op zijn plaats.

In de derde plaats wil ik met name de universitaire gemeenschap hier en elders graag iets vertellen over het onderzoek in de vakgroep Organische chemie en welke plannen we hebben voor de toekomst.

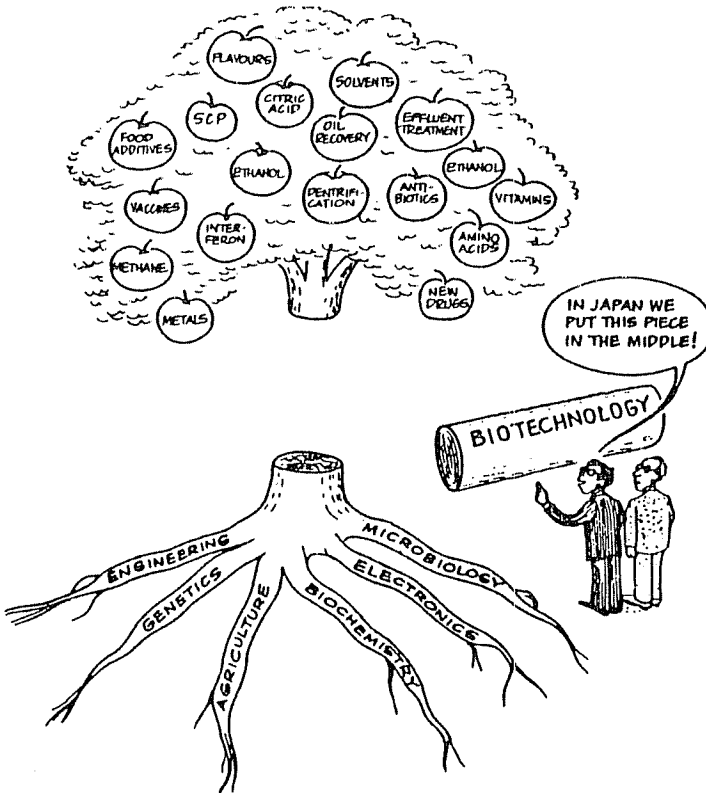
Het onderwerp van deze voordracht is 'Biokatalyse en fijnchemie'. Biokatalyse vormt een onderdeel van een veel breder gebied, dat van de biotechnologie. Waarschijnlijk is er geen gebied dat de afgelopen jaren zo sterk in de publieke belangstelling heeft gestaan als juist de biotechnologie.

In de pers werd en wordt nog steeds de discussie sterk bepaald door de voornamelijk ethische discussies rond genetische manipulatie. Hoewel wetenschappelijke doorbraken in dit gebied de interesse voor biotechnologie sterk hebben doen toenemen, gaat het hier slechts om één van de vele ontwikkelingen binnen de zogenaamde 'nieuwe' biotechnologie. Overigens ook door onderzoekers zelf werd aanvankelijk de suggestie gewekt dat de nieuwe vormen van genetische manipulatie, bekend als het recombinant-DNA onderzoek, het aanzien van onze maatschappij binnen enkele decennia compleet zouden veranderen.

Tegenwoordig verkeren we in wat rustiger vaarwater en wordt steeds genuanceerder gedacht over de mogelijke betekenis van de nieuwe ontwikkelingen binnen de biotechnologie, waaronder ook de biokatalyse, voor onze samenleving.

In 1980 werd door TNO een congres georganiseerd met het thema 'Biotechnology. A hidden past, a shining future'. Pas langzamerhand

is het besef doorgedrongen dat de biotechnologie eigenlijk al een schitterende toekomst achter zich heeft. Denkt U maar aan de productie van bier, wijn, kaas en antibiotica. Het is goed zich te realiseren dat deze 'klassieke' biotechnologische toepassingen, qua commerciële betekenis, het gezicht van de biotechnologie waarschijnlijk zullen blijven bepalen. Zelfs in Japan kunnen ze daar weinig aan veranderen, hoewel de onderstaande cartoon anders suggereert.



In de 'klassieke' biotechnologie neemt Nederland van oudsher een sterke positie in. De aanwezigheid van onder andere een uitgebreide zuivelindustrie en grote biotechnologische firma's als Gist-Brocades illustreren dit feit. In die zin is Nederland al de biotechnologie-delta van Europa. De vestiging van een paar Amerikaanse R&D firma's, die vooral afkomen op de gunstige

subsidiereregelingen en de goede wetenschappelijke infrastructuur, voegt hier weinig meer aan toe.

De Nederlandse bedrijvigheid in de biotechnologie is de laatste jaren sterk toegenomen, mede dankzij het stimuleringsbeleid van de overheid. In het februari-nummer van 'Biotechnologie in Nederland' presenteerden maar liefst 25 bedrijven en bedrijfjes hun nieuwe biotechnologische activiteiten. Ook op het gebied van de biokatalyse is een verhoogde inspanning waarneembaar. Tot nu toe zijn echter de nieuwe commerciële ontwikkelingen nog op de vingers van één hand te tellen.

Over de technisch-wetenschappelijke positie van Nederland in de moderne biotechnologie, met name ten opzichte van Japan en de Verenigde Staten, lopen de meningen sterk uitéén. Naar mijn mening lopen we niet achter en ook al zou dat wel zo zijn dan werkt nog altijd de wet van de remmende voorsprong in ons voordeel. Wat betreft de commerciële exploitatie van de nieuwe biotechnologische ontwikkelingen lijkt het erop dat het bedrijfsleven in Japan en de Verenigde Staten alerter reageert. De houding van het Nederlandse bedrijfsleven is in mijn ogen te afwachtend en te sterk risico mijndend. Als voorbeeld kan ik noemen dat vrijwel alle huidige biokatalytische processen zijn gerealiseerd in Japan en de Verenigde Staten.

Biotechnologie is een aandachtsgebied in het technologiebeleid van de overheid, hetgeen geresulteerd heeft in verschillende stimuleringsmaatregelen.

In 1981 is het Innovatiegerichte Onderzoekprogramma Biotechnologie (IOP-b) van start gegaan en werd de Programmacommissie Biotechnologie - ongelukkigerwijs afgekort tot PCB - geïnstalleerd, die op zeer voortvarende wijze zorg heeft gedragen voor de inrichting van het innovatieprogramma. Een van de belangrijkste doelstellingen van het IOP-b is het vormen van een brug tussen de fundamentele onderzoekswereld aan de ene kant en het bedrijfsleven aan de andere kant. Dit heeft geleid tot een sterke industriële inbreng in de prioriteitsstellingen binnen het universitaire biotechnologische onderzoek.

Op zich een uniek verschijnsel. De sturende rol van het bedrijfsleven moet echter niet worden overdreven, daar binnen de industrie de gedachtenvorming ten aanzien van de nieuwe ontwikkelingen in de biotechnologie zeker nog niet volledig is uitgekristalliseerd.

Het IOP-b heeft belangrijk bijgedragen aan het tot stand komen van

een goede wetenschappelijke infrastructuur in Nederland en de sterk toegenomen samenwerking tussen industrie en universiteiten. Beide zaken trekken ook in het buitenland de nodige aandacht. Op een enkele uitzondering na heeft dit nog niet geleid tot belangrijke technisch-wetenschappelijke innovaties. Waarschijnlijk is het te vroeg om nu al resultaten te verwachten.

Fijnchemie, een sector met groeikansen voor de Nederlandse chemische industrie, is één van de toepassingsgebieden die prioriteit heeft gekregen binnen het industriegerichte deelprogramma van het IOP-b. De geschatte bijdrage van biotechnologische processen in de fijnchemie in Nederland zal in 1990 ca. f 600 miljoen bedragen. Een toename van ca. f 100 miljoen t.o.v. 1985. Geen spectaculaire toename. De verwachte bijdrage van biokatalyse hierin zal nog kleiner zijn. Dit heeft te maken met een aantal beperkingen van de biokatalyse, waardoor een verdere penetratie in de fijnchemie wordt belemmerd.

Op deze grenzen van de biokatalyse, maar ook op de nieuwe toepassingsmogelijkheden als gevolg van recente ontwikkelingen, zal ik straks verder ingaan.

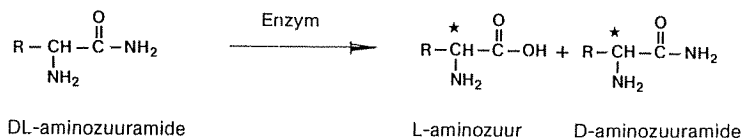
In de biokatalyse maken we gebruik van enzymen. Enzymen zijn katalysatoren van biologische oorsprong, die geheel of bijna geheel uit eiwitten bestaan.

Enzymen zijn katalytisch betrokken bij vrijwel iedere reactie die in de levende cel optreedt en dat betekent dat ze een breed spectrum van organisch chemische reacties katalyseren. Op enkele uitzonderingen na kunnen de meeste organisch chemische reacties, die we kennen, gekatalyseerd worden door enzymen. Enzymen bezitten nog meer uitzonderlijke eigenschappen. Zo zijn de meeste enzymen zeer efficiënte katalysatoren. Enzymgekatalyseerde reacties verlopen zeer veel sneller dan niet gekatalyseerde reacties. In extreme gevallen kan dit verschil zelfs een factor  $10^{12}$  bedragen. Daarnaast verlopen enzymatische reacties qua temperatuur en druk onder milde omstandigheden. Dit betekent onder andere dat bekende problemen in de organische chemie als racemisatie, epimerisatie, ontleding en dergelijke, kunnen worden vermeden.

Verder zijn enzymen vaak zeer selectief in hun werking. Hierbij gaat het om reactie-, regio- en stereospecificiteit. Vooral de laatste eigenschap heeft de interesse voor de toepassing van enzymen in de fijnchemie sterk bepaald.

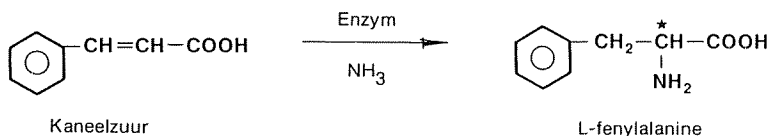
Een voorbeeld is de enzymatische resolutie van racemische mengsels van aminozuren. Verschillende industriële processen gebaseerd op dit principe zijn gerealiseerd. In figuur 1 is

schematisch de enzymatische resolutiestap weergegeven voor een dergelijk proces, dat bij DSM tot op semicommerciële schaal is ontwikkeld.



*Figuur 1*

Een ander voorbeeld betreft de enzymatische stereospecifieke synthese. In figuur 2 is het reactieschema afgebeeld voor de enzymatische synthese van L-fenylalanine, een grondstof voor de nieuwe zoetstof aspartaam.



*Figuur 2*

Beide reacties verlopen met vrijwel absolute stereoselectiviteit. Enzymen danken de genoemde bijzondere eigenschappen aan hun unieke ruimtelijke structuur, die opgebouwd is uit één of meer lange ketens van aminozuren.

Op grond van wat ik zojuist verteld heb, zou men verwachten dat enzymen intensief gebruikt worden in de organische chemie. Het is echter pas de laatste jaren dat de mogelijkheden van enzymen voor de organische chemie systematisch worden onderzocht. Verschillende oorzaken zijn hiervoor aan te wijzen. De belangrijkste is m.i. het feit dat de organische synthese zich lange tijd gericht heeft op de bereiding van complexe structuren, waarbij het vooral gaat om de vorming van koolstof-koolstofbindingen. Conventionele chemische methoden zijn hiervoor in het algemeen efficiënter dan enzymatische.

Daarnaast is een niet te onderschatten probleem de kloof die er bestaat tussen chemici enerzijds en biochemici/microbiologen anderzijds. Chemici zijn niet of nauwelijks bekend met de technieken en het vakjargon van biochemici en microbiologen, en omgekeerd. Voor de gewenste voortgang van het biokatalytisch onderzoek is een sterkere inbreng van de organische chemie beslist



noodzakelijk. Uit eigen ervaring weet ik hoe vruchtbaar een multidisciplinaire benadering kan zijn.

De industriële introductie van enzymatische methoden kampt nog met een aantal andere problemen. Ik noem er een aantal:

- Slechts een gering aantal enzymen van de duizenden die er bekend zijn, zijn beschikbaar in grotere hoeveelheden tegen een acceptabele prijs.
- De unieke ruimtelijke structuur die de enzymen hun specifieke werking verschaft, is er tegelijkertijd de oorzaak van dat enzymen weinig stabiel zijn onder de condities in de procesindustrie.
- De katalytische activiteit van enzymen kan sterk worden beïnvloed door o.a. de concentratie van reactanten en producten. Een bekend verschijnsel is het optreden van produktremming, wat betekent dat de activiteit van enzymen sterk kan afnemen bij relatieve lage produktconcentraties.
- Biokatalyse is op het eerste gezicht beperkt tot waterige media. Toepassing van organische oplosmiddelen kan belangrijke voordelen opleveren, wanneer het gaat om substraten en producten die in water slecht oplosbaar zijn. Gebruik van waterige media leidt in dat geval tot verdunde oplossingen, met als gevolg grote reactoren en bijbehorende procesapparatuur, en dure produktopwerking.
- Heel vaak hebben enzymen nog andere hulpstoffen nodig, de zogenaamde cofactoren. Eén van de belangrijkste cofactoren is het co-enzym NADH dat een rol speelt in enzymatische oxydatie-reductie reacties. Dit co-enzym wordt evenals het substraat in de reactie verbruikt. NADH is echter duur en voor een economisch verantwoorde omzetting is efficiënte regeneratie dan ook vereist. Industrieel geschikte regeneratiemethoden zijn tot op heden echter nog niet ontwikkeld.

Na deze opsomming van problemen zal het U duidelijk zijn waarom biokatalytische methoden nog relatief weinig worden toegepast in de industriële fijnchemie. Daarnaast moet worden bedacht dat in de afgelopen jaren ook de organische chemie sterke ontwikkelingen heeft doorgemaakt. Het beperkte gebruik van enzymen in de fijnchemie wordt ten dele dan ook zeker veroorzaakt door het feit dat er geschikte chemische processen voorhanden zijn. Dit geldt zelfs daar waar de sterkste eigenschap van enzymen in het geding is, de stereospecifieke werking. Zo wordt de stereospecifieke synthese van L-DOPA, een bekend middel tegen de ziekte van Parkinson, langs chemische weg uitgevoerd.

U zult zich wellicht afvragen of er dan nog kansen zijn voor enzymatische methoden. Op dit punt kan ik U en mijzelf, tenslotte is het mijn broodwinning, geruststellen. Er zijn succesvolle industriële toepassingen van enzymen in de fijnchemie, vooral in die

gevallen waar een lange chemische route drastisch kan worden bekort of wanneer toegang kan worden verkregen tot een reeks verbindingen die chemisch moeilijk te verkrijgen zijn. Een voorbeeld van de eerste situatie is de enzymatische productie van 6-aminopenicillaanzuur, een bouwsteen voor de productie van semisynthetische antibiotica, die U ongetwijfeld allemaal wel een keer zult hebben ingenomen. De tweede situatie kan worden geïllustreerd met de eerdergenoemde enzymatische bereiding van optisch actieve aminozuren via racemaatresolutie.

Maar juist bij verbindingen die langs klassiek chemische weg niet of moeilijk kunnen worden verkregen, zoals in het algemeen geldt voor optisch actieve verbindingen, treedt een extra complicatie op. Daar deze verbindingen niet beschikbaar waren, hebben er ook geen marktontwikkelingen plaatsgevonden. Dit betekent dat in deze gevallen de ontwikkeling van de enzymatische technologie, hand in hand moet gaan met de marktontwikkeling. De 'market-pull' moet worden gecreëerd. Nu wordt er verwacht dat de vraag naar meer selectieve geneesmiddelen en landbouwchemicaliën zal toenemen. Deze trend zal onder andere leiden tot een toenemende vraag naar efficiënte methoden voor de industriële synthese van optisch actieve verbindingen. Juist hier kunnen biokatalytische methoden een belangrijke rol gaan spelen.

Hoewel er nu op laboratoriumschaal honderden enzymen beschikbaar zijn worden er op dit moment slechts ca. 20 enzymen op industriële schaal geproduceerd.

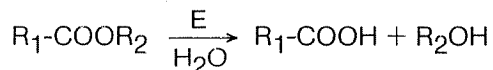
De voedingsindustrie is de grootste afnemer van industriële enzymen. In het totale plaatje is het verbruik van enzymen in de fijnchemische industrie nauwelijks zichtbaar.

Vrijwel alle enzymen die gebruikt worden in de industrie worden geproduceerd door micro-organismen. Micro-organismen zijn in dit opzicht aantrekkelijk omdat ze op grote schaal gekweekt kunnen worden en vanwege het feit dat er in toenemende mate kennis beschikbaar komt om de enzymproductieniveaus te verhogen via aanpassing van de groeiomstandigheden en via genetische manipulatie. De moderne ontwikkelingen in het laatstgenoemde gebied maken gerichte manipulatie van gendosis en genexpressie mogelijk. Hierdoor kan in principe de overproductie van gewenste enzymen worden bewerkstelligd, wat uiteindelijk leidt tot reductie van de kostprijs van enzymen die van belang kunnen zijn in de fijnchemie. Misschien teleurstellend voor enzymologen is het feit dat de meeste technische enzymen ruwe, weinig gedefinieerde enzympreparaten zijn. Dit heeft te maken met het streven naar een laag kostprijsniveau. Vaak worden zelfs hele cellen gebruikt, omdat zuivering veelal

gepaard gaat met activiteits- en stabiliteitsverlies. Het is dan ook beter om over biokatalysatoren te spreken i.p.v. enzymen. Een belangrijke economische overweging is dat alleen grootschalige processen de nog steeds hoge ontwikkelings- en produktiekosten van een biokatalysator kunnen dragen. Dit betekent dat voor veel fijnchemische produkten, met een beperkte marktgrootte, de ontwikkeling van een specifieke biokatalysator niet of nauwelijks gerechtvaardigd is. In dit opzicht moet de specificiteit van enzymen als een nadeel worden gezien. Enzymen voor fijnchemische produktie dienen toegepast te kunnen worden voor de bereiding van een reeks van produkten. Gelukkig wordt het meer en meer duidelijk dat veel enzymen een brede reeks van substraatstructuren accepteren, waaronder ook 'onnatuurlijke' substraten, met behoud van voldoende katalytische activiteit en, als daar sprake van is, zelfs met behoud van de stereospecifieke werking.

Recent zijn er ook nieuwe mogelijkheden binnen bereik gekomen om de toepasbaarheid van enzymen te vergroten. Enzymen vertonen soms niet vermoede katalytische eigenschappen als ze in contact worden gebracht met ongebruikelijke substraten. Gebleken is onder andere dat peroxidases in staat zijn tot selectieve hydroxylering van aromatische verbindingen. Daarnaast kunnen enzymen toegepast worden in niet-waterige milieu's, waardoor nieuwe reacties mogelijk worden. Enzymogenen zullen er aan moeten wennen dat enzymen actief zijn in organische milieu's met soms extreem lage watergehaltes. Lipases die in waterig milieu asymmetrische hydrolyse geven van esters, kunnen, zoals aangegeven in onderstaand schema, in organisch milieu stereospecifieke veresterings- en omesterings reacties katalyseren.

*Waterig milieu:*



*Organisch milieu:*



Verskillende commerciële ontwikkelingen zijn op dit principe gebaseerd.

In sommige gevallen is een verrassende wijziging van de

substraatspecificiteit geconstateerd wanneer water wordt vervangen door een organisch oplosmiddel.

Enzymen zijn dus tot meer in staat dan men zou verwachten. Indien de genoemde nieuwe mogelijkheden algemeen toepasbaar blijken te zijn, kunnen ze in belangrijke mate bijdragen tot een verdere penetratie van enzymatische werkwijzen in de industriële fijnchemie. Eén belangrijke ontwikkeling, met het oog op een bredere toepassing van enzymen, heb ik nog niet genoemd. Dat is de mogelijkheid om op gerichte wijze de substraatspecificiteit van enzymen te veranderen via de methode van de plaatsspecifieke mutagenese. Het voert te ver om de procedure hier uitvoerig te behandelen. Bovendien moet ik nog wat stof overhouden voor een eventuele afscheidsrede. In het kort komt het hier op neer: door gerichte manipulatie van de genetische informatie die voor een bepaald enzym codeert, is het mogelijk om elk willekeurig aminozuur bijvoorbeeld in de 'active site' te vervangen door een ander, waardoor in principe de substraatspecificiteit kan worden beïnvloed.

Het zal duidelijk zijn dat erg veel informatie over het enzym bekend moet zijn, zoals de ruimtelijke structuur en structuur-functie relaties, voordat gerichte aanpassing kan worden bewerkstelligd. Hoewel de ontwikkelingen zeer snel gaan, liggen industriële toepassingen nog wat verder weg. Screening van micro-organismen op nieuwe enzymatische activiteiten blijft voorlopig de aangewezen weg. Op dit punt lijkt de natuur schier onuitputtelijk.

De enzymkosten in een proces kunnen ook worden verlaagd door hergebruik. Een probleem is echter dat enzymen oplosbaar zijn in waterige media en daardoor moeilijk af te scheiden uit het reactiemengsel. Een oplossing is het immobiliseren van enzymen bijvoorbeeld door binding aan een vaste drager of door insluiting in een polymere gel of membraan. De techniek om enzymen te immobiliseren heeft een stormachtige ontwikkeling doorgemaakt. Naast efficiënt hergebruik bieden geïmmobiliseerde enzymen nog andere voordelen van procestechnologische aard. Zo is ondermeer continue procesvoering mogelijk.

Op grond hiervan zou de suggestie kunnen worden gewekt dat het industriële gebruik van geïmmobiliseerde enzymen of cellen sterke opgang zou hebben gemaakt. Niets is echter minder waar. Slechts een beperkt aantal biokatalytische processen maakt gebruik van geïmmobiliseerde biokatalysatoren. Waar wordt dit door veroorzaakt? In de eerste plaats is van de honderden gepubliceerde immobilisatiemethoden, slechts een beperkt aantal op grotere schaal toepasbaar gebleken, vanwege problemen die samenhangen

met samendrukbaarheid van biokatalysatordeeltjes in grote kolom-reaktoren, slijtvastheid in geroerde tankreactoren etc. In de tweede plaats spelen natuurlijk ook kostenoverwegingen een rol. Veel technieken zijn eenvoudig te duur. In andere gevallen treedt een onaanvaardbaar activiteitsverlies op tijdens de immobilisatie-procedure. Verder moet van geval tot geval bekeken worden of immobilisatie wel zinvol is. Bijvoorbeeld met weinig stabiele enzymen, waar de mogelijkheid van hergebruik geen rol speelt, zal eerder worden gekeken naar verbetering van de produktiemethode dan naar immobilisatie om de enzymkosten te drukken. Niettemin blijft de noodzaak van onderzoek naar betere en goedkopere immobilisatiemethoden bestaan.

Eén van de eerdergenoemde factoren die de praktische toepassing van enzymen beperkt is de relatief geringe stabiliteit van enzymen onder procescondities. Veel enzymen zijn met name te weinig thermostabiel, ook bij de milde temperatuur waarbij ze worden toegepast.

Soms wordt een verbeterde thermische stabiliteit waargenomen na immobilisatie, maar dat is eerder uitzondering dan regel. Een verklaring is, dat als gevolg van de immobilisatie de actieve conformatie van het enzym wordt gefixeerd, waardoor denaturatie-processen minder snel verlopen.

In een incidenteel geval is het gelukt door gebruik te maken van 'proteïne engineering' technieken, zoals de reeds besproken plaats-specifieke mutagenese, om de stabiliteit van enzymen te verbeteren. Gericht en rationele wijziging van de stabiliteit mag op dit moment niet worden verwacht, daar de factoren die de enzymstabiliteit bepalen nog verre van duidelijk zijn. Veel onderzoek moet nog worden verricht, voordat de mechanismen achter de thermische inactivering zijn opgehelderd.

Recent is ontdekt dat de thermische stabiliteit van enzymen sterk kan toenemen wanneer ze worden gesuspenseerd in vrijwel watervrije organische oplosmiddelen. Een mogelijke verklaring is, dat processen die betrokken zijn bij de irreversibele thermische inactivering van enzymen en waarvoor water nodig is, niet of nauwelijks optreden onder deze omstandigheden. De algemene toepasbaarheid van de methode moet overigens nog worden bewezen.

Een andere, voor de hand liggende, methode om thermostabieler biokatalysatoren te verkrijgen, maakt gebruik van het feit dat zogenaamde thermofiele micro-organismen, die optimale groei vertonen bij hogere temperaturen, enzymen produceren die een verhoogde thermostabiliteit kunnen bezitten. In de enzymatische

bereiding van de zoetstof aspartaam, waarvoor een fabriek in aanbouw is op de DSM-lokatie te Geleen, wordt een dergelijke thermostabiele biokatalysator toegepast.

Maar alles heeft zijn prijs en waarschijnlijk gaat toegenomen thermische stabiliteit ten koste van katalytische efficiëntie. Bovendien is het onderzoek aan thermofiele micro-organismen, gelet op grootschalige productie, nog maar nauwelijks begonnen.

Een aardige gedachte is om m.b.v. recombinant-DNA technieken, het gen van een thermostabiel enzym te kloneren in een geschikte industriële produktiestam.

Verschillende malen is in deze rede al het gebruik van organische oplosmiddelen als reactiemedium voor enzymatische omzettingen aan de orde geweest. Gezien de al aangegeven potentiële voordelen van organische oplosmiddelen in geval van slecht wateroplosbare substraten en producten, is het niet verrassend dat dit thema grote aandacht krijgt in het biokatalytisch onderzoek.

Pogingen om enzymatische reacties uit te voeren in homogene mengsels van water en organische oplosmiddelen zijn slechts incidenteel succesvol geweest. De reden is de instabiliteit van veel enzymen in dergelijke systemen. Betere benaderingen zijn de zogenaamde twee-fasen-systemen bestaande uit een waterfase en een niet met water mengbare organische fase. De biokatalysatoren bevinden zich in deze systemen in de waterige fase, terwijl producten en substraten voornamelijk voorkomen in de organische fase. Een additioneel voordeel is dat eventuele substraat- of produktinhibitie sterk kan worden gereduceerd omdat de concentraties in de directe omgeving van de biokatalysator laag zijn. Veel systematisch onderzoek naar een optimaal procesontwerp voor twee-fasen of meer-fasen-systemen is nog niet verricht. Dit zal zeker nodig zijn voor verdere industriële toepassing, die al plaatsvindt met betrekking tot de enzymatische modificatie van vetten.

Een ander systeem geschikt voor de bioconversie van slecht wateroplosbare verbindingen is dat van de omgekeerde micellen. Een dergelijk systeem bestaat uit zeer fijnverdeelde door zeep gestabiliseerde waterdruppeltjes, waarin zich de biokatalysator bevindt, in een organisch oplosmiddel. Industriële toepassingen zijn nog niet bekend.

De tot dusver genoemde methoden kunnen worden gezien als een overgang tussen volledig waterige media en organische oplosmiddelen. Een heel interessante ontwikkeling is de toepassing van enzymen in nagenoeg watervrije organische oplosmiddelen. Hoewel water absoluut noodzakelijk is voor het katalytisch functioneren van

enzymen, kunt U zich voorstellen dat slechts een minimale hoeveelheid water echt noodzakelijk is en dat de rest kan worden vervangen door een organisch oplosmiddel. Hoewel dit verschijnsel al langer bekend is, wordt sinds kort echt systematisch onderzoek verricht met name door Klibanov en medewerkers van het MIT. Zij hebben aangetoond dat verschillende enzymen actief blijven in nagenoeg watervrije veelal hydrofobe organische oplosmiddelen. Al eerder is opgemerkt dat onder deze condities de thermostabiliteit van het enzym toeneemt, de substraatspecificiteit zich kan wijzigen en nieuwe reacties mogelijk zijn.

In de komende tijd zal duidelijk moeten worden of het hier gaat om een algemeen toepasbaar concept en er dus sprake is van een echte doorbraak van grote betekenis voor gebruik van biokatalytische methoden in de fijnchemie.

Een nadeel van de onoplosbaarheid van enzymen in organische oplosmiddelen is het optreden van diffusiebeperkingen in de vaste deeltjes. Een elegante oplossing is gevonden door Japanse onderzoekers die enzymen oplosbaar maken in organische oplosmiddelen door covalente modificatie met polyethyleenglycol.

Tot dusver is de commerciële toepassing van biokatalysatoren in de fijnchemie beperkt gebleven tot enzymen die relatief eenvoudige reacties, met name hydrolytische reacties, katalyseren. Bijvoorbeeld, enzymatische oxydatie-reductie reacties worden op een enkele uitzondering na niet toegepast. Het ontbreken van efficiënte regeneratiemethoden voor co-enzymen als NAD(P)H en ATP vormt de grootste belemmering voor de introductie van meer geavanceerde bioconversies in de industriële praktijk. Zeer veel en langdurig onderzoek is verricht om dit probleem op te lossen. Tot nu toe heeft dit alleen maar geresulteerd in regeneratiemethoden die op laboratoriumschaal bruikbaar zijn.

Slechts een enkel systeem vertoont commercieel aantrekkelijke eigenschappen. Een voorbeeld is een methode waarbij  $\text{NAD}^+$  wordt gekoppeld aan polyethyleenglycol en de regeneratie enzymatisch plaatsvindt. Alle betrokken enzymen en het vergrote co-enzym worden in het reactiesysteem gehouden door gebruik te maken van een membraanreactor. Substraat en product kunnen het membraan ongehinderd passeren.

Ondanks de hoge regeneratie efficiëntie (hoger dan 99,9 %) heeft dit systeem, bij mijn weten, de laboratoriumtafel nog niet verlaten. Een meer belovende ontwikkeling lijkt het gebruik van hele 'levende' cellen te zijn, waarmee de regeneratie van de co-enzymen in de natuurlijke omgeving kan plaatsvinden.

Dergelijke methoden worden toegepast voor de enzymatische

hydroxylering van steroïden. Maar veel onderzoek zal nog nodig zijn om de methoden zodanig te optimaliseren dat toepassing bij de productie van verbindingen met lagere toegevoegde waarden dan de dure farmaceutica, commercieel haalbaar is.



Dames en Heren,

Het zal U duidelijk zijn dat ik in deze voordracht alleen globaal de belangrijkste trends in het zich snel ontwikkelende vakgebied van de biokatalyse heb kunnen behandelen. Voor de studenten heb ik ca. 10 uur nodig om deze stof meer diepgaand te behandelen. Niettemin hoop ik dat U hebt begrepen dat ondanks de vele problemen die nog moeten worden overwonnen, er voldoende perspectieven zijn die de verwachting rechtvaardigen dat de biokatalyse in toenemende mate een rol zal gaan spelen in de fijnchemie. Geen dominante rol, maar als één van de technologieën die de fijnchemische industrie ter beschikking staat.

Het onderzoek dat in de vakgroep Organische chemie wordt verricht in relatie tot de biokatalyse is vooral fundamenteel van aard, waarbij eventuele toepassingsgerichte aspecten zeker niet uit het oog verloren worden. Verder behoort een universiteit mijns inziens ook niet te gaan. In samenwerkingsverbanden met de industrie lopen alleen bij dit type onderzoek de belangen van bedrijf en universiteit enigszins parallel. Toegepast onderzoek dient de functie van de universiteit als onderwijs- en onderzoeksinstituut niet.

Verschillende richtingen kunnen in het onderzoek van de vakgroep worden onderscheiden. Allereerst de studie aan  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  modelverbindingen, op grond waarvan een theorie kon worden opgesteld, die het inzicht in de stereospecifieke werking van de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -afhankelijke dehydrogenases heeft vergroot. We gaan nu een fase van het onderzoek in waarin we gaan proberen de ontwikkelde theorie ook experimenteel te bevestigen in enzymatische experimenten.

Daarnaast wordt het onderzoek uitgebreid in de richting van andere co-enzym analoga. Het doel is uiteindelijk om met behulp van 'molecular mechanics' berekeningen en resultaten van enzymatische experimenten structuur-functie relaties voor co-enzym analoga op te stellen. Mogelijk kan dit leiden tot een gerichte synthese van meer actieve  $\text{NAD}^+$ -analoga.

In de afgelopen jaren is hard gewerkt in de vakgroep aan de opbouw van een infrastructuur voor onderzoek gericht op de modificatie van enzymen langs chemische weg en de methode van plaatsspecifieke mutagenese. Het is de bedoeling dat beide technieken zullen worden aangewend om de interactie van co-enzymen en analoga met dehydrogenases te bestuderen. De kennis die zal worden verworven in het geschetste onderzoek

zal ons inzicht in de werking van dehydrogenases, een klasse van enzymen waarvoor een toenemende industriële interesse waarneembaar is, vergroten.

Onderzoek aan fijnchemische syntheses door middel van biokatalyse wordt nog niet verricht in Eindhoven. Mijns inziens is de geschikte infrastructuur aanwezig binnen de verschillende vakgroepen. Dit wordt nog versterkt door de komst van prof. Sheldon en de binnenkort te benoemen buitengewoon hoogleraar fijnchemie. De ontwikkeling van biokatalytische processen zal een projectmatige aanpak vragen met inbreng van verschillende disciplines als bio-organische chemie, katalyse en chemische technologie. Initiatieven om dit onderzoek van de grond te tillen in Eindhoven zou ik zeker toejuichen.

Geachte aanwezigen,

Wellicht zult U zich afvragen wat iemand bezielt om buitengewoon hoogleraar te worden naast een forse onderzoekstaak in de industrie. Niet alleen idealisme zoals de dekaan van onze faculteit, professor Tels, onlangs stelde in het universiteitsblad toen hij het had over het grote verloop onder hoogleraren en staf. Ik citeer: 'De faculteit zal het moeten hebben van idealisten die een tijd voor een aanzienlijk lager salaris willen werken'. Wat dit laatste betreft kan ik hem geruststellen, want ik hou er zelfs nog iets aan over. Een belangrijke beweegreden is voor mij geweest de noodzaak om het eigen kennisniveau op peil te houden. Eén dag per week weer voluit bezig zijn met wetenschappelijk onderzoek en onderwijs geeft mij voldoende bagage om ook in de industriële onderzoeksfeer op niveau bezig te kunnen blijven. Mijn ervaring is dat het in de researchmanagement functies binnen de industrie uiterst moeilijk is om wetenschappelijk bij te blijven. Uiteindelijk kan dit leiden tot verlies van 'wetenschappelijk bewustzijn' in de industriële research-organisatie op hogere niveau's. In een tijd waar zoveel draait om technisch-wetenschappelijke innovaties kan een industrie zich dat niet permitteren. Ook vind ik het belangrijk dat mensen uit de industrie betrokken zijn bij de wetenschappelijke vorming van studenten zowel in onderwijs als onderzoek. Tenslotte zijn zij de 'produkten' die de industrie later afneemt. Juist nu de industrie zoveel moeite heeft met de plaatsing van eerste-fase-academici in researchfuncties acht ik dit punt van wezenlijk belang.

Dames en Heren,

Rest mij om aan het eind van deze voordracht een paar woorden van dank uit te spreken.

Hare Majesteit de Koningin dank ik voor mijn benoeming. Mijn collega's in de sectie Bio-organische chemie van DSM Research ben ik veel dank verschuldigd, niet alleen omdat ze het mij mogelijk maken om één dag per week in Eindhoven te werken, maar ook omdat ik in de afgelopen jaren ontzettend veel van ze geleerd heb. Veel van deze opgedane kennis is verwerkt in deze voordracht.

Mijn dank gaat ook uit naar de directie van DSM Research, die mij gesteund heeft bij het aanvaarden van deze benoeming en tevens financiële middelen heeft verstrekt waarmee een promovendus kon worden aangetrokken en noodzakelijke apparatuur kon worden aangeschaft.

Een woord van dank is zeker ook bestemd voor de voorzitter van de vakgroep Organische chemie, professor Buck, die de moed en de visie heeft om over vakgrenzen heen te kijken. Mijn benoeming is daar in feite het resultaat van.

Zeer erkentelijk ben ik ook mijn voorganger professor Sluyterman die, hoewel de pensioen-gerechtigde leeftijd gepasseerd, nog dagelijks op het laboratorium aanwezig is. Zijn brede enzymologische kennis is voor mij een geweldige steun.

De overige leden van de vakgroep Organische chemie waardeer ik ten zeerste voor de wijze waarop zij mij hebben ingewerkt. In zeer korte tijd ben ik mij daardoor thuis gaan voelen in de toch wel sterk veranderde universitaire wereld.

Het bestuur van de faculteit der Scheikundige Technologie ben ik erkentelijk voor het in mij gestelde vertrouwen.

Tenslotte dank ik U voor Uw aanwezigheid en aandacht.

## Geraadpleegde literatuur

- Innovatieprogramma Biotechnologie. Eindrapport Programmacommissie Biotechnologie (mei 1985).
- Biotechnologie in Nederland, februari 1987, jaargang 4, nr. 1.
- Use of biocatalysts in the industrial production of specialty chemicals, E.M. Meijer, W.H.J. Boesten, H.E. Schoemaker and J.A.M. van Balken, in: Biocatalysts in Organic Syntheses (Elsevier, 1985), pp. 135-156.
- Enzymes in organic synthesis, J.B. Jones, Tetrahedron vol. 142, no. 13, pp. 3351-3403 (1986).
- Enzyme in der organischen Synthese, G.M. Whitesides und C.H. Wong, Angew. Chem. 97, 617-638 (1985).
- Enzymes that work in organic solvents, A.M. Klivanov, Chemtech, June 1986, pp. 354-359.