Thomas Schmidt

Experimentelle Analyse, Modellierung und biochemische Charakterisierung von Ein- und Zweiphasenreaktionen für die technische Biokatalyse

Experimentelle Analyse, Modellierung und biochemische Charakterisierung von Ein- und Zweiphasenreaktionen für die technische Biokatalyse

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Ingenieurwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur (FH)

Thomas Werner Schmidt

aus Amberg

Berichter: Universitätsprofessor Dr.-Ing. Winfried Hartmeier (RWTH Aachen)
Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. Marion Ansorge-Schumacher (TU Berlin)

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Diese Arbeit entstand im Rahmen meiner Beschäftigung als wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen. Durch die Projektanbindung an einen Sonderforschungsbereich (SFB 540) und ein Graduiertenkolleg (BioNoCo) konnten tief greifende Einblicke in verschiedene Fachgebiete gewonnen werden. Dieser Vorteil wirkte sich in einer fächerübergreifenden Abhandlung des Themas aus. Biologische und ingenieurwissenschaftliche Felder prägen die Arbeit. Biochemisch fundierte Kenntnisse runden das Bild ab. Vor diesem Hintergrund soll diese Arbeit eine praktisch relevante Vorgehensweise bieten, um akademische sowie industrielle Bedürfnisse in einem ausgewogenen Rahmen zu bedienen, sowie die Integration verschiedener Fachbereiche in der Biotechnologie zu verdeutlichen.

Für das Gelingen dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Winfried Hartmeier und Frau Prof. Marion Ansorge-Schumacher bedanken. Sie überließen mir das interessante Thema und unterstützten mein wissenschaftliches Interesse an interdisziplinären Fragestellungen auch jenseits des abgesteckten Arbeitspakets.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Patrick Gillessen und Fengying Xia bedanken, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten meine Ideen verwirklichten und so maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beitrugen. Darüber hinaus danke ich den Forschungsstudenten Christiane Römer, Alexander Dennig, Pamela Wenk, Bernd Njimeyer, Eva Baum, Nils Lilienthal und Annegret Roß, die mich engagiert unterstützten.

Insbesondere danke ich Anne van den Wittenboer und Fabrizio Sibilla für die zahllosen fachlichen Diskussionen und Ratschläge sowie die hilfreichen Tipps bei der Verfassung der Dissertation.

Nicht zuletzt der herzlichen Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl ist es zu verdanken, dass trotz gelegentlicher Dürreperioden die Arbeit großen Spaß machte. Dafür möchte ich allen Mitarbeitern herzlichst danken.

Für den familiären Rückhalt möchte ich meinen Eltern danken, die mich stets unterstützt und optimale Voraussetzungen für ein erfolgreiches Studium geschaffen haben. Ebenso möchte ich mich bei Katja für ihre herzliche Fürsorge und ihr Verständnis bedanken.

Things should be made as simple as possible, but not any simpler.

Albert Einstein

1 Einleitung 1
1.1 Industrielle Biokatalyse 1
1.2 Herausforderungen bei der Entwicklung biokatalytischer Prozesse 2
1.3 Biokatalysatoren mit technischer Bedeutung 4
1.4 Enzyme und Modellreaktionen in dieser Arbeit 5
1.4.1 Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* 5
1.4.2 Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* 8
1.5 Theoretische Grundlagen 10
1.5.1 Reaktionstechnik 10
1.5.2 Grundzüge der Modellierung 12
1.5.2.1 Beschreibung der Reaktionskinetik 13
1.5.2.2 Beschreibung thermodynamischer Einflüsse 16
1.6 Problematik einer rationaler Prozessauslegung in der Biokatalyse 17
1.7 Zielsetzung 19
2 Material und Methoden 21
2.1 Chemikalien 21
2.2 Geräte 21
2.3 Analytik 22
2.3.1 HPLC-Analyse 22
2.3.2 Fluoreszenzspektrometrie 23
2.3.3 UV-Vis-Spektrometrie 24
2.4 Allgemeine Methoden 26
2.4.1 Bereitstellung der BAL 26
2.4.2 Konzentrationsbestimmung und Lagerung der aktiven BAL 27
2.4.3 Synthese von TMB 27
2.4.4 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von (R)-TMB 28

2.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante von *L*-Glutamat und *L*-Histidin 28
2.4.6 Bestimmung des pH-Werts in wässrigen DMSO und DMF-Lösungen 29
2.5 Enzymkinetische Messungen im Einphasensystem 29
2.5.1 FDH-Kinetik 29
2.5.2 BAL-Kinetik unter Referenzbedingungen 30
2.5.3 BAL-Kinetik bei verschiedenen Reaktionsbedingungen 31
2.6 Messungen im Zweiphasensystem 33
2.6.1 Reaktorkonzept 33
2.6.2 Messperipherie des Zweiphasenrektors 33
2.6.3 Bestimmung der Enzymstabilität 35
2.6.4 Messung der Verteilung 35
2.6.5 Messung des Stofftransports 36
2.6.6 Enzymkinetische Messungen in reaktiven Zweiphasensystemen 36
2.6.7 Messung von Verteilung und Stofftransport bei variierenden Bedingungen 37
2.7 *In silico*-Experimente 38
2.7.1 Optimierung des Einphasensystems 39
2.7.2 Optimierung des Zweiphasensystems aus Puffer und Hexan 39
2.7.3 Optimierung des Zweiphasensystems aus Puffer und MIBK 39
3 Ergebnisse und Diskussion 41
3.1 Experimentelle Analyse und Modellierung 41
3.1.1 Strategie zur Modellidentifikation und Parameterschätzung 41
3.1.2 Kinetik der FDH 43
3.1.2.1 Mechanistisches kinetisches Modell 43
3.1.2.2 Formalkinetisches Literaturmodell 45
3.1.2.3 Vergleich der Modellgüte und Parameterwerte 45
3.1.3 Kinetik der BAL im Einphasensystem 49

3.1.3.1 Mechanistisches kinetisches Modell 50
3.1.3.2 Modellanpassung an Reaktionsanfangsraten 53
3.1.3.3 Modellanpassung an Verlaufskurven und Beurteilung der Modellgüte..... 54
3.1.3.4 Zusammenfassung 56
3.1.4 Einflussfaktoren auf den Reaktionsverlauf der BAL 57
3.1.4.1 Sensitivität der kinetischen Parameter 58
3.1.4.2 Identifikation und Modellierung der thermodynamischen Phänomene 59
3.1.4.3 Beurteilung der Modellgüte 65
3.1.4.4 Bestimmung der thermodynamischen Modellparameter 70
3.1.5 Kinetik der BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen..... 72
3.1.5.1 Enzymstabilität im Zweiphasensystem 73
3.1.5.2 Verteilung und Stofftransport..... 74
3.1.5.3 Entwicklung eines mathematischen Modells für Zweiphasensysteme 77
3.1.5.4 Bestimmung der intrinsischen Enzymkinetik durch Reaktionsanfangsraten79
3.1.5.5 Beurteilung der Modellgüte anhand von Reaktionsverläufen..... 82
3.1.5.6 Kritische Einschätzung der Ergebnisse 84
3.1.6 Einflussfaktoren auf die Reaktordynamik im Zweiphasensystem (BAL) 88
3.1.6.1 Analyse und Modellierung der Einflüsse auf die Reaktordynamik 89
3.1.6.2 Beurteilung der Modellgüte und Parameterschätzung 92
3.1.7 Bewertung der kinetischen und thermodynamischen Gleichungen 94
3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen (BAL) 96
3.2.1 Maximierung der RZA durch reaktionsspezifische Maßnahmen 97
3.2.2 Maximierung der RZA durch verfahrenstechnische Maßnahmen 102
3.2.3 Konsequenzen für technische Anwendungen 105
3.3 Biochemischer Vergleich mit anderen Arbeiten (BAL) 106
3.3.1 Vergleich der Temperaturabhängigkeit..... 107
3.3.2 Ionenstärke – eine missachtete Größe..... 107
3.3.3 DMF – die Lösung?..... 107

3.3.4 Welches ist das wahre pH-Maximum? 108

3.3.5 *DMSO* und *pH* – zwei korrelierte Größen? 109

3.3.6 Welche Aminosäurenseitenketten werden durch den pH-Wert beeinflusst? . 111

4 Zusammenfassung und Ausblick 114

5 Literatur 116

Abkürzungen

BAL	Benzaldehydlyase
DMBA	3,5-Dimethoxybenzaldehyd
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FDH	Formiatdehydrogenase
ThDP	Thiamindiphosphat
TMB	(R)-3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
HFCS	High fructose corn sirup
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
MIBK	Methylisobutylketon
SFC	*Supercritical fluid chromatography*

Formelzeichen

A	Substratkonzentration	mM
a	Phasengrenzfläche	dm^2
B	Substratkonzentration	mM
c	Konzentration	mM
C_{DMF}	Modellparameter des DMF-Modells	$(\%, v/v)^{-2}$
C_I	Modellparameter des Ionenstärkemodells	-
C^{GGW}	Modellparameter des Gleichgewichtmodells	s. Kap. 3.1.6.2
C^{ST}	Modellparameter des Stofftransportmodells	s. Kap. 3.1.6.2
d	Schichtdicke	cm
$DMBA$	Konzentration von DMBA	mM
DMF	DMF-Konzentration	%, v/v
DMF_{max}	Modellparameter des DMF-Modells	%, v/v
E	Enzymkonzentration	mM
e	Relativer Fehler	-
ε	Extinktionskoeffizient	$mM^{-1} \cdot cm^{-1}$
E_a	Aktivierungsenergie	$kJ \cdot mol^{-1}$
ee	Enantiomerenüberschuss	%
E_i	Inaktivierungsenergie	$kJ \cdot mol^{-1}$
Ext	Extinktion	-
F	Fläche	cm^2
ΔG^0	freie Standardenthalpie	$kJ \cdot mol^{-1}$
Ha	Hatta-Zahl	-

I	Ionenstärke	mM
i	Reaktand	-
Int	Intensität	-
Int_0	Hintergrundfluoreszenz	-
Int_1, Int_2, …, Int_9	Kalibrationskoeffizienten zur Berechnung von Konzentrationen aus Intensitäten	s. Tabelle 2.3
J	Stofftransport	$mmol \cdot s^{-1}$
K	Verteilungsgleichgewicht	-
k	Mikroreaktionskonstanten	s^{-1}
k_{cat}	Wechselzahl der Hinreaktion	s^{-1}
$k_{cat,r}$	Wechselzahl der Rückreaktion	s^{-1}
k_d	Zerfallsgeschwindigkeitskonstante	s^{-1}
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante	mM^{-1}
K_i	Dissoziationskonstante	mM
k_j	Stofftransportkoeffizient	$dm \cdot s^{-1}$
K_m	Bindungskonstante	mM
λ	Wellenlänge	nm
n	Einflussfaktoren	-
$NADH$	Konzentration von NADH	mM
P	Produktkonzentration	mM
pH	pH-Wert	-
pKs	Säurekonstante	-
Q	Produktkonzentration	mM
R	Allgemeine Gaskonstante	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	$mM \cdot h^{-1}$
$t_{0,5}$	Halbwertszeit	h
TMB	Konzentration von TMB	mM
V	Volumen	mL
v	Reaktionsrate	$mM \cdot s^{-1}$
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit	$mM \cdot s^{-1}$
X	Steigung	$Ext \cdot s^{-1}$
x	Stöchiometriefaktor	-
z	Ladung	-

Indizes

I	Einphasensystem
II	Zweiphasensystem
A	erstes Substrat
aq	wässrig
B	zweites Substrat

DMF	DMF-Konzentration
f	Hinreaktion
I	Ionenstärke
i	Reaktand
irrev	irreversible Reaktion
max	maximal
n	Einflussfaktoren
opt	optimal
org	organisch
P	erstes Produkt
pH	pH-Wert
Q	zweites Produkt
R	Reaktion
r	Rückreaktion
Real	Realverlauf
ref	Referenz
rev	reversibel
Spekulativ	Spekulativverlauf
T	Temperatur
zu	Zulauf

1 Einleitung

1.1 Industrielle Biokatalyse

Die Produktion von Feinchemikalien wird für die *Life Science Branche* immer wichtiger, zu der die pharmazeutische, nahrungsmittel- und landwirtschaftliche Industrie zählen. Solche Feinchemikalien besitzen oft mehrere funktionelle Gruppen, unterschiedliche Isomere, sowie eine komplexe Stereochemie (Blaser, 2003). Gerade der Bedarf an enantiomerenreinen Feinchemikalien als Vorläufersubstanzen therapeutischer Produkte stieg in den letzten Jahrzehnten. So betrug 2005 der Marktanteil enantiomerenreiner Arzneimittel 37 % und entsprach einem Marktvolumen von 225 Mrd. US-Dollar (Gadamasetti, 2008). Enantiomerenreine Arzneimittel sind dem Racemat wegen zwei ausschlaggebender Gründe vorzuziehen: Zum einen weil bekannt ist, dass entgegengesetzte Enantiomere chiraler Stoffe häufig stark voneinander abweichende pharmakologische (Islam *et al.*, 1997), toxikologische (Wainer, 1993), pharmakodynamische und pharmakokinetische (Drayer, 1986; Midha *et al.*, 1998) Eigenschaften aufweisen, und zum anderen weil die US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit (FDA) den Markteintritt enantiomerenreiner Arzneimittel beschleunigt (Breuer *et al.*, 2004). Doch chirale Arzneimittel müssen häufig aufwändig und kostspielig aus dem racemischen Gemisch isoliert werden (Gu und Grant, 2004). Durch den Einsatz von Enzymen kann dieser Nachteil überwunden werden.

Die komplexen strukturellen Eigenschaften von Enzymen machen sie zu hervorragenden Katalysatoren in der Synthese chiraler Bausteine mit Enantiomerenüberschüssen von nicht selten über 99 % (Bommarius und Riebel, 2004; Schoemaker *et al.*, 2003). Zudem verringern die meist herausragende Regioselektivität und hohe Spezifität von Enzymen die Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen (Patel, 2001) und erhöhen gleichzeitig die Produktreinheit. Die milden Reaktionsbedingungen, unter denen Enzymreaktionen meist ablaufen, benötigen einen vergleichsweise geringen Energieaufwand (Bommarius und Riebel, 2004; Schoemaker *et al.*, 2003) und tragen so zu einer attraktiven Prozessökonomie bei. Selbst im Vergleich zu chemischen Katalysatoren erzielen Enzyme bis zu 10^7-fach größere Reaktionsraten (Kula, 2002).

Dank der genannten Vorteile werden Enzyme kommerziell bereits seit über einem Jahrhundert für organische Synthesen erfolgreich genutzt (Liese *et al.*, 2000), die sich zum Teil gegen rein chemische Synthesen durchsetzen konnten (Peterson und Murray, 1952; Sarett, 1946; Sebek und Perlman, 1979). Wegen ihrer hohen Effizienz haben sich Enzyme mittlerweile einen festen Platz in der chemischen Industrie erobert. HFCS (*high fructose corn*

sirup) (Jensen *et al.*, 1987), Penicillin (Shewale und Sivaraman, 1989), *L*-Aminosäuren (Bommarius *et al.*, 1992), Peptide und eine Reihe anderer optisch aktiver Substanzen werden enzymatisch hergestellt (Biselli *et al.*, 2002). Die Synthese von ACE-Inhibitoren, Gerinnungshemmern, Cholesterinsenkern, Antiarrhytmika, Antipsychotika und Antibiotika, sowie die Entwicklung von entzündungshemmenden und antiviralen Arzneimitteln runden das pharmazeutische Einsatzgebiet von Enzymen ab (Patel, 2000a; Patel, 2000b; Patel, 2001). Von 1992 bis 2002 verdoppelte sich so die Zahl der industriellen biokatalytischen Prozesse (Straathof *et al.*, 2002). Beispiele solcher Prozesse sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1: Produktspektrum von industriellen enzymatischen Prozessen (nach Bommarius und Riebel, 2004).

Produkt	Enzym	Firma	Produktionsumfang [$t \cdot a^{-1}$]
HFCS	Glucoseisomerase	Verschiedene	> 1.000.000
Laktosefreie Milch	Laktase	Verschiedene	> 100.000
Acrylamid	Nitrilase	Nitto Co.	> 10.000
Nikotinamid	Nitrilase	Lonza, Guangzhou	> 1.000
Aspartam	Thermolysin	Tosoh/DSM	> 1.000
L-Aspartat	Aspartase	Verschiedene	> 1.000
Ampicillin	Penicillin-Amidase	DSM - Gist, Brocades	> 100
L-Methionin	*L*-Valin-Aminoacylase	Degussa	> 100
L-Dopa	*β*-Tyrosinase	Ajinomoto	> 100
(*R*)-Mandelsäure	Fumarase	BASF	> 100

1.2 Herausforderungen bei der Entwicklung biokatalytischer Prozesse

Seitdem erkannt wurde, dass viele Enzyme in organischen Lösungsmitteln aktiv sind (Buckland *et al.*, 1975; Klibanov, 1986; Martinek *et al.*, 1981; Zaks und Klibanov, 1984), eröffneten sich weitere technologische Perspektiven. Bei geeigneter Wahl bieten organische Lösungsmittel hohe Löslichkeiten für Stoffe, die ansonsten in reiner Wasserphase unlöslich sind und somit enzymatisch nicht umgesetzt werden können. Das organische Lösungsmittel dient als Substratreservoir und stellt im Idealfall gleichzeitig das Extraktionsmittel für das Produkt dar (Abbildung 1.1). Neben der erleichterten Aufarbeitung besteht ein weiterer Vorteil darin, dass durch die Produktextraktion höhere Umsätze erzielt werden können, wenn

die Enzymreaktion thermodynamisch limitiert ist. Weiterhin bieten organische Lösungsmittel die Möglichkeit, wasserinstabile Verbindungen zu stabilisieren (Klibanov, 1989; Kvittingen, 1994; Zaks und Klibanov, 1984) sowie Nebenreaktionen und mikrobielle Kontaminationen zu unterdrücken (Blaser *et al.*, 2001). Da die meisten chemischen Prozesse in organischen Lösungsmitteln ablaufen, wird zudem die Kopplung von chemischen und biokatalytischen Reaktionen erleichtert (Halling, 2002). Nachdem sich nun enzymatische Reaktionen nicht mehr auf rein wässrige Lösungen beschränkten, wurden Enzyme als Alternative zu herkömmlichen Katalysatoren akzeptiert (Lilly, 1994). Industriell haben sich seither biokatalytische Prozesse etabliert, die ein organisches Lösungsmittel einsetzen. Namhafte Firmen sind Novartis (Liese, 2002), BASF (Balkenhohl *et al.*, 1997), Bristol-Myers Squibb (Patel und Saul, 1997), Hoffmann La Roche (Doswald *et al.*, 1994), DuPont (Hann *et al.*, 1999) und DSM (Schmid *et al.*, 2001a). Da intensive Forschungen das Verständnis von Enzymreaktionen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen ständig erhöhen, ist weiterhin mit hohen Zuwachsraten industrieller Prozesse zu rechnen.

Trotz aller beschriebenen Vorteile und Errungenschaften, werden immer noch deutlich weniger biokatalytische als rein chemische Prozesse in den Industriemaßstab übertragen. Die geringere Konkurrenzfähigkeit von biokatalytischen Prozessen kann unter anderem der Tatsache zugeschrieben werden, dass mit ihnen bisweilen nur geringe Produktivitäten erreicht werden konnten. Dies verwundert vor dem Hintergrund, dass sich eigentlich enzymatische Reaktionen durch gute bis ausgezeichnete Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) auszeichnen (Bommarius und Riebel, 2004), wie die Synthese von *L*-Aspartat mit 60 $kg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (Rozzell, 1999) beweist. Weitere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Produktivität enzymatischer Synthesen mit der Substratlöslichkeit zusammenhängt: Je besser die Löslichkeit, desto höher ist die RZA (Bommarius und Riebel, 2004). Hier könnten wässrig-organische Zweiphasensysteme eine elegante Lösung darstellen, wenn geringe Substratlöslichkeit die Produktivität begrenzt. Geringe Stabilitäten der Biokatalysatoren könnte ein weiteres Problem darstellen, enzymatische Reaktionen industriell zu nutzen. Prozesse erfordern stabile Katalysatoren, was viele Enzyme von einer technischen Synthese ausschließt. Vor allem in wässrig-organischen Zweiphasensystemen ist die Enzymstabilität häufig kleiner als in wässrigen Lösungen. Dies ist auf zwei Mechanismen zurückzuführen: (Abbildung 1.1): (1) In der wässrigen Phase gelöste Lösungsmittelmoleküle wirken toxisch auf das Enzym (molekulare Toxizität). Moleküle, die die Enzymstabilität beeinträchtigen, werden allgemein Modulatoren genannt, wobei auch die Reaktanden einer Enzymreaktion als Modulatoren wirken können. (2) An der Phasengrenzfläche wird das Enzym teilweise entfaltet oder vollständig denaturiert (Phasentoxizität) (Baldascini und Janssen, 2005; Straathof, 2003). Aufgrund der Destabilisierung müssen in jedem Einzelfall Kosten und Nutzen eines Zweiphasensystems abgeschätzt werden. Während Lösungsmittel mit guten Lösungseigenschaften bereits erfolgreich mittels fluiddynamischer Strategien identifiziert werden konnten (Peters und Zavrel *et al.*, 2008), beschränkte sich die Beurteilung der

Enzymverträglichkeit eines Lösungsmittels meist auf das bewährte Log-P-Konzept. Mehrere Literaturbeispiele entkräften jedoch die Allgemeingültigkeit dieses Konzepts (Mozhaev *et al.*, 1989; Osborne *et al.*, 1990), weswegen jedes Lösungsmittel zusätzlich empirisch beurteilt werden sollte.

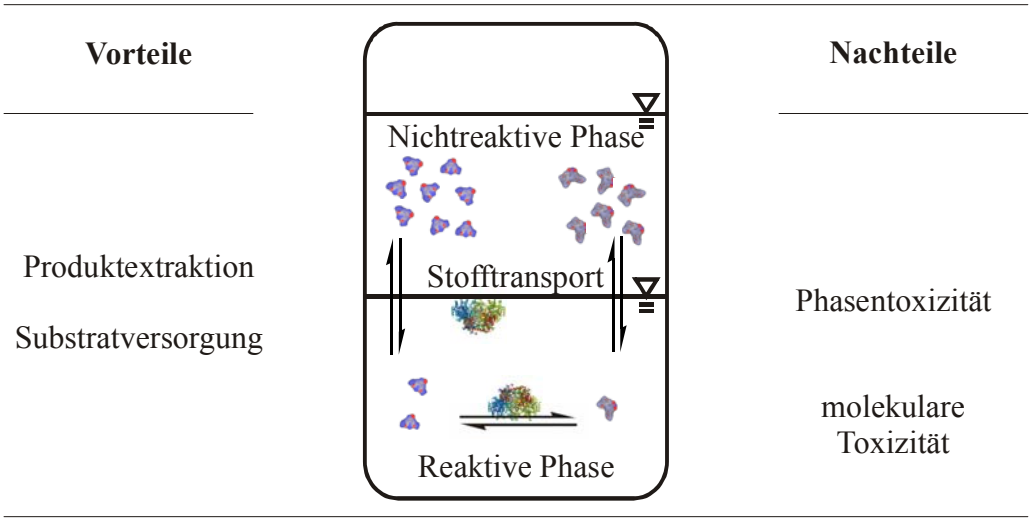


Abbildung 1.1: Wichtige Vor- und Nachteile eines wässrig-organischen Zweiphasensystems.

Eine weitere Ursache geringerer Zuwachsraten kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass bisweilen enzymatische Prozesse sehr lange Entwicklungszeiten erforderten. Die Entwicklung des Prozesses zur Herstellung von *L*-Carnithin beispielsweise dauerte 15 Jahre, die von Acrylamid gar 20 Jahre, was im Vergleich zur Gültigkeit eines Patents zu lange ist (Bommarius und Riebel, 2004). Dieses Problem kann möglicherweise durch frühzeitige Integration von reaktionstechnischen Methoden in die Forschung überwunden werden. Indem biologische und ingenieurwissenschaftliche Felder zusammenwachsen, ermöglicht die rationale experimentelle Analyse von enzymatischen Reaktionen in Kombination mit modernen Methoden der Bioinformatik, enzymatische Prozesse effizient zu optimieren. Als Konsequenz könnten enzymatische Prozesse zukünftig schneller auf industrielles Niveau gelangen (Eckstein, 2004). Umgekehrt wird damit die Dringlichkeit der Reaktionstechnik für die Auslegung von industriellen Synthesen deutlich.

1.3 Biokatalysatoren mit technischer Bedeutung

Drei Enzymklassen finden im Wesentlichen industrielle Anwendung. Dabei handelt es sich um Hydrolasen, Oxidoreduktasen und Lyasen, wobei in der asymmetrischen Synthese von Feinchemikalien vorwiegend Oxidoreduktasen und Lyasen verwendet werden (Straathof *et*

al., 2002). Mit 30 % machen die Oxidoreduktasen einen großen Anteil der industriell genutzten Enzyme aus, während immerhin 12 % der industriell relevanten Enzyme Lyasen sind. Beispielhaft sind in Tabelle 1.2 eine Auswahl bedeutender Prozesse aufgelistet, die als Katalysatoren Enzyme dieser Klassen einsetzen und direkt ein pharmazeutisches Produkt oder Vorstufen davon hervorbringen. Ebenfalls zu diesen Enzymklassen gehören die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme, die im nächsten Kapitel näher beschrieben werden.

Tabelle 1.2: Anwendung von Oxidoreduktasen und Lyasen in der pharmazeutischen und feinchemischen Industrie nach Liese *et al.* (2000).

Enzym(e)	Produkt	Firma
Alkoholdehydrogenase + Formiatdehydrogenase	Pheromone, Amphetamine, Antiepileptika, Blutdrucksenker,	Forschungszentrum Jülich
Alkoholdehydrogenase + Glutamatdehydrogenase	Cholesterinsenker	Bristol-Myers Squibb
(*R*)-Lactat-Dehydrogenase + Formiatdehydrogenase	ACE-Hemmer	Ciba-Geigy
L-Leucin-Dehydrogenase + Formiatdehydrogenase	Antikanzerogene Agenzien, HIV-Protease-Inhibitor	Degussa AG
D-Aminosäureoxidase + Glutarylamidase	Penicillin, Cephalosporin	Hoechst Marion Roussel
Aspartat-β-Decarboxylase	Apoxicillin	Tanabe Seiyaku Co., Ltd.
N-Acetylneuraminat-Pyruvatlyase	Neuraminidasehemmer	Forschungszentrum Jülich, Glaxo
Aspartase	Aspartam	BioCatalytics

1.4 Enzyme und Modellreaktionen in dieser Arbeit

1.4.1 Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Oxidoreduktasen (EC. 1.x.x.x) katalysieren die Aufnahme oder Abgabe von Elektronen eines Substrates, wobei Coenzyme oder Cofaktoren die dabei notwendigen Elektronen liefern oder aufnehmen. Die bekanntesten Oxidoreduktasen sind die NAD^+-abhängigen Dehydrogenasen (Frey und Hegeman, 2007). NAD^+ fungiert als Elektronendonor und wird im stöchiometrischen Verhältnis zu NADH reduziert. Ein technischer Einsatz wie in Tabelle 1.2

gezeigt ist deshalb nur wirtschaftlich, wenn auf ein funktionsfähiges System zur Regenerierung von NADH zurückgegriffen werden kann (Chenault und Whitesides, 1987; Wichmann und Vasic-Racki, 2005). Die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH, E.C.1.2.1.2) nimmt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle ein und ist ebenfalls ein technisch bedeutender Vertreter der NAD^+-abhängigen Dehydrogenasen. Die FDH katalysiert die in Abbildung 1.3 gezeigte Teilreaktion und wird mit verschiedenen Enzymen gekoppelt erfolgreich zur Cofaktorregeneration genutzt.

Der Reaktionsmechanismus der FDH wurde mit Hilfe von kinetischen Messungen sowie der Analyse von Inhibitionsmustern untersucht (Kato *et al.*, 1980). Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Reaktion einem geordneten *Bi-Bi*-Mechanismus gehorcht und aus vier Elementarreaktionen besteht: zuerst bindet NAD^+ an die FDH und bildet den Enzym-Substrat-Komplex [NAD^+-FDH], dann bindet Formiat unter Ausbildung eines ternären Komplexes [CO_2-NADH-FDH]. Das Produkt CO_2 dissoziiert von dem ternären Komplex, NADH wird freigesetzt und das Enzym kann den nächsten Katalysezyklus eingehen (Blanchard und Cleland, 1980; Kato *et al.*, 1979). Dieser Mechanismus konnte durch Deuterium- und ^{13}C Isotopen-Effekte sowie weitere kinetische und irreversible Inhibitionstests bestätigt werden (Blanchard und Cleland, 1980). Da gasförmiges CO_2 wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit entweicht, wird angenommen, dass die Reaktion praktisch irreversibel ist (Schütte *et al.*, 1976). Der auf diesen Schlussfolgerungen basierende Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.2 gezeigt.



Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus der FDH-katalysierten Reduktion von NAD^+ zur Cofaktorregeneration.

Die rationale Auslegung eines industriellen Prozesses erfordert geeignete enzymkinetische Modelle, um die Reaktion zu beschreiben und zu optimieren. Kula *et al.* (1980) sagten die FDH-Kinetik mit dem folgenden Modell voraus:

$$v = -\frac{dA}{dt} = \frac{V_{max} \cdot A \cdot B}{\left(K_{mA} \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iQ}}\right) + A\right) \cdot \left(K_{mB} + B\right)} \qquad (1.1)$$

wobei *v* die Reaktionsrate und *E*, *A*, *B* und *Q* jeweils die molaren Konzentrationen von FDH, NAD^+, Formiat und NADH bezeichnen. V_{max} ist die Maximalgeschwindigkeit. Bei K_{mA}, K_{mB} und K_{mQ} handelt es sich um die Bindungskonstanten von NAD^+, Formiat und NADH und bei K_{iA} und K_{iQ} um die Dissoziationskonstanten von NAD^+ und NADH. k_{cat} stellt die Wechselzahl dar. In der angewandten Biokatalyse wurde ausschließlich dieses Modell benutzt, um Prozesse zu beschreiben, die die FDH einsetzten (Felber, 2001; Findrik und Vasic-Racki, 2007; Hummel *et al.*, 1987; Kragl *et al.*, 1992; Kragl *et al.*, 1996b; Liese *et al.*, 1998; Orlich und Schomaecker, 1999; Schmidt *et al.*, 1992; Wichmann *et al.*, 1981).

Heute ist die FDH eines der am besten erforschten Enzyme und wird seit den 80er Jahren industriell im großen Stil genutzt. Da die meisten biokatalytischen Reaktionen ohne Regeneration des Cofaktors unwirtschaftlich wären (Chenault und Whitesides, 1987; Wichmann und Vasic-Racki, 2005), zählt die FDH zu den wirtschaftlich bedeutendsten Oxidoreduktasen. Neben den bekannten Vorteilen ist besonders die Kombination aus thermodynamischer Triebkraft und vereinfachter Produktaufarbeitung durch das Entweichen von CO_2 hervorzuheben (Bommarius *et al.*, 1998; Wichmann und Vasic-Racki, 2005). Nicht zuletzt weil der Biokatalysator kommerziell erhältlich und unter Prozessbedingungen stabil ist (Tishkov und Popov, 2004), wurde die FDH vom Labor- bis in den Industriemaßstab genutzt (z.B. Bommarius und Karau, 2005; Hanson *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2001b; Wichmann und Vasic-Racki, 2005). Ein bedeutendes Anwendungsgebiet der FDH ist die Synthese von *L-tert*-Leucin in Kombination mit der *L-tert*-Leucindehydrogenase (Abbildung 1.3), sowie die Herstellung von anderen *L*-Aminosäuren, die erfolgreich von der Degussa AG produziert werden. *L*-Aminosäuren sind wichtige Bausteine in der Synthese von pharmazeutischen Wirkstoffen, wie bspw. Anti-Tumor-Medikamenten oder HIV-Protease-Inhibitoren (Liese *et al.*, 2000). Weitere Beispiele des Produktspektrums der FDH gibt die an früherer Stelle gezeigte Tabelle 1.2 wieder.

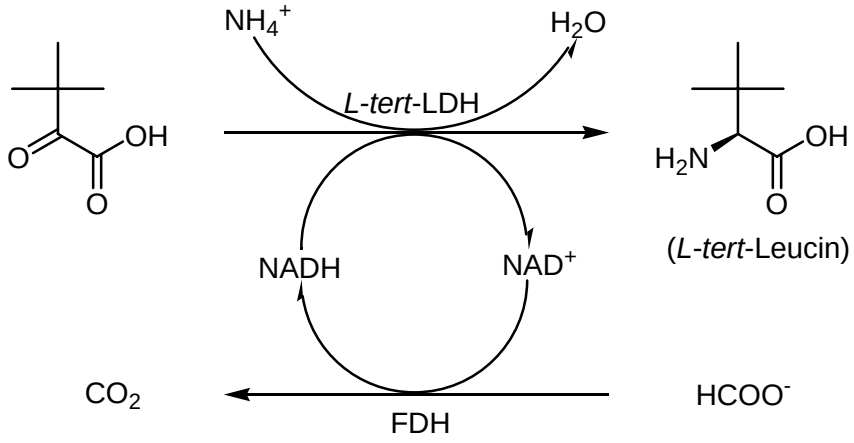
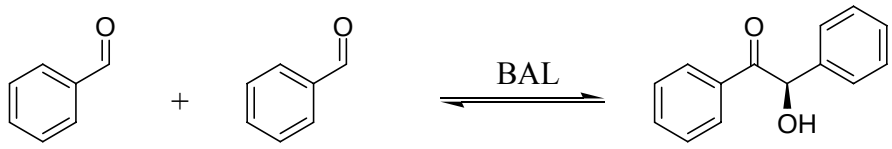


Abbildung 1.3: FDH als cofaktorregenerierendes Enzym bei der Synthese von *L-tert*-Leucin.

1.4.2 Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*

Lyasen (EC 4.x.x.x) knüpfen reversibel C-C, C-N oder C-O-Bindungen und eignen sich nicht zuletzt aufgrund ihrer häufig hohen Stereoselektivität für die feinchemische Industrie. Die Carboligation bildet einen der Schlüsselschritte in organischen Synthesen (Faber und Kroutil, 2005). Insbesondere ThDP-abhängige Enzyme zeichnen sich durch ihre exzellente Enantioselektivität bei der C-C-Knüpfung aus (Demir *et al.*, 2001b; Iding *et al.*, 2000; Pohl *et al.*, 2002) und sind für die Herstellung von pharmazeutisch aktiven α-Hydroxyketonen interessant (Kurlemann und Liese, 2004). Beispiele kommerzieller Anwendungen sind die chemisch-enzymatische Synthese von *L*-Ephidrin, Sexualpheromonen, Vitaminen und Isoprenoiden (Iding *et al.*, 1998; Schorken und Sprenger, 1998).

Die Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) katalysiert als Vertreter der ThDP-abhängigen Enzyme die Carboligationen von aromatischen Aldehyden. Auf diese Weise können wichtige Bausteine für die pharmazeutische Industrie synthetisiert werden (Demir *et al.*, 2001a). In einer Reihe von verschiedenen Forschungsprojekten wurde bereits das synthetische Potential der BAL untersucht (Domínguez de María *et al.*, 2006; Hildebrand *et al.*, 2007; Hischer *et al.*, 2005; Kurlemann und Liese, 2004; Stillger *et al.*, 2006). Abbildung 1.4 zeigt beispielhaft die enzymatische Synthese von (*R*)-Benzoin. Die herausragenden Fähigkeit Carboligationen mit sehr hoher Enantioselektivität zu katalysieren (Demir *et al.*, 2001b; Iding *et al.*, 2000; Pohl *et al.*, 2002) in Kombination mit der kürzlich eingereichten Patentanmeldung der Degussa AG vom 26.08.2006 (Patentnummer: WO2006EP50624 20060202) machen die ökonomische Signifikanz der BAL für organische Synthesen deutlich.



Benzaldehyd Benzaldehyd (*R*)-Benzoin

Abbildung 1.4: BAL-katalysierte Carboligation zur Synthese von (*R*)-Benzoin.

Die BAL wurde erst in den achtziger Jahren in *Pseudomonas fluorescens* entdeckt (Gonzalez und Vicuna, 1989). Sie besteht als Homotetramer aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 60 kDa. Die Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} binden an die Grenzfläche zweier Untereinheiten, so dass ein aktives Zentrum durch zwei Monomere gebildet wird. Insgesamt weist ein Tetramer vier aktive Zentren auf (Mosbacher *et al.*, 2005). Das Substratspektrum der BAL umfasst unterschiedlich substituierte aromatische und aliphatische Aldehyde. Dabei fungiert in dem Reaktionsmechanismus ein Aldehydmolekül als Elektronendonor, das andere als -akzeptor (Dünkelmann *et al.*, 2002). Die Reaktion selbst

findet wahrscheinlich in Analogie zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen (Iding *et al.*, 2000; Kluger, 1987; Reynolds *et al.*, 1988) direkt am Cofaktor ThDP statt (Demir *et al.*, 2001b). Der Reaktionsmechanismus, den das Holoenzym beschreibt, ist am Beispiel der Benzoinsynthese in Abbildung 1.4 dargestellt.

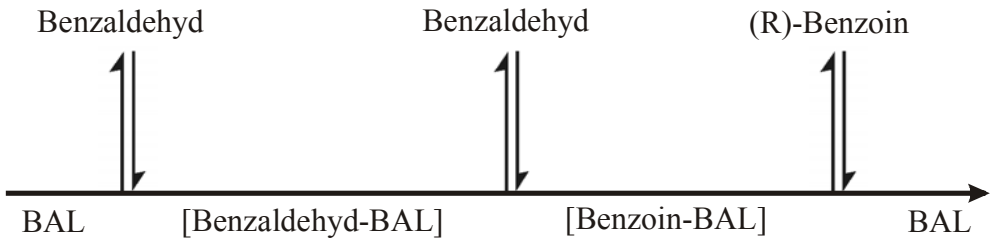


Abbildung 1.5: Reaktionsmechanismus der BAL-katalysierten Carboligation von Benzaldehyd.

Um den Reaktionsverlauf der BAL-katalysierten Carboligation vorherzusagen, ist ein mathematisches Modell notwendig, das die Kinetik dieses Enzyms unter Prozessbedingungen beschreibt. Nach Vasic-Racki *et al*. trägt ein solches Modell dazu bei, den Prozess zu verstehen und optimale Prozessbedingungen zu identifizieren (2003). Für die Reaktion der BAL wurden bisher zwei unterschiedliche Modelle vorgeschlagen. In beiden Studien stellte die Benzoinsynthese eine Teilreaktion des untersuchten Reaktionssystems dar. Um deren Gleichungen miteinander zu vergleichen, wird deshalb diese Teilreaktion isoliert betrachtet. Stillger *et al.* beschrieben die Kinetik mit dem Folgenden Modell (2006):

$$v = \frac{dP}{dt} = v_f - v_r = \frac{V_{\max.A} \cdot A}{K_{mA} + A} - \frac{V_{\max,P} \cdot P}{K_{mP} + P} \qquad (1.2)$$

wobei v_f die Reaktionsrate der Carboligation und v_r die der Carbolyse bezeichnet. A bzw. P sind die molaren Konzentrationen und K_{mA} bzw. K_{mP} die Bindungskonstanten von Benzaldehyd bzw. Benzoin. $V_{max,A}$ bzw. $V_{max,P}$ bezeichnet die Maximalgeschwindigkeit der Carboligation bzw. Carbolyse. Die gleiche Reaktion wurde von Hildebrand *et al*. (2007) durch eine Funktion beschrieben, die sich von der vorherigen im ersten Summanden unterscheidet:

$$v = \frac{dP}{dt} = v_f - v_r = \frac{V_{\max.A} \cdot A^2}{(K_{mA} + A)^2} - \frac{V_{\max,P} \cdot P}{K_{mP} + P} \qquad (1.3)$$

Um geeignete Reaktionsbedingungen zu identifizieren, wurde die BAL charakterisiert (Domínguez de María *et al.*, 2006; Janzen *et al.*, 2006; Stillger *et al.*, 2006). Dabei wurde der Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Aktivität und Stabilität untersucht. Die

höchste Aktivität weist die BAL bei pH 9 (Stillger *et al.*, 2006) - 9,5 (Domínguez de María *et al.*, 2006) auf. Ihre Stabilität ist jedoch im neutralen Milieu höher. Deshalb wurde als Betriebspunkt ein Kompromiss von pH 8,0 gewählt (Hildebrand *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006). Die Prozesstemperatur betrug typischerweise 20 - 30°C, da die Enzymstabilität in diesem Temperaturbereich akzeptabel war (Janzen *et al.*, 2006).

Da die Substrate und Produkte der BAL-katalysierten Carboligation stark hydrophob sind, wurde versucht, die Löslichkeit durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln zu erhöhen. Hier kristallisierte sich DMSO als geeignetes Lösungsmittel heraus, das vollständig mit Wasser mischbar ist. Es stellte sich weiterhin heraus, dass neben der Löslichkeit auch das Enzymverhalten beeinflusst wurde. Während Domínguez de María *et al*. (2006) eine Zunahme der Aktivität durch 20 - 30 % (v/v) DMSO beobachteten, berichtete Janzen (2002) eine Abnahme um fast 90 %. Stabilitätsmessungen deuteten darauf hin, dass gleichzeitig die Stabilität im Vergleich zu reinem Puffer erhöht war (Domínguez de María *et al.*, 2006; Janzen, 2002). Dies bestärkte die meisten Forscher 20 - 40 % (v/v) DMSO einzusetzen (z.B. Demir *et al.*, 2003; Demir *et al.*, 2002; Hischer *et al.*, 2005; Janzen *et al.*, 2006; Stillger *et al.*, 2006). Um Löslichkeitsprobleme zu überwinden, wurden auch wässrig-organische Zweiphasensystemen untersucht, in denen die BAL eingesetzt wurde. Sehr gute Enzymstabilitäten wurden in Anwesenheit von *tert*-Methylbutylether und Diisopropylether gefunden. Weitere Synthesereaktionen demonstrierten die Eignung dieser Zweiphasensysteme für die BAL (Stillger, 2004). Als weiteres Lösungsmittel wurde Hexan eingesetzt. Dadurch konnten eine Reihe von neuartigen 2-Hydroxyketonen in guter Produktivität und hoher Enantioselektivität synthetisiert werden (Hischer *et al.*, 2005).

1.5 Theoretische Grundlagen

1.5.1 Reaktionstechnik

Die Reaktionstechnik ist eines der bedeutendsten Werkzeuge, um Reaktionen gezielt zu optimieren. Deren Kernaufgabe ist die Auslegung von Reaktoren mit dem Ziel optimaler Produktionsergebnisse (z.B. maximale RZA, minimale Kosten), wobei in der Enzymtechnik die RZA als geeignete Zielfunktion empfohlen wird (Illanes *et al.*, 2000). Um dieses Ziel zu erreichen, müssen eine Reihe von verschiedenen Faktoren (Freiheitsgrade) aufeinander abgestimmt werden, wie z.B. die Betriebsbedingungen, die Betriebsweise und die Reaktorgeometrie. Dabei können die Einflussfaktoren im Wesentlichen in drei Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 1.6): Enzymspezifische, reaktionsspezifische und verfahrenstechnische Faktoren.

Um die geeigneten Einstellungen zu identifizieren, werden verschiedene Methoden angewandt. Diese beruhen entweder auf empirischen, statistischen oder modellgestützten Grundlagen.

Die rein empirische experimentelle Analyse ist zweifelsohne die am häufigsten angewandte Art, eine Reaktion zu optimieren. Beispiele finden sich unter anderem in der Veröffentlichung von Splechtna *et al.* (2007), die die Synthese von Galacto-Oligosacchariden unter Variation der Temperatur im Hinblick auf eine technische Anwendung optimierten. Fernandez-Lafuente *et al.* (1991) optimierten die enzymatische Produktion von Penicillin G, indem sie die Produktausbeute bei verschiedenen pH-Werten, Temperaturen und unterschiedlichen Cosolventien, wie DMSO oder DMF, bestimmten. Andere untersuchten die optimale Cosolvenskonzentration (Methanol), um die Ausbeute von Cefalexin, einem halbsynthetischem Antibiotikum, zu maximieren (Travascio *et al.*, 2002).

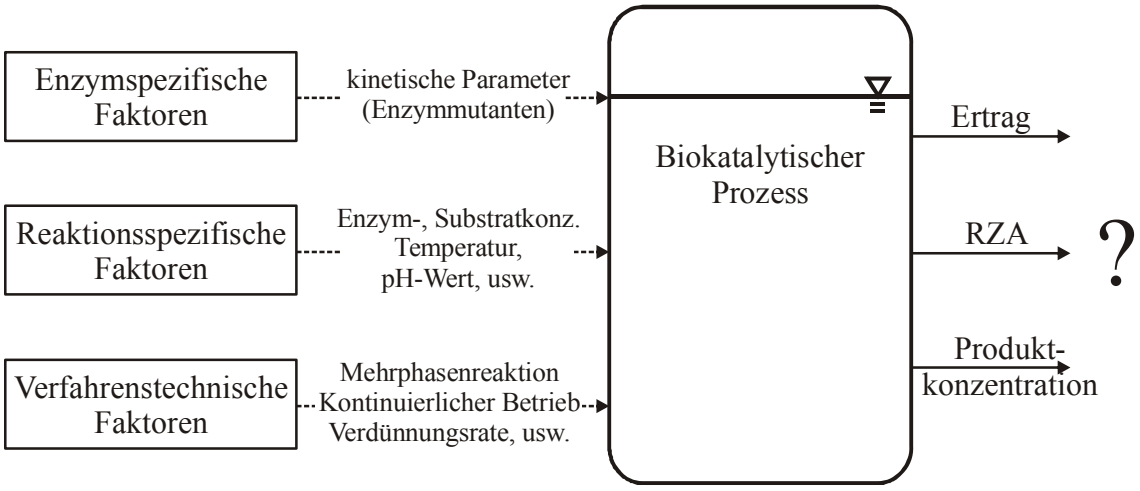


Abbildung 1.6: Freiheitsgrade einer Prozessoptimierung.

Die statistische Versuchsplanung und Auswertung vermag die Anzahl der Experimente auf der Suche nach den optimalen Betriebsbedingungen zu reduzieren. In der Enzymkatalyse scheint diese Methodik zunehmend an Bedeutung zu gewinnen, was daran zu erkennen ist, dass sie in immer mehr Publikationen angewandt wird. Vor allem die *Response surface methodology* wurde oft benutzt, um Optimierungsprobleme zu lösen (Ceylan *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008). Diese Methode wurde von Box und Wilson (1951) eingeführt und zählt - streng genommen - zu den empirischen Lösungsansätzen. Meist wurden Temperatur, pH-Wert, Enzymkonzentration und Reaktionsdauer multivariat entsprechend einer statistischen Versuchsplanung alterniert. Das Produktergebnis jedes Experiments wurde bestimmt und nach statistischen Kriterien die optimalen Reaktionsbedingungen für die maximale Produktausbeute ermittelt. Attraktiv ist diese Methode, da sie kein Vorwissen über die Biologie voraussetzt.

Die Optimierung eines modellbasierten Reaktionssystems kann als eine sehr leistungsfähige Möglichkeit betrachtet werden, um auf Basis physikalischer Zusammenhänge die Produktausbeute zu verbessern (Marin-Sanguino *et al.*, 2007). In Kombination mit statistischen Methoden, ergänzt die Modellierung empirische Vorgehensweisen und beschleunigt und vereinfacht die Prozessentwicklung. Zusätzlich eröffnet ein Modell Zugang zu einem besseren Prozessverständnis. Auf industrieller Ebene wendet Lonza routinemäßig die modellgestützte Prozesskontrolle an und entwickelte beispielsweise so ihren Industrieprozess zur Herstellung von 3000 Tonnen Nikotinamid pro Jahr (Brass *et al.*, 1997). Zusammengefasst sind die verschiedenen Identifikationsstrategien in Abbildung 1.7.

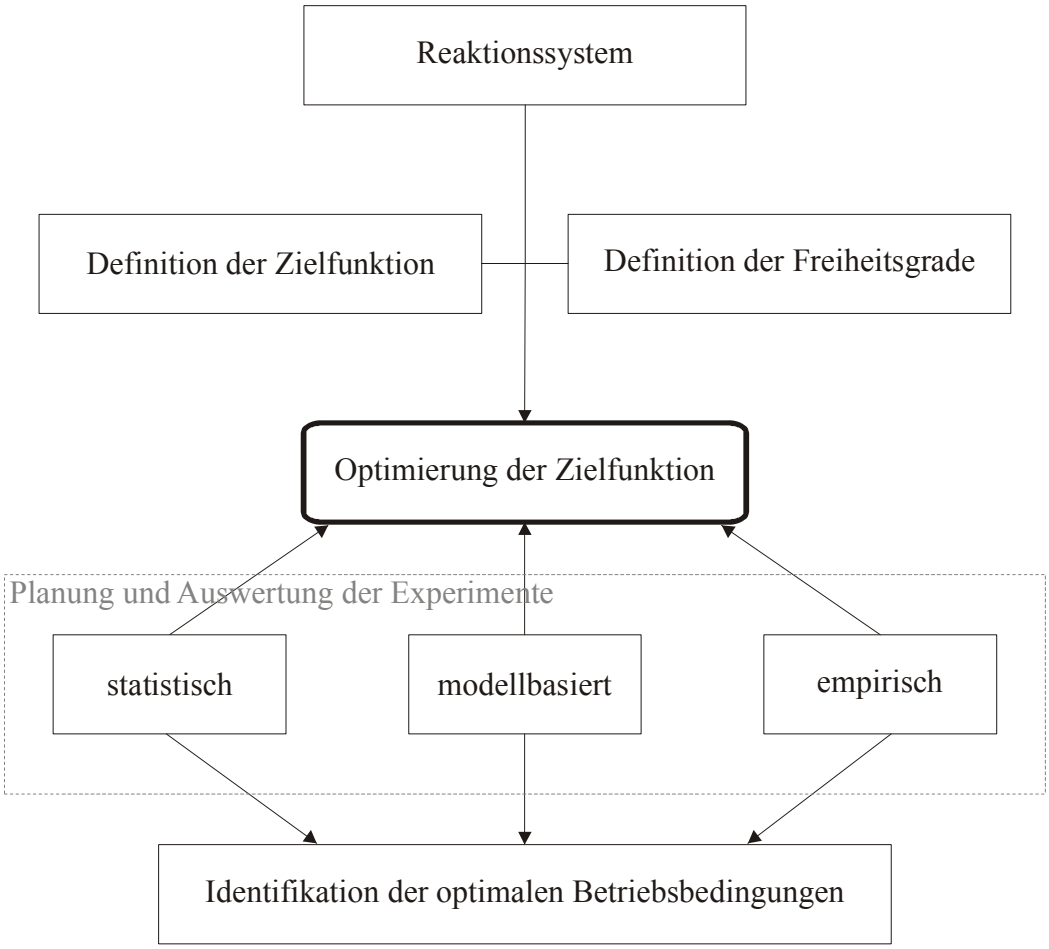


Abbildung 1.7: Zentrales Ziel und mögliche Identifikationsstrategien der chemischen Reaktionstechnik.

1.5.2 Grundzüge der Modellierung

Während die beiden datengetriebenen Methoden das Ergebnis mehr oder weniger direkt ausgeben, ist die modellbasierte Möglichkeit wesentlich aufwändiger. Sie lässt sich

unterteilen in experimentelle Analyse, Modellierung und Optimierung. Zur Lösung der vorgestellten Aufgaben erfordert die Reaktionstechnik grundlegende Kenntnisse über die im Reaktor ablaufenden kinetischen und thermodynamischen Vorgänge. Im Wesentlichen müssen drei Fragen beantwortet werden (Biselli *et al.*, 2002):

(1) Welches sind die besten Reaktionsbedingungen im Hinblick auf Aktivität, Stabilität, Selektivität und thermodynamisches Gleichgewicht?

(2) Wie ist die Enzymkinetik unter den optimalen Reaktionsbedingungen?

(3) Wie wirkt sich die Reaktordynamik (z.B. kontinuierlicher, diskontinuierlicher Prozess) auf den Gesamtumsatz aus?

Um die drei Fragestellungen zu beantworten, sind zum einen geeignete Experimente nötig, zum anderen müssen diese Experimente beurteilt werden. Der wichtigste Schritt für die industrielle Anwendung schließt damit ab, die optimalen Reaktionsbedingungen zu identifizieren. Wenngleich diese Vorgehensweise hier als logische Abfolge aufgezeigt wurde, findet sich in der Literatur diese systematische Vorgehensweise nur selten.

1.5.2.1 Beschreibung der Reaktionskinetik

Der Kern einer rationalen Prozessauslegung sind die Modellierung und Analyse der Synthesegeschwindigkeit. Dazu wird ein kinetisches Modell benötigt, das die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzym, Substrat- und Produktkonzentrationen beschreibt.

In der technischen Biokatalyse sind formalkinetische Modelle beliebt, da sie keine Kenntnisse über den Mechanismus voraussetzen und die Reaktionen praktisch über einen weiten Konzentrationsbereich auf einfache Weise beschrieben werden können. Außerdem haben alle kinetischen Modellparameter eine graphische Bedeutung, die die Konzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit angibt. Diese Modelle begründen sich auf die Arbeiten von Michaelis & Menten (1913) und Briggs & Haldane (1925).

Nach der Theorie von Michaelis & Menten (1913) bildet sich aus Enzym (*E*) und Substrat (*A*) in einer schnellen reversiblen Reaktion ein Enzym-Substrat-Komplex (*EA*) aus. *EA* geht augenblicklich in ein Enzym-Produkt-Komplex (*EP*) über und dissoziiert anschließend in einem vergleichsweise langsamen Schritt in das Produkt (*P*) und *E*. Da dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, befinden sich *A* und *EA* (bzw. *EP*) ständig im Gleichgewicht (*rapid equilibrium assumption)*. Briggs & Haldane (1925) hingegen stützten sich auf die Annahme, dass *EA* sich zu Beginn der Reaktion anhäuft. Nach sehr kurzer Zeit bleibt jedoch die Konzentration konstant und es stellt sich ein Fließgleichgewicht ein (*steady state assumption*). Die Dauer der *steady-state*-Phase verlängert sich, wenn die Substratkonzentration viel größer als die Enzymkonzentration ist. Der Unterschied sollte

wenigstens einen Faktor von 100 betragen (Taylor, 2002). Die unterschiedlichen Annahmen führen zwar formal zu der gleichen Kinetik, die Definition der Michaelis-Konstante unterscheidet sich jedoch. Im ersten Fall ist es eine Dissoziationskonstante (K_i), im zweiten Fall - wie hier gezeigt - eine Bindungskonstante (K_m):

$$v_{irrev} = \frac{k_{cat} \cdot E \cdot A}{K_{mA} + A} \tag{1.4}$$

wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit, k_{cat} die Wechselzahl, E die molare Enzymkonzentration, A die molare Substratkonzentration und K_{mA} die Bindungskonstante von A bezeichnen. Obwohl in der Literatur beide Annahmen angewandt werden, spiegelt die Briggs-Haldane-Beziehung die Realität besser wieder (Biselli *et al.*, 2002). Die Michaelis-Menten-Bedingung ($K_m = K_i$) ist in den meisten Enzymreaktionen nicht erfüllt (Frey und Hegeman, 2007).

Wenn mehr als ein Substrat an einer Enzymreaktion teilnimmt, spricht man von Mehrsubstratreaktionen. Mehrsubstratreaktionen werden häufig formalkinetisch beschrieben, indem Gleichung (1.4) für jedes Substrat separat aufgestellt wird und die so ermittelten Gleichungen multiplikativ miteinander verknüpft werden (Biselli *et al.*, 2002):

$$v_{irrev} = \frac{k_{cat} \cdot E \cdot A \cdot B}{(K_{mA} + A) \cdot (K_{mB} + B)} \tag{1.5}$$

wobei B die molare Konzentration eines zweiten Substrates und K_{mB} die Bindungskonstante von B ist.

Reversible Reaktionen enthalten zwei Teilreaktionen. Diese Teilreaktionen berücksichtigen getrennt Hin- und Rückreaktion:

$$v_{rev} = v_f - v_r \tag{1.6}$$

wobei v_f die Reaktionsrate der Hin- und v_r die der Rückreaktion darstellt. v_{rev} bezeichnet die resultierende Reaktionsgeschwindigkeit.

Während formalkinetische Modelle sehr einfach zu bilden sind, ist es ungleich aufwändiger, ein mechanistisches Modell zu entwickeln. Deshalb wird im Folgenden nur grob auf die einzelnen Schritte eingegangen. Eine ausführliche Beschreibung findet sich beispielsweise in den enzymkinetischen Büchern von Bisswanger (2008) und Segel (1975).

Das mechanistische Modell berücksichtigt Molekularität und Bindungsfolge (=Mechanismus) in geeigneter Weise. Da es schwierig ist, den Mechanismus aus kinetischen Messungen zu bestimmen, können diese Informationen durch Inhibitionsanalysen, Isotopenaustausch oder *Pre-steady-state* Analysen (Marangoni, 2003) gewonnen werden. Die Molekularität gibt die

Anzahl der Substrate bzw. Produkte einer Enzymreaktion an. Substrate und Produkte werden getrennt berücksichtigt. Gezählt wird *Uni*, *Bi*, *Tert*, usw. Die BAL-katalysierte Carboligation besteht aus 2 Substraten und 1 Produkt, der Mechanismus deshalb *Bi-Uni* genannt. Die Bindungsfolge gibt Auskunft über die genaue Reihenfolge, mit der Substrate binden und Produkte abdissoziieren. Unterschieden wird in Ping-Pong- und sequentielle Mechanismen. In einer Ping-Pong-Reaktion muss mindestens 1 Produkt abdissoziieren, bevor das letzte Substrat reagieren kann. Sequentielle Reaktionen können geordnet (*ordered*) oder zufällig (*random*) ablaufen. Die FDH-katalysierte Cofaktorregeneration ist ein Beispiel für einen *ordered Bi-Bi* Mechanismus, da zuerst NAD^+ und dann Formiat bindet und CO_2 vor NADH freigesetzt wird.

Mechanistisch begründen sich enzymkinetische Modelle auf Elementarreaktionen. Verschiedene Möglichkeiten stehen zur Verfügung, um das mathematische Modell aus den Elementarreaktionen zu entwickeln. Die Geschwindigkeitsgleichungen aller Elementar-reaktionen können unter der Fließgleichgewichtsannahme durch das Determinantenverfahren gelöst werden. Um kinetische Modelle für komplizierte Reaktionen zu berechnen, ist diese Methode sehr aufwändig. King und Altman (1956) und Cha (1968) erleichterten durch ihre Arbeiten die Entwicklung kinetischer Modelle selbst für komplizierte Mehrsubstrat-mechanismen. Ihre Matrix-algebraische Methoden errangen bisweilen einen festen Platz in der Enzymkinetik. Die methodischen Ansätze werden hier nicht näher erläutert. Die Vorgehensweise ist ausführlich in den erwähnten Veröffentlichungen beschrieben und wurde außerdem von Cleland (1963) geschildert.

Gleichgültig, ob es sich um ein formalkinetisches oder mechanistisches Modell handelt, müssen die kinetischen Parameter in der jeweiligen Gleichung durch gezielte Experimente bestimmt werden. Reaktionsanfangsraten vermögen einzelne Effekte zu isolieren, sind einfach auszuführen und auszuwerten. Allerdings steht den Vorteilen ein großer Messaufwand gegenüber. Dieser Nachteil kann durch Auswertung gesamter Reaktionsverläufe überwunden werden. Indem das kinetische Modell an die Kurvenverläufe angepasst wird, können die kinetischen Parameter aus einer einzigen Verlaufskurve erhalten werden (Duggleby, 2001). Diese Methode scheint prinzipiell vorteilhaft zu sein, jedoch erschwert die Komplexität vieler Reaktionssysteme die weitere Analyse: Enzyminaktivierung, Nebenreaktionen und Inhibitionen dürfen im Gegensatz zur Modellbildung auf Basis von Reaktionsanfangsraten nicht vernachlässigt werden. Diese Tatsache führte dazu, dass Reaktionsanfangsraten weiterhin favorisiert werden (Frey und Hegeman, 2007). Leider unterbleibt meist eine Beurteilung des so erhaltenen Modells an Verlaufskurven, die für technische Anwendungen relevant sind. Aufgrund der fehlenden Kontrolle formalkinetischer Modelle stellt sich die Frage, ob diese für industrielle Prozesse geeignet sind oder aber Modelle zu bevorzugen sind, die den Reaktionsmechanismus physikalisch eindeutig beschreiben (mechanistische Modelle).

1.5.2.2 Beschreibung thermodynamischer Einflüsse

Neben einem kinetischen Modell, muss der Einfluss der Umgebungsbedingungen auf den Reaktionsverlauf bekannt sein. Um diesen Einfluss zu beschreiben, wurden Zusammenhänge aus der physikalischen Chemie auf enzymkinetische Problemstellungen übertragen.

So wird der Zusammenhang von der Temperatur und Reaktionsgeschwindigkeit quantitativ meist durch die Arrheniusgleichung (Arrhenius, 1889) beschrieben. Theoretisch steigt die Reaktionsrate mit zunehmender Temperatur immer weiter an, praktisch sinkt die Enzymaktivität ab einer gewissen Temperatur jedoch bis auf Null. Diese Abnahme resultiert aus der begrenzten Stabilität des Biokatalysators. Als Konsequenz existiert ein Temperaturmaximum, das jedoch nicht das Temperaturoptimum darstellt (Bisswanger, 2008). Außerdem ist bekannt, dass das thermodynamische Gleichgewicht temperaturabhängig ist. Um diese Abhängigkeit zu modellieren, wird meist die Van't Hoff-Gleichung verwendet.

Weniger häufig wird der Einfluss des pH-Werts im Rahmen einer reaktionstechnischen Optimierung untersucht. Der Einfluss des pH-Werts auf die Reaktionsgeschwindigkeit wird der Ladungsänderung von ionischen Seitengruppen (-NH_2, -COOH, -OH, -SH) zugeschrieben. Sie liegen bei verschiedenen pH-Werten protoniert oder deprotoniert vor (Bisswanger, 2008; Marangoni, 2003). Liegt eine katalytische und/oder regulatorische Aminosäure beispielsweise protoniert vor, dann ist das Enzym inaktiv. In diesem Fall tragen nur die Enzyme zur Gesamtaktivität bei, deren Säure-Base-Gruppe ungeladen ist. Histidin im aktiven Zentrum von α-Chymotrypsin muss beispielsweise deprotoniert sein (Buchholz *et al.*, 2005). Der Ionisationszustand einer Seitengruppe wird durch die Ionisationskonstante *pKs* beschrieben. Ein Modell, das die Ionisationskonstante mit enzymatischer Aktivität korreliert, wurde auf dieser Annahme entwickelt und in vielen Veröffentlichungen verwendet (z.B. Nemeria *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 1993). Die so identifizierten pKs-Werte mögen andeuten, welche funktionellen Gruppen im Reaktionsmechanismus des Enzyms beteiligt sind. Möglich ist dies beispielsweise bei Aspartat (*pKs* = 3,86), Histidin (6,09), Cystein (8,3), Serin (9,15), Tyrosin (10,11) und Arginin (12,28). Jedoch können sich die Werte nach Integration der Aminosäure in die Proteinstruktur um mehrere Einheiten verschieben und eine Interpretation erschweren (Bisswanger, 2008; Marangoni, 2003).

Vergleichsweise wenig wird die Ionenstärke in enzymkinetischen Untersuchungen berücksichtigt (Dale und White, 1983), obwohl bekannt ist, dass die Ionenstärke die Aktivität von Enzymen beeinflusst (Bisswanger, 2008; Kula, 2002; Muller und Garel, 1984). Im Allgemeinen erniedrigen hohe Ionenstärken die Aktivitätskoeffizienten von Ionen. Berechenbar ist dieser Einfluss durch die Debye-Hückel-Gleichung. Als komplexe Polyelektrolyte befinden sich häufig ionische Seitenketten im aktiven Zentrum von Enzymen. Einige dieser Seitenketten bestimmen die Enzymaktivität. So wurde berichtet, dass die Dissoziationskonstante katalytischer Säure-Base-Seitenketten eines Enzyms durch Ladungsinteraktionen beeinflusst wurde (Oliveberg *et al.*, 1995). Dale und White nahmen

deshalb an, dass die Debye-Hückel Gleichung auch auf die Enzymkatalyse übertragen werden kann (1983).

1.6 Problematik einer rationaler Prozessauslegung in der Biokatalyse

Wie beschrieben wurde, erfordert die rationale Auslegung eines industriellen Prozesses geeignete enzymkinetische Modelle, um die Reaktion zu beschreiben und zu optimieren. Im Fall einer gekoppelten Reaktion - wie der Reduktion mit simultaner Cofaktorregeneration - kann ein schlecht gewähltes Teilmodell zu ungenügender Modellvorhersage des Gesamtsystems führen. Die Kinetik der FDH aus *Candida boidinii* wurde in technischen Anwendungen ausschließlich durch ein formalkinetisches Modell vorhergesagt, das Kula *et al.* (1980) vorschlugen. Obwohl das Modell erfolgreich an Reaktionsanfangsraten angepasst werden konnte, blieb bisher eine systematische Beurteilung an gesamten Reaktionsverläufen aus. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob das kinetische Modell der FDH geeignet ist, um in technischen Anwendungen hohe Umsätze vorherzusagen.

In Abbildung 1.4 ist zu erkennen, dass die Substrate der BAL-katalysierten Carboligation chemisch identisch sind. Deshalb können die einzelnen Substratbindungskonstanten nicht auf dem klassischen Weg ermittelt werden, indem die Konzentration des ersten Substrates variiert wird, während die Konzentration des zweiten Substrates konstant bleibt und umgekehrt. Bisher wurden verschiedene Bindungskonstanten für das Donor- und das Akzeptormolekül ignoriert und stattdessen vereinfachend angenommen, dass eine einzige Bindungskonstante für beide Substrate vorliegt (Hildebrand *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006). Weiterhin unterscheiden sich die beiden veröffentlichten Modelle dadurch, dass Hildebrand *et al*. (2007) eine Doppel-Michaelis-Menten-Kinetik und Stillger *et al*. (2006) eine einfache Einsubstratkinetik für die Carboligation annahmen, und es ist nicht bekannt, welches Modell sich besser eignet. Zudem wurde auch hier die Validität der diversen Vereinfachungen nicht systematisch untersucht. Wie mit der bimolekularen Reaktion mit identischen Substraten physikalisch sinnvoll umgegangen werden sollte, stellt eine Herausforderung dar, die bisher ungelöst ist.

Außerdem wurde beschrieben, dass die Wahl der geeigneten Reaktionsbedingungen für organische Synthesen sich auf die entsprechenden experimentellen Erfahrungen begründete. In diesem Zusammenhang wurde angerissen, dass verschiedene Beobachtungen der Enzymaktivität in DMSO beschrieben wurden. Solche Diskrepanzen konnten ebenso bezüglich der veröffentlichten pH-Optima vorgefunden werden. Der Unterschied betrug bis zu drei pH-Einheiten (vgl. Domínguez de María *et al.*, 2006; Janzen *et al.*, 2006; Nemeria *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006). Auch die Tatsache, dass bisher die Auswirkung der

Ionenstärke auf die BAL gänzlich unbekannt ist, stellt die Eignung dieser Reaktionsbedingungen für organische Synthesen in Frage und motiviert, an grundlegender Stelle nochmals anzusetzen.

Wird ein Zweiphasensystem angewendet, so sollte für eine rationale Beurteilung der im Reaktor ablaufenden Phänomene die Enzymkinetik, das Verteilungsgleichgewicht sowie der Stofftransport bekannt sein (Biselli *et al.*, 2002). Da die Enzymkinetik in homogener Phase nicht zwangsläufig in wässrig-organischen Zweiphasensystemen gültig sein muss (Halling, 1994; Klibanov, 1997), wäre es vorteilhaft, die intrinsische Enzymkinetik direkt im Zweiphasensystem zu bestimmen. Dies ist bisher nicht geschehen. Auch der Stofftransport wurde bisher in keiner Arbeit berücksichtigt.

Obwohl die Problematik auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modellreaktionen bezogen wurde, gilt sie keineswegs ausschließlich für diese Fälle. Vielmehr findet sich in der gesamten Biokatalyse die Anwendung formalkinetischer Modelle. Dabei wird deren Gültigkeit nur selten in Frage gestellt. Ferner werden im Allgemeinen optimale Reaktionsbedingungen empirisch identifiziert, obwohl anhand verschiedener Enzymreaktionen gezeigt wurde, dass die optimale Temperatur und der optimale pH-Wert abhängig von der Reaktionsdauer sind (Ho und Humphrey, 1970). Darüber hinaus wurde berichtet, dass das Temperaturoptimum vom Reaktorvolumen und der Enzymkonzentration beeinflusst wird (Illanes *et al.*, 2000; Willeman *et al.*, 2002). Leider blieb eine Erklärung in den meisten Fällen aus. Nichtsdestotrotz ergeben sich unter diesen Umständen ein großer Nachteil für die empirischen Lösungsansätze: Wird nachträglich beispielsweise das Reaktorvolumen erhöht, um im Produktionsmaßstab größere Mengen umzusetzen, so ändern sich die optimalen Reaktionsbedingungen. Während ein Modell diese Änderung mathematisch bestimmen könnte, muss das Optimum durch Experimente zeit- und kostenaufwändig neu identifiziert werden, wenn kein Modell vorliegt.

Basierend auf den theoretischen Grundlagen, befassten sich die meisten Arbeiten mit grundlegenden Aspekten, wie der Anwendbarkeit der physikalischen Gleichungen an Reaktionsanfangsraten oder mechanistischen Schlussfolgerungen, die aus der Anpassung an experimentelle Daten gezogen werden konnten. Eine reaktionstechnische Anwendung blieb bisher im Hintergrund. Ob die empfohlenen Gleichungen sich auch für die Vorhersage gesamter Reaktionsverläufe eigneten, ist daher unbekannt. Obwohl die Autoren einiger Arbeiten in begrenztem Umfang mit ähnlichen Fragestellungen konfrontiert waren, brachte eine Literatursuche keine geeignete Vorgehensweise hervor, die die Übertragbarkeit auf allgemeine Reaktionen gewährleistete. Ein allgemeiner Fall sollte sich durch folgende Eigenschaften auszeichnen: (1) Es handelt sich um eine reversible Mehrsubstratreaktion. (2) Diese Reaktion wird mit einem mechanistischen enzymkinetischen Modell beschrieben. (3) Dabei wird die Prozessstabilität berücksichtigt und (4) der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf alle kinetischen Parameter identifiziert sowie, wenn nötig, modelliert. Um den Einfluss

auf Aktivität und Stabilität zu untersuchen kommen in der Regel herkömmliche Methoden wie Messungen der Reaktionsanfangsrate und Restaktivitätsbestimmungen zur Anwendung. Vor allem Restaktivitätsbestimmungen nach der Inkubation in Substrat- und Produkt-freier Lösung können die Stabilität unter Reaktionsbedingungen nicht erfassen. Problematisch kann auch die Anwendung von Reaktionsanfangsraten als Grundlage für die Vorhersage von gesamten Reaktionsverläufen sein. Als Konsequenz mag bei vielen Prozessen weiteres Optimierungspotential vorliegen.

1.7 Zielsetzung

Wie beschrieben wurde, beruhen technische sowie wissenschaftliche Untersuchungen enzymkatalysierter Reaktionen häufig auf empirischen Grundlagen und werden intuitiv betrieben. Die Allgemeingültigkeit solcher Ergebnisse wird nur in wenigen Fällen in Frage gestellt. Den daraus resultierenden Konsequenzen ist man sich selten bewusst. Deshalb wird in dieser Arbeit eine systematische Methodik entwickelt, um Enzymreaktionen rational auszulegen mit dem Ziel einer späteren Prozessoptimierung. Die erörterten Probleme sollen dabei überwunden werden, indem Entscheidungen und Schlussfolgerungen ausnahmslos auf mathematischen Grundlagen getroffen werden. Gleichzeitig sollen neben technisch relevanten Aspekten auch biochemische Gesichtspunkte erörtert werden, die für weitere biologische Arbeiten von hoher Bedeutung sind. Zwei technisch interessante Modellreaktionen werden dabei exemplarisch untersucht:

Es wird die bereits umfassend charakterisierte FDH aus *Candida Boidinii* behandelt. Für dieses Enzym soll nur die Reaktionskinetik untersucht werden, da dieses das Herzstück der Reaktionsoptimierung ist. Deshalb soll ein mechanistisches Modell entwickelt werden, das mit dem Literaturmodell verglichen wird. In diesem Zusammenhang soll untersucht werden, ob das Literaturmodell für die technische Anwendung geeignet ist. Da die FDH im technischen Gebrauch an ein anderes Enzym gekoppelt ist, resultieren die optimalen Reaktionsbedingungen aus dem Kompromiss beider Reaktionen, weswegen diese Punkte nicht adressiert werden sollen.

Den Hauptteil dieser Arbeit soll die Untersuchung der BAL einnehmen, da dieses Enzym bisher nur wenig beschrieben wurde. Hier sollen alle beschriebenen Aspekte in geeigneter Weise aufgegriffen werden: Es soll anhand geeigneter Experimente ein kinetisches Modell entwickelt werden, das den Reaktionsverlauf der Carboligation beschreibt. Anschließend soll die Enzymreaktion bei verschiedenen Bedingungen untersucht und mathematisch beschrieben werden. Nicht nur Aktivität und Stabilität sollen berücksichtigt werden, sondern alle kinetischen Parameter sollen bestimmt werden, die sich im untersuchten Messbereich auf den

Reaktionsverlauf auswirken. Neben der Temperatur, dem pH-Wert und der Cosolvenskonzentration soll insbesondere der Einfluss der Ionenstärke auf die Reaktion untersucht und modelliert werden, da er bisher völlig unbekannt ist.

Anschließend werden die Untersuchungen im wässrig-organischen Zweiphasensystem fortgeführt. Die Enzymkinetik soll überprüft und der Stofftransport analysiert werden. Gestützt werden die Analysen durch eine mathematische Modellierung. Zuletzt sollen kinetische und thermodynamische Modelle gekoppelt und die Auswirkungen der Reaktordynamik integriert werden. Ziel der experimentellen Analyse und mathematischen Modellierung ist die Entwicklung eines enzymkinetischen Modells, das die wichtigsten Einflussfaktoren berücksichtigt (Temperatur, pH, Ionenstärke, organisches Lösungsmittel) und die Möglichkeit bietet, in zukünftigen Arbeiten ein Kostenmodell anzubinden.

Um die Vorzüge der hier präsentierten Vorgehensweise zu bekräftigen, soll die Modellreaktion dann modellbasiert optimiert werden. Den Schwerpunkt soll hier die Frage nach den optimalen Reaktionsbedingungen bilden, sowie die rationale Erklärung der Beobachtungen. Abschließend sollen die daraus resultierenden Konsequenzen für technische Anwendungen diskutiert und die gewonnenen Erkenntnisse in den naturwissenschaftlichen Zusammenhang gestellt werden, wobei hier biochemische Themengebiete betont werden sollen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

3,5-Dimethoxybenzaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylformamid	Fluka (Neu-Ulm)
Dimethylsulfoxid	Fluka (Neu-Ulm)
L-Glutaminsäure	Fluka (Neu-Ulm)
L-Histidin	Fluka (Neu-Ulm)
IPTG	Fermentas (St. Leon-Rot)
MIBK	Fluka (Neu-Ulm)
NAD^+	Codexis (Jülich)
NADH	Codexis (Jülich)
ThDP	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der Regel von Fluka, Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle Chemikalien waren mindestens analysenrein. Nährmedienbestandteile stammten von Difco (Detroit, USA), Ohly (Hamburg), Roth oder Fermentas (St. Leon-Rot).

2.2 Geräte

Analysenwaage	SBC 32 (Scaltec Instruments, Göttingen)
Autotitrator	TitroLine alpha (Schott, Mainz)
Fermenter	Biostat B 1,7 L (B. Braun, Melsungen)
Fluoreszenzspektrometer	LS55 (Perkin Elmer, Waltheim, USA)
FPLC	LCC-501 (Pharmacia, Uppsala, S)
Glasreaktor	Eigene Entwicklung (Glasbläser, RWTH Aachen)
HPLC	System Gold (Beckmann Coulter, München)
Kryostat	Ministat cc2 (Huber, Offenburg)
Lyophilisationsanlage	J. H. Schrader (Friedland)
Magnetrührer	RCT classic (IKA, Staufen)
Membranpumpe	Liquiport NF100TT.185 (KNF, Freiburg)
pH-Elektrode	Digital-pH-Meter 646 (Knick, Berlin)
Rotationsverdampfer	Büchli (Zürich, CH)

SDS-PAGE	Xcell Sure Lock Electrophoresis Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
SFC	Analytical SFC (Jasco, Easton, USA)
Überkopfrührer	Eigene Fertigung (Mechanische Werkstatt, RWTH Aachen)
Präzisionswaage	UMT2 (Mettler-Toledo, Gießen)
Ultraschallgerät	Sonopuls HD 200 (Bandelin, Berlin)
UV-Vis-Spektrometer	Cary 50 (Varian, Palo Alto, USA)
UV-Vis-Spektrometer	SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnywale, USA)
Zentrifuge	Sorvall RC-5B (Du Pont de Nemours, Bad Homburg)

2.3 Analytik

2.3.1 HPLC-Analyse

DMBA und TMB aus der BAL-katalysierten Modellreaktion wurden zum quantitativen Nachweis mit Hilfe der HPLC analysiert. Die molaren Konzentrationen von DMBA und TMB wurden mit einer konventionellen Umkehrphasenchromatographie gemessen. Der Enantiomerenüberschuss (*ee*) von (R)-TMB wurde mit einer stereoselektiven Säule bestimmt. Um die Analysenzeiten konventioneller HPLC-Systeme zu verkürzen, wurde eine SFC (*supercritical fluid chromatography*) benutzt, die als mobile Phase überkritisches CO_2 verwendete. In Tabelle 2.1 sind die Betriebsparameter der benutzten HPLC-Analysen aufgelistet. Um die Reaktion zu verfolgen, wurde dem Ansatz nach verschiedenen Zeiten ein Aliquot von 100 µL entnommen. Die Enzymreaktion wurde unterdrückt, indem die Probe sofort mit 100 µL Acetonitril gemischt wurde. Anschließend wurde diese Lösung auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Nach der Trennung maß ein UV-Detektor die Absorption des Eluats. Die Retentionszeiten der Reaktanden wurden mittels reiner Standards bestimmt. Die Umrechnung in molare Konzentrationen erfolgte anhand einer zuvor erstellten Kalibrationsgeraden von Lösungen bekannter Konzentrationen.

Analog dazu wurde auch der Lösungsvermittler DMF bei 225 nm quantifiziert, um dessen Verteilung in den untersuchten wässrig-organischen Zweiphasensystemen zu bestimmen. Dazu wurden die Proben zunächst 1:20 verdünnt, damit die Signalstärke eine lineare Funktion der DMF-Konzentration ergab. Anschließend wurden von der Verdünnung 10 µL auf die Säule gegeben.

Tabelle 2.1: Trennbedingungen der chromatographischen Analyse von DMBA, TMB und DMF, sowie der chromatographischen Trennung der Enantiomere von TMB.

	DMBA	TMB	DMF	(R)-TMB	(S)-TMB
Säule	Nucleosil 100-5 C18			Chiralpak OD-H	
Druck [bar]	100			120	
Temperatur [°C]	40			40	
Mobile Phase	AcN:H_3PO_4			$scCO_2$:Isopropanol	
Fluss [$mL \cdot min^{-1}$]	0,7			3	
Zusammensetzung	1:1	1:1	7:3	5:1	
Wellenlänge [nm]	270	270	225	220	
Injektionsvolumen [µL]	20	20	10	50	
Retentionszeit [min]	10,4	12,1	4,8	4,4	6,0

2.3.2 Fluoreszenzspektrometrie

DMBA fluoresziert, wenn es mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt wird. Das Exitationsmaximum liegt bei 360 nm, während die größte Emission bei 470 nm gemessen wurde. Da die Messgröße (Intensität) abhängig von den Einstellungen des Spektrometers ist, wurden zunächst die für die spezifische Aufgabe günstigen Einstellungen bestimmt. Im Wesentlichen beinhaltet dieser Schritt die Verstärkung oder Abschwächung der Intensität, bis die Intensität bei der höchsten DMBA-Konzentration 1000 Einheiten nicht überschreitet. Die geeigneten Einstellungen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Anschließend wurden diese Bedingungen streng eingehalten.

Tabelle 2.2: Einstellungen für die fluoreszenzspektrometrische Messung.

Einstellung	Status	Einstellung	Status
Exitationswellenlänge	360 nm	Emissionswellenlänge	470 nm
Exitationsspaltbreite	15 nm	Emissionsspaltbreite	20 nm
Exitationskorrektur	Aus	Emissionskorrektur	Aus
Exitationsfilter	430 nm *cut-off*	Photomultiplier Spannung	850 V
Lumineszenz Modus	Fluoreszenz	Photomultiplier	Standard

Bei der Umrechnung der Intensität in Konzentrationen musste berücksichtigt werden, dass TMB die Signalstärke von DMBA unterdrückte. Diese Fluoreszenzlöschung war abhängig von den Konzentrationen an DMBA und TMB. Aus diesem Grund wurde eine 3-dimensionale Kalibrationsfunktion mit den Dimensionen Intensität *Int* und den molaren Konzentrationen von DMBA (*A*) und TMB (*P*) erstellt. Mathematisch wurde der Zusammenhang folgendermaßen angenähert:

$$Int = \begin{bmatrix} \left(Int_1 \cdot A^3 + Int_2 \cdot A^2 + Int_3 \cdot A\right) \cdot \left(1 - Int_4 \cdot P\right) + \\ Int_5 \cdot P^3 + Int_6 \cdot P^2 + Int_7 \cdot P + Int_8 \end{bmatrix} \cdot Int_9 + Int_0 \qquad (2.1)$$

wobei Int_1, Int_2, Int_3, Int_4, Int_5, Int_6, Int_7, Int_8 konstante Kalibrationskoeffizienten sind. Int_0 ist die Hintergrundfluoreszenz des Puffers in Abwesenheit aller Reaktanden. Bei Int_9 handelt es sich um einen Korrekturfaktor. Da die Fluoreszenzintensität durch Verschmutzung der Küvette oder der optischen Apparatur (Spiegel des Küvettenhalters) schwankte, wurde vor jeder Messung die Intensität eines Standards (2,5 mM DMBA in Referenzlösung) gemessen. Wich die Intensität gegenüber der zuvor ermittelten Intensität ab, bestimmte der Quotient den Korrekturfaktor für die folgende Messung. In Tabelle 2.3 sind die ermittelten Konstanten der Kalibrationsfunktion zur Umrechnung von Intensitäten in Konzentrationen gegeben. Da zu einer bestimmten Intensität verschiedene Kombinationen von DMBA und TMB gehören konnten, waren die Anfangskonzentrationen und die Massenbilanz für die eindeutige Zuordnung notwendig.

Tabelle 2.3: Kalibrationskoeffizienten für die Umrechnung des Fluoreszenzsignals in molare Konzentrationen von DMBA und TMB.

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Int_1 [mM^{-3}]	$1{,}891 \cdot 10^{-1}$	*Fortsetzung*	
Int_2 [mM^{-2}]	-5,895	Int_6 [mM^{-2}]	$-2{,}274 \cdot 10^{-1}$
Int_3 [mM^{-1}]	$6{,}928 \cdot 10^{1}$	Int_7 [mM^{-1}]	2,724
Int_4 [mM^{-1}]	$5{,}298 \cdot 10^{-2}$	Int_8 [-]	1,144
Int_5 [mM^{-3}]	$9{,}366 \cdot 10^{-3}$	Int_0 [-]	0,62

2.3.3 UV-Vis-Spektrometrie

Die FDH-katalysierte Modellreaktion wurde ausschließlich UV-spektrometrisch verfolgt. Dabei wurde die Absorption von NADH bei 340 nm gemessen, da weder NAD^+ noch Formiat oder CO_2 dort das Messsignal störten. Die Zunahme der Extinktion wurde mit einem UV/Vis-

Spektrometer (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnywale, USA) gemessen. Bei Verwendung einer 300 µL Mikroküvette mit einer Schichtdicke von 0,5 mm wurde eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion und bis zu 10 mM NADH vorgefunden werden. Diese Konzentration wurde in keinem Experiment überschritten. Die molare Konzentration von NADH wurde nach Lambert-Beer und einem molaren Extinktionskoeffizient von 6230 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ berechnet:

$$Ext = \sum_i \varepsilon_i \cdot c_i \cdot d \qquad (2.2)$$

wobei *Ext* die Extinktion, c_i die molare Konzentration von *i* und *d* der optische Weg durch die Lösung ist.

Im BAL-katalysierten Modellsystem wiesen DMBA und TMB jeweils ein Extinktionsmaximum bei 325 nm auf. Deshalb wurde die Extinktion bei dieser Wellenlänge gemessen. Der Extinktionskoeffizient ε_i von DMBA und TMB war abhängig von dem Medium, in dem der entsprechende Stoff *i* gelöst wurde. Aus diesem Grund wurden die Extinktionskoeffizienten experimentell bestimmt, indem die Stoffe in den verschiedenen Medien in jeweils 10 bekannten Konzentrationen gelöst wurden. Die Absorptionen der verschiedenen Konzentrationen wurden bei 325 nm gemessen und aus der Steigung der Extinktion über der Konzentration der Extinktionskoeffizient ermittelt. Die bestimmten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Für die Messungen wurde eine Durchflussküvette mit einer Schichtdicke von 0,5 mm benutzt. In dieser Küvette lag ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konznetration bis 25 mM DMBA bzw. 25 mM TMB vor.

Tabelle 2.4: Extinktionskoeffizienten von DMBA und TMB in Puffer, MIBK und Hexan bei 325 nm.

	Puffer	MIBK	Hexan
ε_{DMBA} $[mM^{-1}cm^{-1}]$	2,434	2,796	2,419
ε_{TMB} $[mM^{-1}cm^{-1}]$	2,260	2,540	2,585

2.4 Allgemeine Methoden

2.4.1 Bereitstellung der BAL

Die BAL wurde in dem rekombinanten Stamm *E. coli* SG13009 (pBAL-His6) exprimiert, aufgereinigt und lyophilisiert.

Im Einzelnen wurde zunächst der oben genannte Stamm fermentiert. Dazu wurden zunächst fünf Vorkulturen im 50 mL-Maßstab, die sich in 250 mL Schüttelkolben befanden, angesetzt und übernacht unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Inhalt der Vorkulturen in einen 5 L-Reaktor inokuliert. Das Medium setzte sich wie in Tabelle 2.5 gezeigt zusammen. Die Hauptfermentation wurde zunächst bei 37°C durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch 1 M Phosphorsäure bzw. 12,5 %-iges Ammoniumhydoxid ausgeglichen und konstant bei 7,0 geregelt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde auf einen Sättigungspartialdruck von 30 % eingestellt, indem die Rührerdrehzahl kaskadisch geregelt wurde. Der Verlauf der Fermentation wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Nachdem die optische Dichte einen Wert von 10 erreichte, wurde die Enzymexpression durch Zugabe von 0,8 mM IPTG induziert. Anschließend wurde die Temperatur auf 32°C erniedrigt, um die Bildung von Einschlusskörperchen zu verhindern. Die Fermentation wurde 5 h nach der Induktion abgebrochen. Anschließend wurde die Fermentationbrühe 20 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Tabelle 2.5: Medienzusammensetzung der Hauptfermentation zur Produktion der BAL.

Substanz	Konzentration [$g \cdot L^{-1}$]	Substanz	Konzentration [$g \cdot L^{-1}$]
Glycerin	40	NaCl	0,5
Hefeextrakt	40	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5
KH_2PO_4	3,1	Kanamycin	0,025
Na_2HPO_4	6,7	Ampicillin	0,100

Das Zellpellet wurde gelöst, mit 1 $mg \cdot mL^{-1}$ Lysozym 30 min lang behandelt und per Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde das lösliche Enzym vom Rohextrakt getrennt, indem die Suspension 30 min bei 10.000 g zentrifugiert wurde. Als Hexahistidin-Fusionsprotein wurde die BAL mit einer IMAC-Matrix (NTA Superflow) von Fremdproteinen getrennt. Für die chromatographische Trennung wurde das Standardprotokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwandt. Um die hohe Imidazolkonzentration aus den interessanten Fraktionen zu entfernen, wurde dann die Enzymlösung (ca. 40 mL) gegen 1 L

Puffer über einen Zeitraum von 24 h dialysiert. Die Ausschlussgröße des Dialyseschlauchs betrug 20 kDa. Als Puffer wurde 10 mM KPi, pH 7,0 benutzt, der während der Dialyse zweimal erneuert wurde. Um die BAL zu stabilisieren, wurden jeweils 0,25 mM ThDP und $MgSO_4$ hinzugegeben. Alle Schritte außer der Chromatographie wurden bei 4°C durchgeführt. Zuletzt wurde die erhaltene Lösung eingefroren (-20°C) und lyophilisiert. Das BAL Lyophilisat wurde bei -20°C gelagert. Die erfolgreiche Aufreinigung der BAL wurde nach der Aufreinigung mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Da keine anderen Banden als die der BAL auf dem Gel ausgeprägt waren, wurde angenommen, dass das Lyophilisat vollständig aus diesem Enzym bestand.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung und Lagerung der aktiven BAL

Um zu gewährleisten, dass bei kinetischen Untersuchungen eine bekannte Konzentration aktiver BAL eingesetzt wurde, wurde jede frisch angesetzte Enzymlösung auf deren Aktivität unter Referenzbedingungen getestet. Auf die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde verzichtet, da die Methode die Gesamtproteinkonzentration, d.h. auch Fremdprotein und inaktive BAL, erfasst. Deshalb wurde die molare Enzymkonzentration zunächst durch Wägung des Lyophilisats bestimmt. Die Einwaage (0,1 µg Präzision) wurde durch das Molekulargewicht (60 kDa) einer Untereinheit inklusive His-Tag (Janzen *et al.*, 2006) dividiert. Anschließend wurde die Aktivität bei Referenzbedingungen ermittelt. Dazu wurde die Einwaage in KPi-Puffer (100 mM Ionenstärke) gelöst. Um die BAL zu stabilisieren, wurde die Enzymlösung mit jeweils 0,25 mM $MgSO_4$ und ThDP versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Der Reaktionsverlauf wurde, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, bei einer Startkonzentration von 2,5 mM DMBA und 2,5 µg/mL BAL verfolgt. Wich die Reaktionsrate gegenüber der vorherigen Messung ab, wurde die aus der Wägung berechnete Enzymkonzentration der Stammlösung korrigiert. Nach 24 h wurde die Enzymlösung verworfen und neu angesetzt.

2.4.3 Synthese von TMB

Die enzymatische Carbolyse wurde durch Vorlage von enantiomerenreinem (R)-TMB untersucht. Da (R)-TMB kommerziell nicht erhältlich war, wurde es zuvor mit der BAL synthetisiert. Dazu wurden 10 mM DMBA unter Erhitzen auf 60°C in Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf 40°C abgekühlt. Jeweils 0,25 mM ThDP und $MgSO_4$ wurden hinzugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. Die Synthese wurde durch Zugabe von 0,01 µg/mL gestartet. Solange die Reaktion andauerte, entstand ein Niederschlag an wasserunlöslichem TMB. Alle 4 h wurde erneut 0,01 µg/mL BAL zum Ansatz gegeben. Nach etwa 48 h war der Niederschlag vollständig abgesetzt. Der Überstand wurde verworfen. Das Retentat wurde in Dichlormethan gelöst und über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet.

Nachdem Dichlormethan unter Vakuum verdampft wurde, blieb eine gelbe ölige Flüssigkeit zurück. Da es sich bei der enzymatischen Reaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelte (Zavrel *et al.*, 2008), wurden Verunreinigungen durch DMBA mit Hexan extrahiert. TMB war in Hexan unlöslich. Deshalb wurde der Überstand verworfen. In Diethylether wurde die ölige Flüssigkeit bei 25°C gelöst und bei 4°C auskristallisiert. Vom so entstandenen weißen Feststoff wurde ein NMR-Spektrum aufgenommen (^{13}C-NMR δ(500 MHz, $CDCl_3$): 55,33, 55,50, 100,46, 105,67, 106,29, 106,82, 135,11, 160,70, 198,40 ppm; ^{1}H-NMR δ(500 MHz, $CDCl_3$): 3,73 (6H, s, OMe), 3,76 (6H, s, OMe), 4,45 (1H, d, OH), 5,79 (1H, d, Ar(1)C-H), 6,36 (1H, t, Ar(2)4-H), 6,47 (2H, d, Ar(2)2-H und 6-H), 6,60 (1H, t, Ar(1)4-H), 7,05 (2H, d, Ar(1)2-H und 6-H) ppm). Der Struktur konnte TMB zugeordnet werden. Der Enantiomeren-überschuss von (R)-TMB wurde mit SFC-HPLC bestimmt (99,9 %). Verunreinigungen durch DMBA wurden durch HPLC-Analyse ausgeschlossen.

2.4.4 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von (R)-TMB

Der Enantiomerenüberschuss (*ee*) wurde bestimmt, indem dem Reaktionsansatz ein Aliquot von 1 mL entnommen wurde. Anschließend wurde TMB mit jeweils 1 mL Dichlormethan drei Mal extrahiert. Dichlormethan wurde dann über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Das Verhältnis von (R)- und (S)-TMB wurde mit überkritischer Flüssigkeitschromatographie gemessen. Der ee-Wert wurde berechnet nach:

$$ee = \frac{F_{(R)-TMB} - F_{(S)-TMB}}{F_{(R)-TMB} + F_{(S)-TMB}} \qquad (2.3)$$

wobei $F_{(R)\text{-}TMB}$ und $F_{(S)\text{-}TMB}$ die entsprechenden *Peak*-Flächen des Chromatogramms bezeichnen.

2.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante von *L*-Glutamat und *L*-Histidin

Potentiometrische Titrationskurven wurden mit einem Autotitrator (Titro-line, Fa. Schott, Mainz) bei 25°C gemessen. Dazu wurden 5 mM *L*-Glutamat bzw. *L*-Histidin in deionisiertem Wasser mit und ohne 30 % (v/v) DMSO gelöst. Die Ionenstärke wurde mit KCl auf 100 mM eingestellt. Der anfängliche pH-Wert wurde mit 5 M HCl bzw. 5 M KOH auf 2,5 bzw. 12 eingestellt. Aus dem sauren Milieu wurde die Lösung gegen 100 mM KOH, aus dem alkalischen Milieu gegen 100 mM HCl titriert, bis die Lösung am anderen Ende der pH-Wert-Skala angelangt war (pH ~ 12,0 bzw. 2,5). Der Verbrauch an HCl bzw. KOH und der entsprechende pH-Wert wurden aufgezeichnet. Anschließend wurden die Daten geglättet und differenziert (Matlab 2006R, The MathWorks Inc., Natick, USA). Die Minima des Graphen d*pH*/d*V* als Funktion des pH-Wertes bestimmten die Dissoziationskonstanten.

2.4.6 Bestimmung des pH-Werts in wässrigen DMSO und DMF-Lösungen

Gemäß Mukarjee und Ostrow (1998) entspricht unterhalb von 30 % (v/v) DMSO der gemessene pH-Wert dem wahren pH-Wert. Deshalb wurde die pH-Elektrode in diesem Bereich konventionell kalibriert. Für Messungen in 30 %-igen (v/v) DMSO-Lösungen wurde die pH-Elektrode zuvor mit 50 mM Kaliumhydrogenphtalat und 50 mM Phosphatpuffer gemäß dem veröffentlichten Protokoll in 30 % (v/v) DMSO kalibriert (Mussini *et al.*, 1991; Taylor, 1978). Über 30 % (v/v) DMSO wurden die gemessenen pH-Werte nach der Methode von Mukarjee und Ostrow (1998) korrigiert um den wahren pH-Wert zu bestimmen.

Der pH-Wert von wässrigen DMF-Lösungen wurde ebenfalls nach der beschriebenen Korrekturmethode bestimmt.

2.5 Enzymkinetische Messungen im Einphasensystem

2.5.1 FDH-Kinetik

FDH aus *Candida boidinii* (E.C.1.2.1.2) wurde von Codexis (Jülich) bezogen.

Alle kinetischen Messungen wurden in 200 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,5 und konstanter Temperatur von 25°C im 1 mL-Maßstab durchgeführt. In diesem Puffer wurden NAD^+ und Natriumformiat in den entsprechenden Konzentrationen gelöst. Die Reaktion wurde gestartet, indem 50 µL einer 1:100 Verdünnung des kommerziellen Enzympräparats (104 $U \cdot mL^{-1}$) zu 950 µL Puffer inklusive der Substrate gegeben wurde. Die Lösung wurde gemischt und 300 µL in eine Küvette mit einer Schichtdicke von 0,5 mm überführt.

Um die molare Konzentration der FDH zu bestimmen wurde eine aktive-Zentren-Titration des kommerziellen Präparats durchgeführt. Dazu wurde der Triazin-Farbstoff Procion blue mx-r gemäß dem Protokoll von Felber (2001) verwendet. Das Enzym wurde wie oben beschrieben in Puffer ohne Substrate verdünnt. So stellte sich heraus, dass in allen Experimenten die Konzentration der FDH bei 22 µM lag.

Um das neue Modell und dessen Parameterwerte zu identifizieren, wurden Verlaufskurven über eine Dauer von 1 bis 20 h gemessen. Die Daten wurden in einem Intervall von 15 bis 30 s aufgezeichnet, bis nahezu vollständiger Umsatz erreicht wurde. In einer statistischen Versuchsplanung (3^2 *full factorial design*) wurden 9 Experimente entwickelt. Die Freiheitsgrade waren die molaren Anfangskonzentrationen von NAD^+ bzw. Formiat. Die Einstellungen sind in Tabelle 2.6 gezeigt.

Wie in einschlägiger Literatur empfohlen wird (Bardow und Marquardt, 2004b; Brendel *et al.*, 2006; Michalik *et al.*, 2007), wurden die Modelle an die experimentellen Daten angepasst, indem die Parameterwerte variiert wurde. Dabei kamen im ersten Schritt die inkrementelle Methode und eigens entwickelte Programme (LPT, RWTH Aachen) zum Einsatz. Im zweiten Schritt wurde der dynamische Parameterschätzer von *gProms* (Version 3.0.2, Process System Enterprise Ltd., London, UK) verwendet um statistisch optimale Parameterwerte zu bestimmen.

Die gleichen Experimente und der gleiche Optimierungsalgorithmus von *gProms* wurden wie oben beschrieben angewandt um das Literaturmodell anzupassen. Um zu verhindern in schlechten lokalen Optima zu landen, wurden der Literatur Startwerte für die kinetischen Parameter entnommen.

Tabelle 2.6: Statistisch empfohlene Versuche Exp_1 - Exp_9, um die Kinetik der FDH unter technischen Bedingungen zu bestimmen.

		Formiat [mM]		
		50	500	1500
NAD^+ [mM]	1	Exp_1	Exp_2	Exp_3
	5	Exp_4	Exp_5	Exp_6
	10	Exp_7	Exp_8	Exp_9

2.5.2 BAL-Kinetik unter Referenzbedingungen

Unter Referenzbedingungen wurden alle kinetischen Messungen in KPi-Puffer mit jeweils 0,25 mM $MgSO_4$ und ThDP durchgeführt. Um die Löslichkeit der hydrophoben Reaktanden zu erhöhen, wurden 30 % (v/v) DMSO bzw. 25 % (v/v) DMF hinzugefügt. Schließlich wurden die Ionenstärke auf 100 mM und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Die Messung erfolgte bei 25,0°C.

Da sich die Löslichkeit der Reaktanden in DMSO und DMF unterschieden, wurden verschiedene Konzentrationsbereiche untersucht: In wässriger DMSO-Lösung wurde die DMBA-Konzentration zwischen 0,5 und 3 mM variiert. In wässriger DMF-Lösung wurde die DMBA-Konzentration zwischen 0,1 und 5 mM variiert. Die TMB-Konzentration wurde zwischen 0,2 und 2,5 mM variiert. Wegen der geringen Löslichkeit des Produktes konnte der Reaktionsverlauf bei höheren Konzentrationen nicht verfolgt werden.

Die Reaktionsanfangsgeschwindigkeit wurde üblicherweise im 1 mL-Maßstab durch Zugabe von 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ BAL gestartet. Wahlweise wurde die zeitliche Abnahme der Fluoreszenz-

intensität oder der UV-Absorption gemessen. Messwerte wurden kontinuierlich im Intervall von 1 s über eine Dauer von 60 - 300 s aufgezeichnet. Aus dem linearen Bereich wurde die zeitliche Intenstitätsänderung bzw. Extinktionsänderung (= Steigung) mittels linearer Regression bestimmt und diese anhand Gleichung (1.4) oder (1.5) und der Massenbilanz in eine Konzentrationsänderung über der Zeit umgerechnet. Um die Aktivität zu berechnen, wurde ein Molekulargewicht der BAL von 60.000 $g \cdot mol^{-1}$ angenommen.

Um Verlaufskurven zu messen, wurden 8,9 mL der Substratlösung in dem Glasreaktor vorgelegt (Abbildung 2.1) und auf 25,0°C temperiert. Anschließend wurden der Rührer, die Pumpe und die Datenaufzeichnung für die wässrige Phase eingeschaltet. Durch Zugabe von ca. 1 - 6 $\mu g \cdot mL^{-1}$ BAL wurde die Enzymreaktion gestartet. Sowohl die Substrat- als auch die Enzymkonzentration unterschied sich in den einzelnen Experimenten (Tabelle 2.7). Messwerte wurden in regelmäßigem Takt (1 - 5 s) aufgenommen. Die Datenaufzeichnung wurde gestoppt, wenn die Extinktion oder Intensität annähernd konstant blieb. Typische Reaktionszeiten lagen bei 30 – 120 min. Konzentrationen wurden aus den Rohdaten mittels Gleichungen (2.1) bzw. (2.2) und der Massenbilanz bestimmt.

Tabelle 2.7: Startbedingungen für die Messung von Verlaufskurven im Einphasensystem.

Experiment	DMBA [mM]	TMB [mM]	BAL [nM]
A	4,5	0	6,2
B	2,2	0	3,1
C	0,9	0	2,4
D	0	2,0	2,4
E	0	0,9	1,5
F	0	0,4	1,5

2.5.3 BAL-Kinetik bei verschiedenen Reaktionsbedingungen

Ausgehend von dem in Kapitel 2.5.2 beschriebenen Protokoll wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Die gewünschte Temperatur wurde eingestellt, indem ein kühl- und regelbares Wasserbad verwendet wurde, das über Schläuche den Küvettenhalter oder den Doppelmantel des Glasreaktors temperierte. Um die Ionenstärke einzustellen, wurde K_2HPO_4 bzw. KH_2PO_4 in der gewünschten Ionenstärke (nicht Pufferstärke!) getrennt eingewogen. Die Ionenstärke wurde berechnet nach:

$$I = \frac{1}{2}\sum_i c_i \cdot z_i^2 \qquad (2.4)$$

wobei c_i die molare Konzentration und z_i die Ladung des (dissoziierten) Teilchens *i* in Lösung darstellt. Da der Puffer durch DMSO oder DMF verdünnt wurde, wurde dies vorab in der Berechnung berücksichtigt. Um den pH-Wert einzustellen, wurden die Lösungen entsprechender Ionenstärke in geeignetem Verhältnis gemischt. Das Verhältnis wurde empirisch bestimmt, indem der pH-Wert mit einer Glaselektrode überprüft wurde. Die DMSO- bzw. DMF-Konzentration wurde volumetrisch eingestellt. Da die DMSO- bzw. DMF-Konzentration und der pH-Wert voneinander abhingen, musste das in Kapitel 2.4.6 beschriebene Protokoll eingehalten werden.

Reaktionsanfangsraten wurden unter den gewünschten Bedingungen, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, gemessen. Verlaufskurven wurden im DMSO-System bei konstanter DMBA-Startkonzentration von 1 mM und 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ BAL gemessen. In wässriger DMF-Lösung war die DMBA-Konzentration konstant bei 2,5 mM, während die Enzymkonzentration je nach Experiment empirisch variiert wurde, so dass die Reaktion idealerweise mindestens 30 min dauerte. Die Validierungsversuche wurden unter den in Tabelle 2.8 zusammengefassten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Tabelle 2.8: Reaktionsbedingungen der Validierungsversuche.

Versuch	T [°C]	pH	I [mM]	DMF [%, v/v]	BAL [nM]
A	15	6,98	50	5	16,7
B	15	9,85	50	50	16,7
C	25	8,48	225	27,5	33,3
D	35	7,03	400	5	25,0
E	25	8,42	225	27,5	16,7
F	25	8,40	100	25	16,7

2.6 Messungen im Zweiphasensystem

2.6.1 Reaktorkonzept

Um reproduzierbare Messungen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen zu gewährleisten, wurde in Kooperation mit Fr. van den Wittenboer und Dr. Lasse Greiner ein Reaktorkonzept entwickelt (Abbildung 2.1). Das Reaktionssystem bestand aus einem Glasgefäß mit temperierbarem Doppelmantel. Im Metalldeckel befand sich ein Elektromotor, der über eine Welle einen Rührer antrieb und die obere Phase durchmischte. Die Drehzahl des Rührers betrug stets ca. 4,0 s^{-1}. Die untere Phase wurde durch ein Magnetrührer (12,0 mm x 4,5 mm) durchmischt. Die Drehzahl wurde konstant auf ca. 4,4 s^{-1} eingestellt. Ein Dichtungsring zwischen Glasgefäß und Metalldeckel verhinderte die Verdunstung des Lösemittels. Deckel und Gefäß wurden mit einer Klammer fixiert. Um die Flüssigkeit aus dem Reaktorinneren zu leiten wurde der Deckel mit 5 Bohrungen inklusive M6-Gewinden versehen. Angeschraubte PTFE (Polytetrafluorethylen)-Schläuche reichten in die wässrige bzw. organische Phase.

Das Zweiphasensystem setzte sich aus einer wässrigen (unteren) und einer organischen (oberen) Phase zusammen. Wenn nicht anders beschrieben, betrugen die Volumina beider Phasen 9,0 mL. Die wässrige Phase bestand aus KPi-Puffer mit 25 % (v/v) DMF und jeweils 0,25 mM $MgSO_4$ und ThDP. Die Ionenstärke wurde auf 100 mM und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Die organische Phase bestand aus n-Hexan oder MIBK (Methylisobutylketon). Die wässrige und organische Phase wurde vorab jeweils mit der anderen Phase gesättigt. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgten die Messungen bei 25,0°C.

2.6.2 Messperipherie des Zweiphasenrektors

Die wässrige Phase wurde mittels einer Membranpumpe durch jeweils eine Durchflussküvette für Fluoreszenz und UV-Absorption gepumpt und wieder in die wässrige Phase des Reaktorinhaltes geleitet (Abbildung 2.2). Da in der organischen Phase die Fluoreszenz gelöscht war, wurde hier nur die UV-Absorption gemessen. Ein Küvettenwechsler ermöglichte, in regelmäßigen Abständen (zwischen 5 und 30 s) die wässrige und organische Phase abwechselnd zu messen. Durch ein Federventil konnte die Reaktion gestartet oder Proben aus der wässrigen Phase für die HPLC-Analyse entnommen werden. Dabei öffnete sich das Federventil nur, wenn eine 5 mL-Einwegspritze angeschlossen wurde.

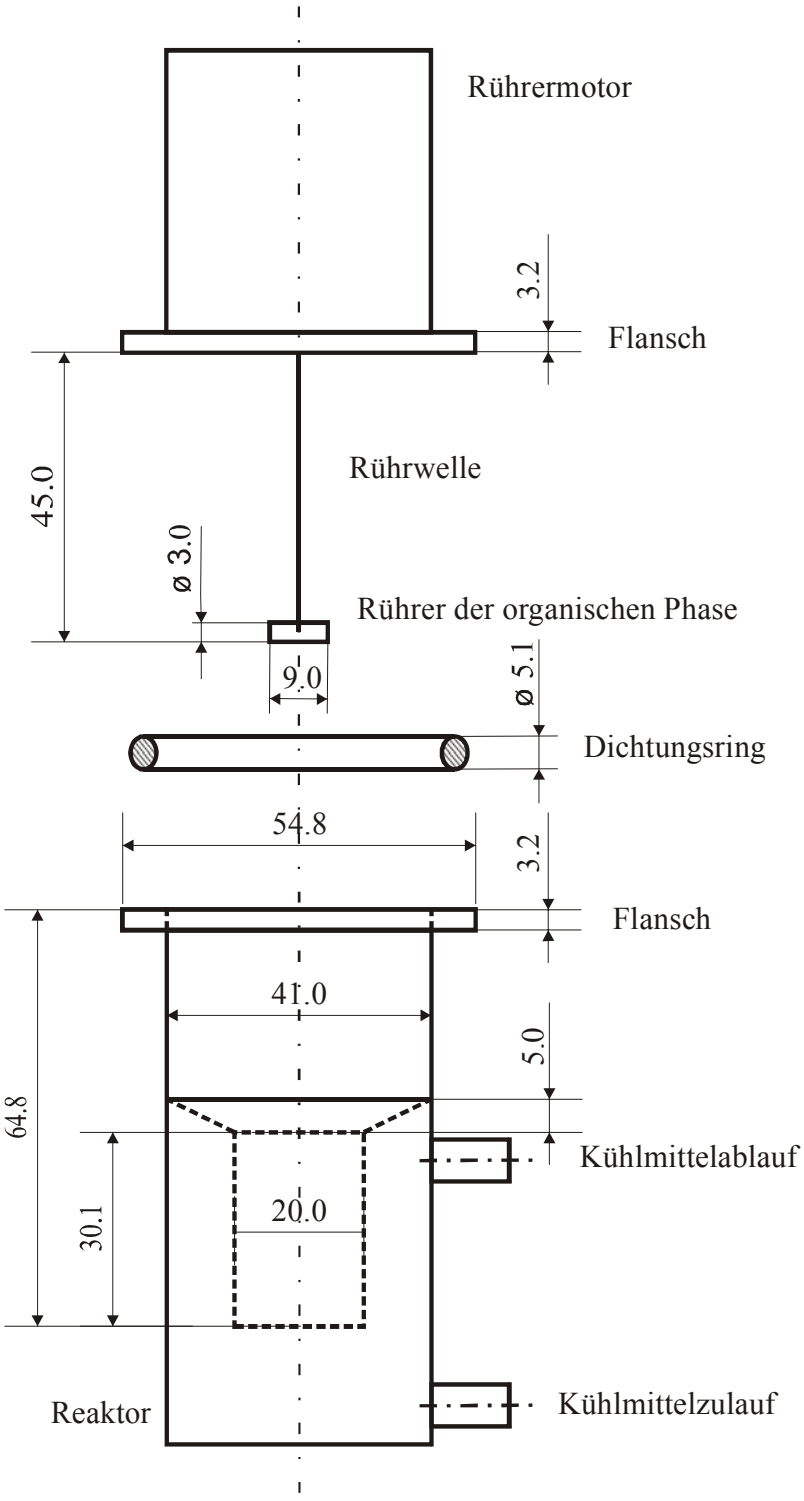


Abbildung 2.1: Glasreaktor für die Messung im Zweiphasensystem. Die wichtigsten Bemaßungen sind in mm angegeben.

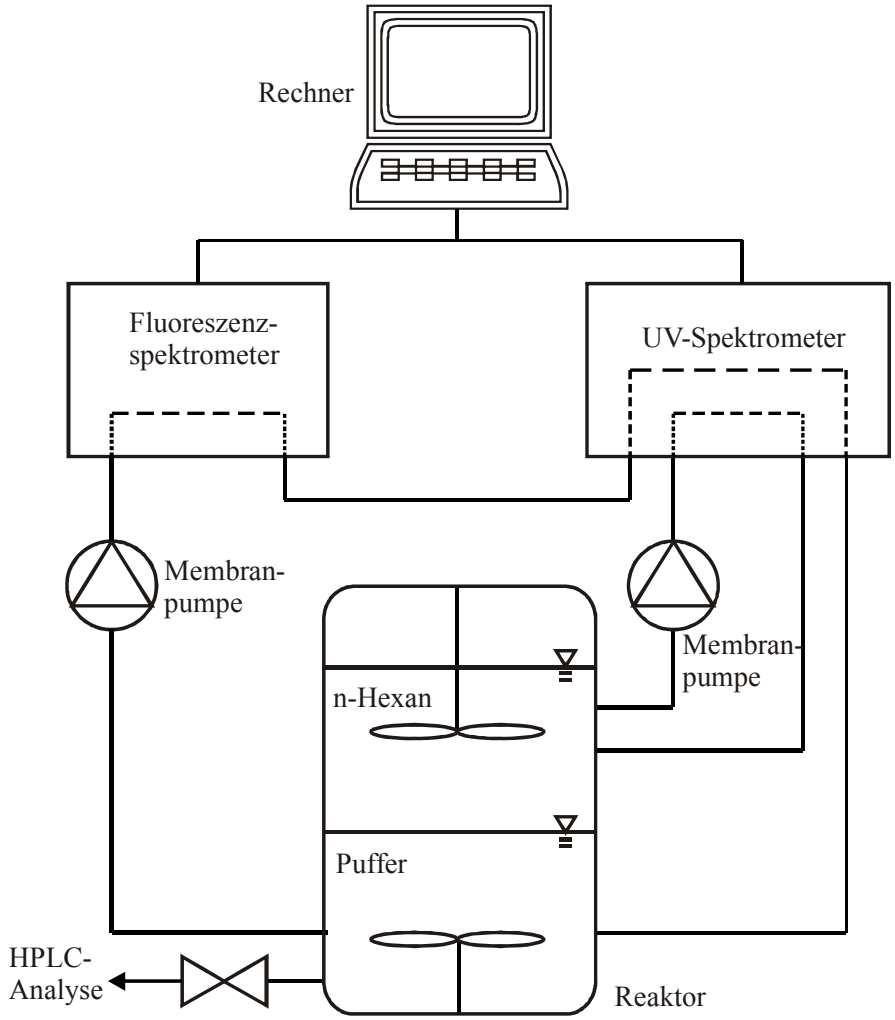


Abbildung 2.2: Messperipherie zur Messung im Zweiphasensystem.

2.6.3 Bestimmung der Enzymstabilität

Die Lagerstabilität wurde gemessen, indem die BAL in einer Konzentration von 20 µg·mL^{-1} bei den entsprechenden Bedingungen inkubiert wurde. Nach verschiedenen Zeiten wurde dem Ansatz ein Aliquot von 100 µL entnommen. Diese Lösung wurde zu 400 µL einer Substratlösung pipettiert und gemischt. Die Substratlösung wurde wie in Kapitel 2.5.2 hergestellt. Abweichend davon wurde die DMBA-Konzentration so eingestellt, dass die Endkonzentration im Testansatz 2,5 mM betrug.

2.6.4 Messung der Verteilung

Der Verteilungskoeffizient eines Stoffes in einem Zweiphasensystem gibt dessen Konzentrationsverhältnis im thermodynamischen Gleichgewicht an. Um den Verteilungskoeffizienten zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen von DMBA bzw. TMB in

ein Zweiphasensystem bestehend aus jeweils 0,8 mL wässriger und organischer Phase gegeben. Um die Verteilung von DMBA zu messen, wurden verschiedene Konzentrationen in Hexan bzw. MIBK gelöst. Um die Verteilung von TMB in Puffer-Hexan zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen an TMB in der wässrigen Phase gelöst. Die Verteilung von TMB in Puffer-MIBK wurde durch Vorlage von TMB in MIBK ermittelt. Jeweils 14 Konzentrationen wurden untersucht. Die so vorbereitete wässrige und organische Phase wurden in ein 2 mL-HPLC-Fläschchen gegeben. Die Fläschchen wurden durch einen Deckel mit Gummiseptum verschlossen und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze mindestens 24 h bei definierter Temperatur gelagert. Aus der organischen Phase wurde mit einer Pipette eine Probe entnommen. Um der wässrigen Phase eine Probe zu entnehmen, wurden die Fläschchen auf den Kopf gestellt und mit einer Spritze das Septum durchstochen. Nach entsprechender Verdünnung wurde die Konzentration UV-spektrometrisch oder per HPLC bestimmt.

2.6.5 Messung des Stofftransports

Der Stofftransport über die Phasengrenze der untersuchten Zweiphasensysteme wurde gemessen, indem mindestens drei verschiedene Konzentrationen von DMBA bzw. TMB in Puffer gelöst wurden. Von dieser Lösung wurden 9 mL in den Zweiphasenreaktor überführt und auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Datenaufzeichnung, Pumpen und Rührer wurden gestartet. Anschließend wurden 9 mL der vortemperierten organischen Phase mit einer Einwegspritze vorsichtig auf den Puffer pipettiert, was sich in einem sprunghaften Anstieg der Extinktion in der organischen Phase äußerte. Zur Auswertung wurden nur die darauf folgenden Daten herangezogen.

2.6.6 Enzymkinetische Messungen in reaktiven Zweiphasensystemen

Enzymkinetische Messungen wurden durchgeführt, indem 7,9 mL Puffer mit der gewünschten DMBA- und TMB-Konzentrationen in den temperierten Zweiphasenreaktor gegeben und 8 mL organische Phase mit den gewünschten Anfangskonzentrationen in einer Einwegspritze vortemperiert wurde. Die Datenaufzeichnung, Pumpen und Rührer wurden gestartet. Zur wässrigen Phase wurden 100 µL Enzymlösung pipettiert und unmittelbar darauf die vorbereitete organische Phase vorsichtig auf die wässrige Phase gegeben. Daraufhin änderte sich die Extinktion sprungartig. Ausgewertet wurden die Daten nach dem sprunghaften Anstieg der Extinktion in der organischen Phase. Die Anfangsbedingungen der Messungen sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Um die Konzentrationen aller Reaktanden im reaktiven Zweiphasensystem zu messen, wurden UV-Spektren zeitabhängig gemessen. Dafür eignete sich der Wellenlängenbereich

von 250 – 350 nm. Zunächst wurden die Extinktionskoeffizienten im Intervall von 5 nm ermittelt. Das Lambert-Beer Gesetz eignete sich dafür im ausgewählten Wellenlängenbereich. Aus der spektralen Information wurde zu jedem Messzeitpunkt die Konzentration von DMBA und TMB durch Minimierung der Fehlerquadratsumme von Gleichung (2.5) berechnet. Aus bekannten Gemischen konnte so mit einem Fehler von < 2% auf die Einzelkonzentrationen geschlossen werden.

$$Ext(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot d \tag{2.5}$$

wobei $Ext(\lambda)$ die wellenlängenabhängige Extinktion und ε_i der wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient von *i* ist.

Tabelle 2.9: Anfangsbedingungen für die Messungen im reaktiven Zweiphasensystem.

$DMBA_{aq}$ [mM]	$DMBA_{org}$ [mM]	TMB_{aq} [mM]	TMB_{org} [mM]	*BAL* [nM]
4,60	0	0,15	0	90,4
2,12		0,13		
1,05		0,08		
0,08		0,98		

2.6.7 Messung von Verteilung und Stofftransport bei variierenden Bedingungen

Um die Verteilung zu bestimmen, wurde prinzipiell so verfahren, wie es in Kapitel 2.6.4 beschrieben wurde. Zunächst wurde jedoch die wässrige Phase analog zu dem Protokoll in Kapitel 2.5.3 vorbereitet. Dann wurden jeweils etwa 8 - 10 verschiedene Konzentrationen pro Stoff und Reaktionsbedingung untersucht. Änderungen vom Basisprotokoll resultierten aus einem veränderten Löslichkeitsbereich durch Veränderung der Reaktionsbedingungen, weswegen geringere Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Im Zweiphasensystem Puffer-MIBK wurde zudem die Verteilung von DMF berücksichtigt (Tabelle 2.10). In Hexan konnte DMF nicht nachgewiesen werden. Die Angaben im Ergebnisteil beziehen sich somit lediglich auf die Konzentration in der wässrigen Phase.

Tabelle 2.10: Verteilung von DMF zwischen wässriger und MIBK-Phase.

DMF_{aq} [%, v/v]	DMF_{org} [%, v/v]	DMF_{aq} [%, v/v]	DMF_{org} [%, v/v]
0	0	*Fortsetzung*	
1,02	0,10	26,85	2,80
2,00	0,19	31,57	3,55
4,54	0,41	34,77	4,19
8,29	0,77	38,13	5,07
12,03	1,14	40,83	5,80
15,53	1,45	43,53	6,77
21,42	2,12	45,33	7,69

2.7 *In silico*-Experimente

Simulationen wurden mit *gProms* (Version 3.0.2, Process System Enterprise Ltd., London, UK) durchgeführt. Dazu wurde das entwickelte Modell in die geforderte Syntax übersetzt und die Parameterwerte - wie im Ergebnisteil identifiziert - übernommen. Um die Freiheitsgrade zu optimieren wurde die dynamische Optimierungsfunktion des Programms genutzt und die zu maximierende Zielfunktion angegeben. In allen Fällen handelte es sich dabei um die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA). Die Freiheitsgrade unterschieden sich zum Teil und sind für die drei untersuchten Fälle zusammen mit den Grenzwerten in Tabelle 2.11 zusammengefasst.

Tabelle 2.11: Freiheitsgrade und Grenzen der Optimierung.

Fallbeispiel	Freiheitsgrade	Untere Grenze	Obere Grenze
1 und 2	Temperatur [K]	278	328
	pH-Wert	7,2	10,4
	Ionenstärke [mM]	25	400
	DMF [% v/v]	5	45
3	$V_{org} \cdot V_{aq}^{-1}$ [-]	0,1	10

2.7.1 Optimierung des Einphasensystems

1. Fallbeispiel: Die Freiheitsgrade der Optimierung waren Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und DMF-Konzentration. Diese Einflussfaktoren wurden nach Reaktionszeiten von 1,0; 2,0 und 5,0 h optimiert. Außerdem wurden Enzymkonzentrationen von 5 bis 800 nM angenommen. Die DMBA-Konzentration wurde anfangs auf 5,0 mM eingestellt. Die TMB-Konzentration war zu Beginn gleich Null. Die RZA wurde berechnet und nach folgender Gleichung maximiert:

$$RZA = \frac{P_E}{t_R} \rightarrow max \tag{2.6}$$

wobei P_E die molare Konzentration von TMB zur Reaktionszeit t_R bezeichnet.

2.7.2 Optimierung des Zweiphasensystems aus Puffer und Hexan

2. Fallbeispiel: Wie in Kapitel 2.7.1 wurden die Reaktionsbedingungen nach unterschiedlichen Reaktionszeiten optimiert. Abweichend vom Fall zuvor wurde neben einer Reaktionsdauer von 1,0 und 2,0 h, die optimalen Betriebsbedingungen nach 3,0 h ermittelt. Die Phasengrenzfläche des Zweiphasensystems wurde mit 3,142 cm^2 angenommen. Das Volumenverhältnis aus wässriger und organischer Phase betrug stets 1. Die Enzymkonzentration variierte zwischen 20 und 1000 nM. DMBA wurde in einer Konzentration von 25 mM ausschließlich in Hexan vorgelegt. Alle anderen Konzentrationen waren zu Beginn Null. Da im Zweiphasensystem angenommen wurde, dass die Produktkonzentration nur aus der organischen Phase gewonnen wurde, wurde dies bei der Berechnung berücksichtigt. Das Volumen wurde auf den Gesamtreaktor bezogen. Somit wurde die RZA folgendermaßen berechnet:

$$RZA = \frac{P_{org,E}}{t_R} \cdot \frac{V_{org}}{V_{org} + V_{aq}} \rightarrow max \tag{2.7}$$

2.7.3 Optimierung des Zweiphasensystems aus Puffer und MIBK

3. Fallbeispiel: In diesen Simulationen wurde das Phasenverhältnis im Puffer-MIBK-System optimiert. Die Phasengrenzfläche des Zweiphasensystems wurde mit 3,142 cm2 angenommen. Um den Einfluss der Phasengrenzfläche zu untersuchen, wurden in drei weiteren *in silico*-Experimenten unterschiedliche Grenzflächen angenommen (3,142; 6,28; 15,71 und 31,42 cm^2). Die Reaktionsdauer in allen Experimenten betrug 1,0 h. Die Enzymkonzentration wurde von 0,020 bis 40 µM variiert. DMBA wurde ausschließlich in

MIBK vorgelegt. Hier lag die Konzentration zu Reaktionsbeginn bei 250 mM. Alle anderen Konzentrationen waren am Anfang Null. Die Reaktionsbedingungen wurden auf die Referenzwerte gesetzt: 298 K; pH 8,5; 25 % (v/v) DMF; I = 25 mM.

Zwei Experimente wurden zusätzlich *in vivo* durchgeführt. Dazu wurden die Reaktionsbedingungen auf die Referenzwerte eingestellt. DMBA wurde in der Konzentration von 265 mM in 8 mL MIBK vorgelegt. Durch die Zugabe von 2 mL Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet. Weitere Details sind in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Proben von je 10 µL wurden nach einer 1:10 (wässrige Phase) bzw. 1:50-Verdünnung (organische Phase) per HPLC analysiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Experimentelle Analyse und Modellierung

3.1.1 Strategie zur Modellidentifikation und Parameterschätzung

In der vorliegenden Dissertation wurde unter anderem der gesamte Reaktionsverlauf der Formiatoxidation durch Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH) und der Benzoinkondensation durch Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I. (BAL) modellgestützt beschrieben. Das erforderte zunächst ein enzymkinetisches Modell. Idealerweise basiert dieses Modell auf dem Mechanismus der jeweiligen Enzymreaktion. Ein mechanistisches Modell ist extrapolationsfähig und erlaubt, auf die Physik der Enzymreaktion rückzuschließen. Zuvor müssen die enzymkinetischen Modellparameter in geeigneter Weise bestimmt werden. Der größte Informationsgehalt befindet sich in Verlaufskurven. Deshalb sollte auf diese Information nicht verzichtet werden (Duggleby, 2001). Um diese Informationen zu extrahieren, wurden effiziente Methoden und Expertensoftware (bspw. *gProms*) entwickelt. Allerdings ist es nach wie vor schwierig, Parameter zuverlässig zu schätzen ohne deren Größenordnung zu kennen. Vor zwei Problemen stehen Prozesstechniker: (1) Der Rechenaufwand einer Parameterschätzung kann sehr groß sein. (2) Eine lokale Lösung statt des global optimalen Parameterwertes zu schätzen, ist vor allem bei enzymkinetischen Modellen riskant, da die Parameter meist stark korreliert sind. Die sogenannte inkrementelle Methode wurde vor kurzem entwickelt, um diesem Problem entgegenzutreten (Bardow und Marquardt, 2004a; Bardow und Marquardt, 2004b; Brendel *et al.*, 2006). Einen Durchbruch auf diesem Gebiet dürfte die globale Parameterschätzung darstellen, an der derzeit gearbeitet wird. Solange die Entwicklungen noch andauern, werden alternative Methoden benötigt.

Vasic-Racki *et al.* empfahlen, sich Vorwissen durch gezielte Experimente anzueignen (2003): Zunächst werden Reaktionsanfangsraten gemessen. Die Auswertung ist ein einfaches nichtlineares Problem, das effizient von den meisten Standardprogrammen (bspw. SigmaPlot, Origin) beherrscht wird. Anschließend werden gesamte Reaktionsverläufe aufgenommen. Bei der dynamischen Parameterschätzung dienen dann die Regressionskoeffizienten, die aus den Reaktionsanfangsraten bestimmt wurden, als Startwerte. Dadurch wird die Chance erhöht, die global optimale Lösung zu bestimmen, und die Rechenzeit verkürzt.

Eine systematische Vorgehensweise wurde in Anlehnung an diese Methodik entwickelt (Abbildung 3.1) und auf das Modellsystem der BAL angewendet. Ausgehend von

Literaturdaten oder ersten Versuchen wurde ein Modell entwickelt. Wenn keine kinetischen Parameterwerte bekannt waren, wurde dieses Modell auf der ersten Schätzebene an Reaktionsanfangsraten angepasst. War die Passgüte des Modells unbefriedigend, so konnten zwei Gründe dafür verantwortlich sein: (1) Die Messungen waren ungenau und wurden deshalb wiederholt und/oder (2) das Modell war schlecht gewählt und wurde revidiert.

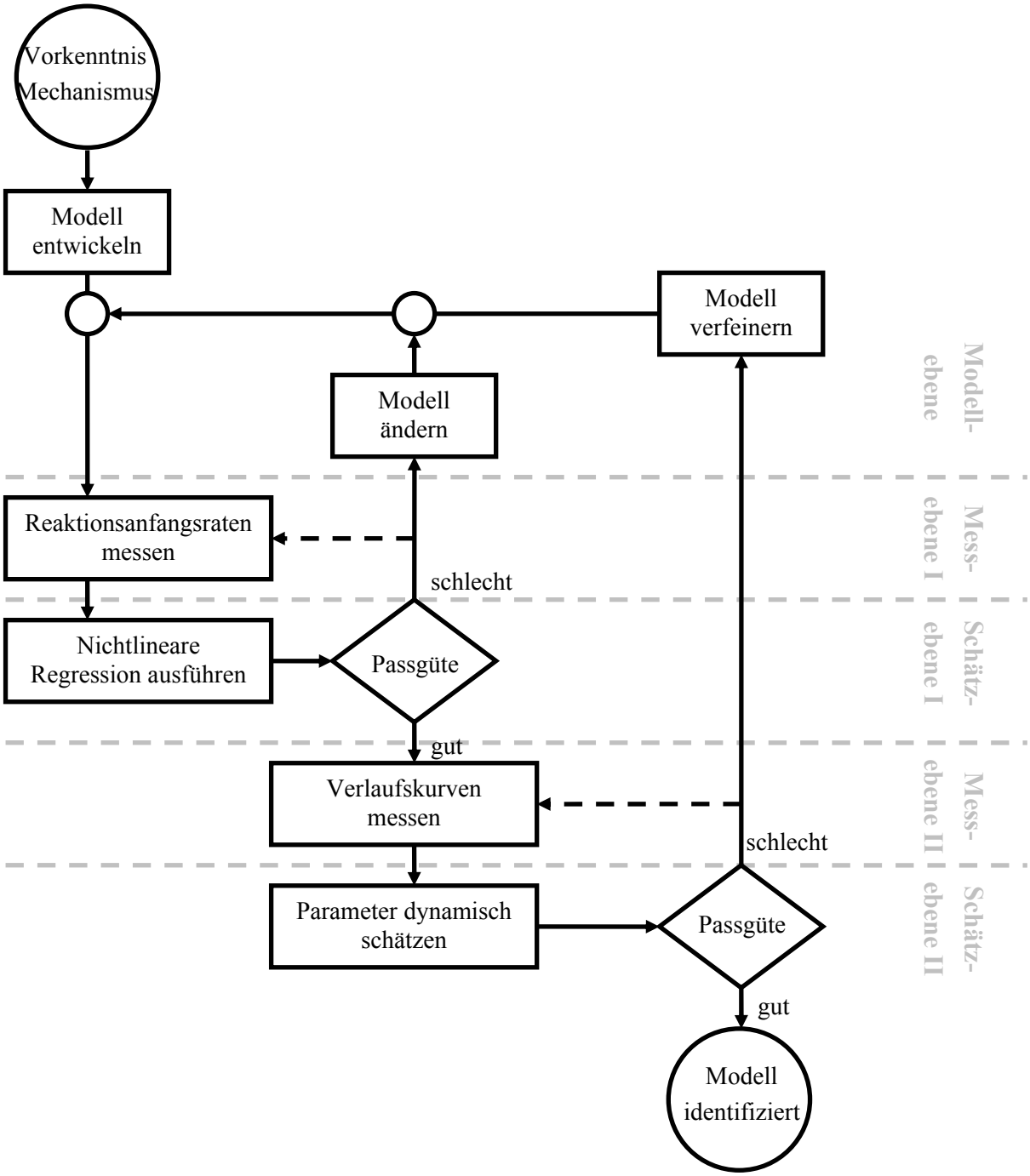


Abbildung 3.1: Angewandte Vorgehensweise bei der Modellidentifikation und Parameterschätzung.

Wenn die Passgüte des Modells gut war, wurden auf der zweiten Messebene Verlaufskurven gemessen und mit einem dynamischen Parameterschätzer analysiert. Bei schlechter Passgüte mussten die Messungen ggfs. wiederholt werden. Trugen selbst Replikate nicht zu einer besseren Passgüte bei, so wurden nochmals Änderungen auf der Modellebene vorgenommen und die Modellstruktur verfeinert. Dieser Prozess wurde so lange durchlaufen, bis auf der zweiten Schätzebene erfolgreich das Modell verifiziert und die Parameter zuverlässig bestimmt werden konnten. Dieses systematische Vorgehen zieht sich durch die gesamte Arbeit mit Ausnahme der Untersuchungen bezüglich der FDH, an der die inkrementelle Methodik angewendet wurde.

3.1.2 Kinetik der FDH

3.1.2.1 Mechanistisches kinetisches Modell

Um die Kinetik der in Abbildung 3.2 gezeigten Reaktion zu charakterisieren, wurde ein enzymkinetisches Modell entwickelt, das auf den individuellen Elementarreaktionen basiert.

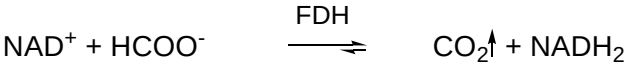


Abbildung 3.2: FDH-katalysierte Teilreaktion zur Cofaktorregenerierung.

Vorgeschlagen wurde ein geordneter Bi-Bi-Mechanismus, der aus 4 Elementarreaktionen besteht: zuerst bindet NAD^+ an die FDH und bildet den Enzym-Substrat-Komplex [NAD^+-FDH], dann bindet Formiat unter Ausbildung eines ternären Komplexes, der schnell in den Produktkomplex übergeht [CO_2-NADH-FDH]. Das Produkt CO_2 dissoziiert von dem ternären Komplex, NADH wird freigesetzt und das freie Enzym ist regeneriert (Blanchard und Cleland, 1980; Kato *et al.*, 1979). Die Freisetzung von CO_2 ist praktisch irreversibel, da gasförmiges CO_2 wegen der geringen Löslichkeit in Wasser entweicht (Schütte *et al.*, 1976).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde in Kooperation mit C. Michalik (LPT, RWTH Aachen) und M. Zavrel (BioVT, RWTH Aachen) eine Modelldiskriminierung durchgeführt. Für jede der vier Elementarreaktionen wurden sowohl reversible als auch irreversible Reaktionen erwogen und die Modellkandidaten jeder Kombination nach King und Altman (1956) entwickelt. Vier Paare der resultierenden Modellkandidaten waren identisch, obwohl sie auf unterschiedlichen mikrokinetischen Annahmen basierten. Insgesamt wurden so 12 verschiedene Modellkandidaten entwickelt, die auf 16 unterschiedlichen Kombinationen aus reversiblen und irreversiblen Elementarreaktionen beruhten. Diskriminiert wurden die Modellkandidaten, indem eine neue inkrementelle Identifizierungsmethode angewandt wurde (Bardow und Marquardt, 2004a; Bardow und Marquardt, 2004b; Brendel *et al.*, 2006). Diese

Methode besteht aus zwei Schritten, die beide auf dasselbe Ergebnis abzielen: Identifizierung der optimalen Modellparameter durch Minimierung der Fehlerabweichung zwischen Experiment und Modell. Genauer gesagt, werden die Modellkandidaten zuerst an geglättete Verlaufskurven angepasst und die Modellparameter durch nicht-lineare Regression geschätzt. Anschließend werden die besten Modellkandidaten statistisch sauber einer dynamischen Parameterschätzung an unmodifizierten Kurvenverläufen unterworfen. Für eine detaillierte Beschreibung der Methode im Allgemeinen und im Speziellen für die Anwendung an die FDH wird auf die kürzlich veröffentlichten Arbeiten verwiesen (Brendel *et al.*, 2006; Michalik *et al.*, 2007). Die entwickelten Modellkandidaten resultierten zum Teil in einer Reihe biologisch unsinniger Mechanismen. Um zwei Maxime zu gewährleisten, wurden diese dennoch berücksichtigt: (1) Der Forderung nach einem einfachen Modell sollte gerecht und (2) gleichzeitig subjektive und potentiell irreführende Annahmen von vornherein vermieden werden. Auf diese Weise gelang es, ein neues mechanistisches Modell zu identifizieren. Das folgende Modell schien am ehesten geeignet zu sein, die experimentellen Daten widerzuspiegeln:

$$v = -\frac{dA}{dt} = \frac{kcat \cdot E \cdot A \cdot B}{K_{iA} \cdot K_{mB} + K_{mB} \cdot A + K_{mA} \cdot B + A \cdot B + \frac{K_{iA} \cdot K_{mB}}{K_{iQ}} \cdot Q + \frac{K_{mA}}{\cdot K_{iQ}} \cdot B \cdot Q} \qquad (3.1)$$

wobei v die Reaktionsrate und E, A, B und Q jeweils die molare Konzentration an FDH, NAD^+, Formiat und NADH bezeichnet. K_{mA}, K_{mB} und K_{mQ} sind die Bindungskonstanten von NAD^+, Formiat und NADH und K_{iA} und K_{iQ} die Dissoziationskonstanten von NAD^+ und NADH. k_{cat} stellt die Wechselzahl dar.

Zu berücksichtigen ist in dem Reaktionssystem der FDH, dass NADH instabil ist. Deshalb musste der Zerfall von NADH in das Modell implementiert werden, um den Reaktionsverlauf richtig zu beschreiben. Es wurde vorgeschlagen, dass NADH in einem Zerfall erster Ordnung degeneriert wird (Alivisatos *et al.*, 1964; Chenault und Whitesides, 1987). Die daraus resultierende Massenbilanz lautete:

$$\frac{dQ}{dt} = v - k_{dQ} \cdot Q \qquad (3.2)$$

wobei k_d die Geschwindigkeitskonstante des NADH-Zerfalls benennt.

Da das ermittelte Modell (Gleichungen (3.1) und (3.2)) auf mechanistischen Grundlagen entwickelt wurde, konnte nun auf die einzelnen Elementarreaktionen der Gesamtreaktion zurückgeschlossen werden (Abbildung 3.3). Alle Schritte stellten sich als reversibel heraus mit Ausnahme der Dissoziation von CO_2 vom ternären Komplex und des NADH-Zerfalls. Diese Beobachtung bestätigte die auf aufwändigen Techniken beruhenden Annahmen durch rein kinetische Messungen.

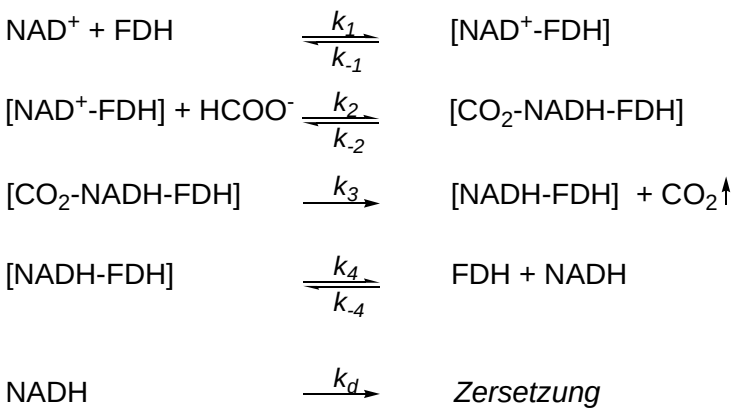


Abbildung 3.3: Elementarreaktionen der FDH-katalysierten Cofaktorregeneration.

3.1.2.2 Formalkinetisches Literaturmodell

Kula *et al.* (1980) sagten die FDH-Kinetik für die Cofaktorregenerierung mit einem formalkinetischen Modell voraus. Ausschließlich dieses Modell wurde in der angewandten Biokatalyse für die FDH benutzt (Felber, 2001; Findrik und Vasic-Racki, 2007; Hummel *et al.*, 1987; Kragl *et al.*, 1992; Kragl *et al.*, 1996b; Liese *et al.*, 1998; Orlich und Schomaecker, 1999; Schmidt *et al.*, 1992; Wichmann *et al.*, 1981):

$$v = -\frac{dA}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{\left(K_{mA} \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iQ}} \right) + A \right) \cdot \left(K_{mB} + B \right)} \tag{3.3}$$

wobei V_{max} die Maximalgeschwindigkeit bezeichnet.

Obwohl das Modell erfolgreich an Reaktionsanfangsraten angewandt wurde, wurde bisher die Modellgüte für gesamte Reaktionsverläufe nicht systematisch evaluiert. Das Literaturmodell nimmt die Michaelis-Menten-Bedingung ($K_{mA} = K_{iA}$) an und unterscheidet sich deshalb von dem mechanistischen Modell. Da bekannt ist, dass viele Enzymreaktionen dieser Bedingung nicht gehorchen (Biselli *et al.*, 2002; Frey und Hegeman, 2007) und da für die technische Biokatalyse gesamte Reaktionsverläufe von Interesse sind, wurde das Modell an Verlaufskurven bewertet.

3.1.2.3 Vergleich der Modellgüte und Parameterwerte

Um die Güte des formalkinetischen und des neuen Modells für die industrielle Anwendung zu testen, wurde die Vorhersagegenauigkeit beider Modelle für gesamte Reaktionsverläufe verglichen. Es wurden 9 Verlaufskurven mir unterschiedlichen Anfangskonzentrationen gemessen, bis die Enzymreaktion abgeschlossen schien. An diese Verlaufskurven wurden das mechanistische und das Literaturmodell angepasst. Der NADH-Zerfall wurde in beiden Simulationen berücksichtigt, um ausschließlich das enzymkinetische Modell zu beurteilen.

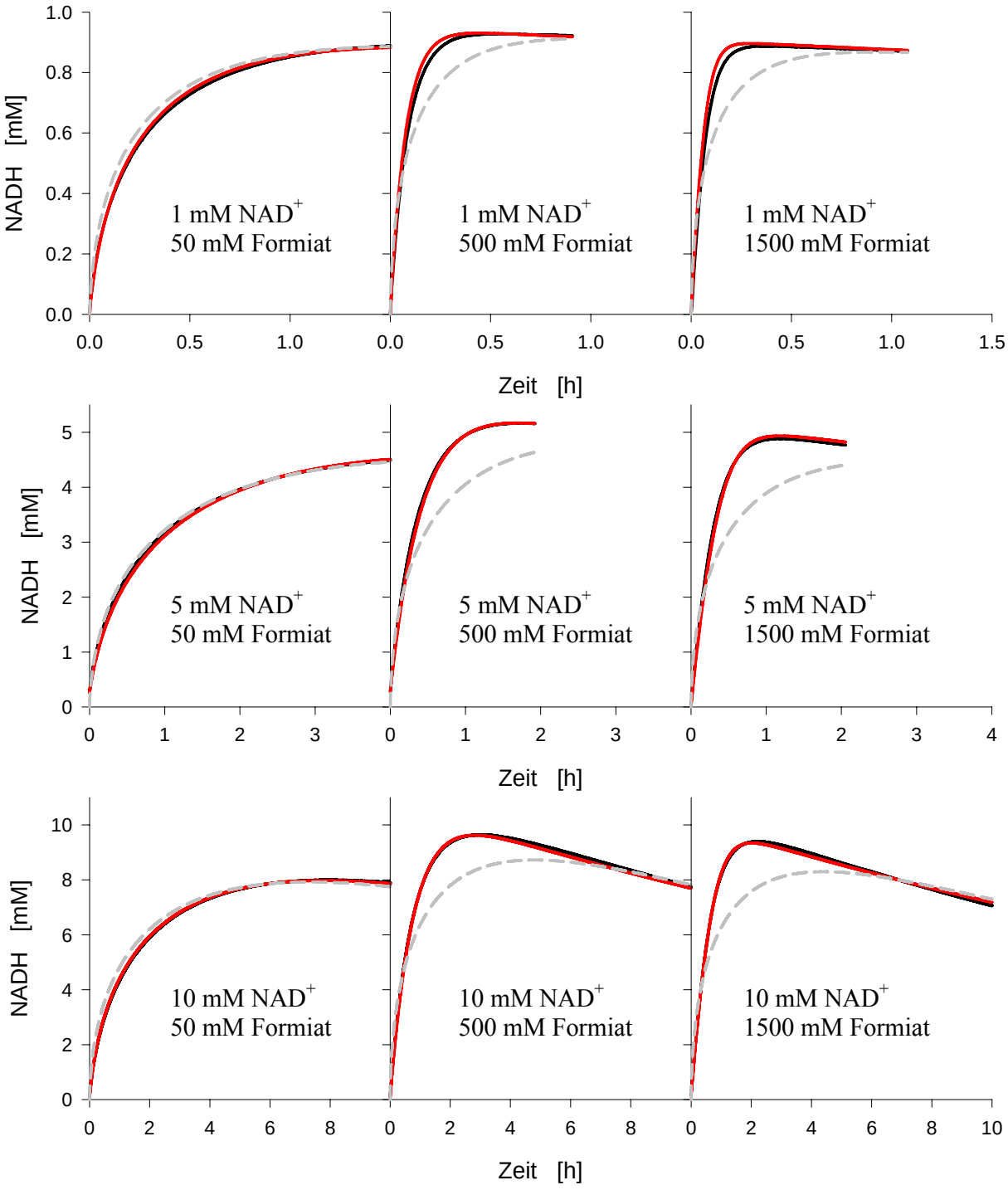


Abbildung 3.4: Modellanpassung des neuen mechanistischen (—) und des formalkinetischen Literaturmodells (– –) an den gemessenen Reaktionsverlauf (—).

Es zeigte sich (Abbildung 3.4), dass die Reaktionsrate mit steigender Formiatkonzentration anstieg. Die NAD^+-Konzentration beeinflusste weniger die Anfangsaktivität als eher die Dauer der Enzymreaktion. Erklärt werden kann dies dadurch, dass NAD^+ in limitierender Konzentration vorliegt. Liegt wenig NAD^+ vor, so ist es nach kurzer Zeit umgesetzt und die

Reaktion beendet. Der Konzentrationsabfall am Ende einiger Versuche rührte vom NADH-Zerfall her, woraus die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls bestimmt werden konnte.

Wird die Modellgüte verglichen, so wurde beobachtet, dass das neue Modell den gesamten Reaktionsverlauf aller Experimente gut vorhersagt. Im Gegensatz dazu lieferte das Literaturmodell eine schlechtere Anpassung an die experimentellen Daten. Die Modellgüte war zwar zunächst gut, wich aber im Verlauf der Reaktion immer stärker ab. Dieser Trend vergrößerte sich mit steigender Formiatkonzentration im Reaktionsansatz. Zusammenfassend deutet die gute Modellgüte des mechanistischen Modells an, dass alle signifikanten Elementarreaktionen richtig bestimmt wurden.

Die enzymkinetischen Parameter wurden mit *gProms* geschätzt. Startwerte wurden der Literatur entnommen. Zusätzlich wurden 200 unterschiedliche, zufällige Werte als Startwerte gewählt, um das Risiko zu mindern, in schlechten, lokal optimalen Parameterwerten festzustecken. Die statistische Versuchsplanung empfahl einen Überschuss an Formiat einzusetzen, da dies industriell relevante Bedingungen sind. Da NAD^+ und NADH in gekoppelten Reaktionen ständig regeneriert werden, sind deren Konzentrationen in praktischen Anwendungen niedrig. Um das Modell sicher zu bestimmen, waren jedoch auch Messungen bei geringen Formiatkonzentrationen notwendig. Deshalb wurde ein weiteres Experiment bei 100 mM NAD^+ und 5 mM Formiat durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte K_{mB} sehr genau bestimmt werden.

Die daraus resultierenden Parameterwerte der beiden Modelle sind in Tabelle 3.1 angegeben. Die kleinen Standardabweichungen deuten darauf hin, dass alle Werte statistisch signifikant sind und gut bestimmt werden konnten. K_{mA} und K_{iQ} des mechanistischen Modells waren vergleichbar mit den Literaturwerten. K_{mB} wurde deutlich kleiner als der Mittelwert aller veröffentlichten Daten geschätzt, wobei der hier identifizierte Wert nicht allzu fern von manch anderen veröffentlichten Werten ist. Eine hohe Spezifität des Enzyms für beide Substrate trat auf und im Einklang mit veröffentlichten Daten inhibiert NADH kompetitiv die Bindung von NAD^+ an das Enzym. Im Gegensatz zum Literaturmodell beinhaltet das mechanistische einen weiteren kinetischen Parameter: K_{iA} bezeichnete die Dissoziationskonstante von [NAD^+-FDH] oder – was gleichbedeutend ist - die kompetitive Inhibitionskonstante von NAD^+ gegenüber der Bindung von NADH an die FDH. Der Wert von K_{iA} war auffallend groß. An dieser Stelle physikalische Schlüsse zu ziehen, wäre hypothetisch. Jedoch kann daraus gefolgert werden, dass die Inhibition keine große Rolle im untersuchten Konzentrationsbereich spielte, da zu wenig NAD^+ vorlag.

Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante für den NADH-Zerfall k_{dQ} lag für das mechanistische bei $9{,}59 \cdot 10^{-6}$ s^{-1} und für das Literaturmodell bei $9{,}89 \cdot 10^{-6}$ s^{-1}, was einer Halbwertszeit von etwa 20 h entspricht. Beide Werte stimmen gut mit Literaturdaten überein. In früheren Arbeiten wurde eine Halbwertszeit von 27 h berichtet (Chenault und Whitesides,

1987). Die Abweichung kann auf die unterschiedlichen Puffermilieus zurückgeführt werden. Im vorliegenden Fall war der pH-Wert um 0,5 Einheiten höher und die Pufferkapazität doppelt so hoch wie im Literaturbeispiel. Dies führte dazu, dass eine höhere $H_2PO_4^-$-Konzentration im Reaktionsansatz vorlag. Nach (Alivisatos *et al.*, 1964) resultieren hohe $H_2PO_4^-$-Konzentrationen in einer größeren Instabilität von NADH.

Tabelle 3.1: Optimale Modellparameter des mechanistischen und des Literaturmodells zusammen mit Literaturwerten. Informationen, die nicht angegeben waren, sind mit n. a. gekennzeichnet.

K_{mA} [µM]	K_{mB} [mM]	K_{iQ} [µM]	K_{iA} [mM]	T [°C]	pH	Referenz
38,39 ± 0,09	0,472 ± 0,007	117,5 ± 0,04	78,14 ± 0,08	25	7,5	Mechanistisches Modell
1702 ± 34	(63,0 ± 0,2)·10^3	68,3 ± 1,2	-	25	7,5	Literaturmodell
39	12.8	289	-	30	8.0	Findrik und Vasic-Racki, 2007
45	6.0	n. a.	-	30	n. a.	Felber, 2001
40	2.4	n. a.	-	25	n. a.	Labrou *et al.*, 2000
45	5.6	17	-	30	7.5	Slusarczyk *et al.*, 2000
39	8.70	30	-	n. a.	8.0	Kragl *et al.*, 1996a
70	29.34	90	-	30	8.0	Schmidt *et al.*, 1992
300	94.5	150	-	40	8.0	Wichmann *et al.*, 1981
32	1.76	6.4	-	n.a.	8.0	Blanchard und Cleland, 1980
100	16	30	-	30	8.0	Kato *et al.*, 1979
90	13	n. a.	-	30	7.5	Schütte *et al.*, 1976
100	1.5	n. a.	-	n. a.	7.5	Sahm und Wagner, 1973

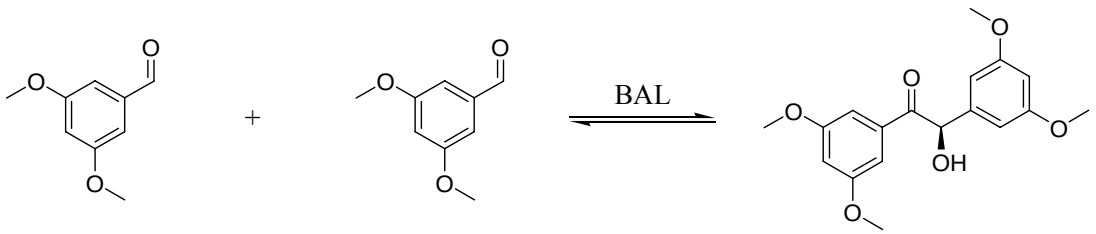
Auffallend an den optimalen Parameterwerten des Literaturmodells ist, dass K_{mA} ein bis zwei Größenordnungen größer geschätzt wurde, als die veröffentlichten Werte. Ebenso lag k_{cat} mit 1,353 s^{-1} eine Größenordnung über dem ermittelten Wert des mechanistischen Modells (0,177 s^{-1}). Substratsättigungskurven für NAD^+ und Formiat bei jeweils überschüssigem Reaktionspartner (Daten nicht gezeigt) deuteten darauf hin, dass die Wechselzahl des mechanistischen Modells richtig bestimmt und die des Literaturmodells hingegen falsch bestimmt wurde. Zusätzlich bekräftigten sie die Annahme, dass die Wechselzahl des Literaturmodells überschätzt wurde. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass k_{cat} und K_{mA} des Literaturmodells Anpassungswerte ohne physikalische Bedeutung sind.

Die Literaturwerte und die optimalen Parameterwerte des Literaturmodells wurden an dem gleichen Modell bestimmt. Trotzdem unterscheiden sich die Werte zum Teil stark. Diese Tatsache kann darauf zurückgeführt werden, dass die Literaturwerte mit Reaktionsanfangsraten bestimmt wurden. In dieser Arbeit wurden die Parameterwerte durch Verlaufskurven bestimmt. Daraus wurde geschlossen, dass die bisherigen Parameter in Kombination mit dem Literaturmodell suboptimal sind, wenn die Studie dazu dient, das Modell unter Prozessbedingungen anzuwenden.

Aus diesem Grund und wegen der schlechteren Modellgüte des bisher verwandten Modells mag erhebliches Optimierungspotential in technischen Anwendungen stecken. Das neue Modell eignet sich besonders für die rationale Entwicklung und Optimierung von nachhaltigen Prozessen mit einer effizienteren Ausnutzung des Cofaktors sowie der anderen Reaktanden.

3.1.3 Kinetik der BAL im Einphasensystem

Die Carboligation von aromatischen Aldehyden durch die BAL wurde anhand der Modellreaktion in Abbildung 3.5 untersucht. Dazu wurden zunächst Referenzbedingungen bestimmt. Diese Bedingungen blieben konstant, bis ein geeignetes Modell ermittelt war. Im nächsten Kapitel wird beschrieben, wie sich die Modellparameter ändern, wenn die Bedingungen von den Referenzbedingungen abweichen.



3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) + 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) ⇌ (*R*)-3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin (TMB)

Abbildung 3.5: BAL-katalysierte Carboligation zur Synthese von TMB.

Im Wesentlichen richtete sich die Auswahl der Referenzbedingungen nach den bereits beschriebenen Kriterien in der Literatur. Zusätzlich wurde bedacht, die Ionenstärke konstant zu halten, sowie ein alternatives Cosolvens zu finden. DMSO erhöht zwar die Löslichkeit der Reaktanden erheblich, dennoch fiel auf, dass TMB bereits in geringen Konzentrationen (~1 mM) präzipitierte. Um rationale Modellvorhersagen jedoch zu realisieren, mussten alle Reaktanden löslich sein. Eng verwandt zu DMSO ist DMF und zeichnet sich durch bessere

Lösungseigenschaften aus (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde DMF als ein ebenfalls vollständig mit Wasser mischbares organisches Lösungsmittel eingesetzt. In der Literatur bewährten sich 30 % (v/v) DMSO. Der molare Anteil von 30 % (v/v) DMSO entspricht etwa 25 % (v/v) DMF. Um die Wirkung von DMSO und DMF zu vergleichen, wurden deshalb 25 % (v/v) DMF als Referenzwert eingesetzt. An dieser Stelle sei anzumerken, dass zunächst nur DMF als Lösungsvermittler eingesetzt und der Einfluss von DMSO erst in den Kapiteln 3.3.4 und 3.3.5 behandelt wird.

Tabelle 3.2: Definierte Referenzbedingungen für kinetische Messungen. Entweder DMSO oder DMF wurde als Cosolvens eingesetzt.

Referenzbedingung	Wert	Referenzbedingung	Wert
T_{ref} [°C]	25,0	*Fortsetzung*	
pH_{ref} [-]	8,50	$DMSO_{ref}$ [v/v]	30,0 %
I_{ref} [mM]	100	DMF_{ref} [v/v]	25,0 %

Unter den Referenzbedingungen erwies sich die BAL als hochselektiv. Durch Bestimmung des Enantiomerenüberschusses konnte gezeigt werden, dass der Enantiomerenüberschuss von (*R*)-TMB selbst nach 3 Tagen bei 99,9 % lag. Außerdem konnten keine Nebenprodukte im Reaktionsansatz nachgewiesen werden, weswegen Nebenreaktionen zu vernachlässigen waren. Die Untersuchungen wurden auch auf weitere Reaktionsbedingungen ausgeweitet. Es stellte sich heraus, dass selbst bei Bedingungen, die extremer waren als die in Kapitel 3.1.4, der Enantiomerenüberschuss nach 3 Tagen unverändert war.

3.1.3.1 Mechanistisches kinetisches Modell

In Kooperation mit M. Zavrel (BioVT, RWTH Aachen) wurde das mechanistische enzymkinetische Modell der BAL ermittelt. Dabei wurde der von Demir *et al.* vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (2001b) auf die Modellreaktion angewandt. Nach der Definition von Cleland (1963) handelt es sich bei der Modellreaktion um einen Bi-Uni-Mechanismus. Um zwischen dem erstbindenden und zweitbindenden Substrat zu unterscheiden, wurden sie mit *A* bzw. *B* benannt. Es wurde angenommen, dass die Isomerisierung und der Protontransfer sehr schnell ablaufen und deshalb nicht geschwindigkeitsbestimmend sind. Der Mechanismus besteht somit aus drei Elementarreaktionen Abbildung 3.6. Da die Gesamtreaktion reversibel ist, müssen auch alle Elementarreaktionen reversibel sein.

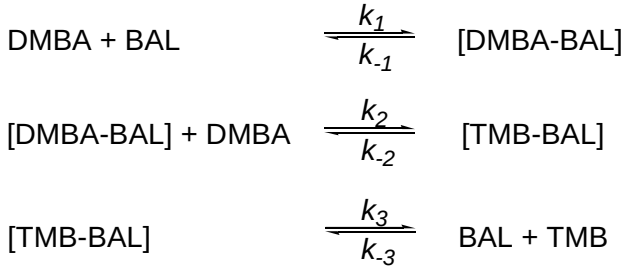


Abbildung 3.6: Elementarreaktionen der BAL-katalysierten Carboligation.

Ausgehend von den Elementarreaktionen wurde nach der Methode von King und Altman (1956) das mechanistische Modell entwickelt. Da die Substrate identisch sind, wurden deren Konzentrationen (A bzw. B) gleichgesetzt. Betont werden soll an dieser Stelle, dass die zu A und B gehörigen kinetischen Parameter nicht gleichgesetzt wurden:

$$v_I = -\frac{1}{2}\cdot\frac{dA}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat}\cdot E\cdot\left(A^2 - \frac{P}{K_{eq}}\right)}{K_{iA}\cdot K_{mB} + \left(K_{mB} + K_{mA}\right)\cdot A + A^2 + \frac{K_{iA}\cdot K_{mB}}{K_{mP}}\cdot P\cdot\left(1 + \frac{A}{K_{iB}}\right)} \qquad (3.4)$$

wobei v_I die Reaktionsrate (im Einphasensystem) und E, A und P jeweils die molaren Konzentrationen von BAL, DMBA und TMB bezeichnen. K_{mA} und K_{mB} bzw. K_{iA} und K_{iB} sind die Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten des erst- und zweitbindenden DMBA-Moleküls und K_{mP} bzw. K_{iP} die Bindungs- bzw. Dissoziationskonstante von TMB. k_{cat} stellt die Wechselzahl und K_{eq} die Gleichgewichtskonstante dar.

Gleichung (3.4) enthält 7 Makrogeschwindigkeitskonstanten, obwohl die Reaktion durch 6 Mikrogeschwindigkeitskonstanten k_i bestimmt ist (Abbildung 3.6). Dies deutet auf eine Redundanz im Modell hin. Nach der Methode von Straathof und Heijnen (1996) wurde der abhängige Parameter durch einen weiteren Zusammenhang als Funktion der 6 unabhängigen Parameter definiert:

$$K_{iB} = \frac{K_{mB}\cdot K_{iA}}{K_{mA}\cdot\left[1 - \left(\frac{K_{mA}}{K_{iA}} - 1\right)\cdot\frac{K_{mP}}{K_{eq}\cdot K_{mB}\cdot K_{iA}}\right]} \qquad (3.5)$$

Anschließend konnte anhand von *in silico*-Messungen gezeigt werden, dass die Parameter nicht identifizierbar waren. Folglich konnten sie nicht sicher geschätzt werden. Es stellte sich heraus, dass der eingeschränkte Messbereich wegen der schlechten Löslichkeit der Reaktanden nicht der Grund für die schlechten Schätzergebnisse war. Details sind in der entsprechenden Veröffentlichung nachzuschlagen (Zavrel *et al.*, 2008). Wenn Parameter nicht

identifizierbar sind, sollte das Modell vereinfacht werden, um sinnvolle Parameterwerte zu bestimmen. Um das mechanistische Modell zu bewahren, wurden zwei Annahmen auf Ebene der Elementarreaktionen getroffen:

$$k_1 = k_2 \tag{3.6}$$

$$k_{-1} = k_{-2} \tag{3.7}$$

Makrokinetisch führten diese Annahmen ebenfalls zu zwei Vereinfachungen, so dass nur noch vier unabhängige Parameter das vereinfachte mechanistische Modell beschrieben. In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass die Annahmen nicht gleichbedeutend dazu sind, dass die Bindungs- und Dissoziationskonstanten von A und B gleich sind. Stattdessen folgten daraus mathematische Zusammenhänge, wie sie in Tabelle 3.3 wiedergegeben sind. In der vorliegenden Arbeit wurden k_{cat}, $k_{cat,r}$, K_{mB} und K_{mP} als unabhängige Parameter gewählt. Alle anderen Parameter konnten durch sie ausgedrückt werden, d.h. bei ihnen handelte es sich um abhängige Parameter. Die Wahl fiel auf diese Parameter, weil erhofft wurde, dass sie einfach durch Reaktionsanfangsraten ermittelt werden können.

Tabelle 3.3: Physikalische Definitionen der Modellparameter.

Makrokonstante	Beziehung	Gleichung
K_{iA}	$\frac{2 \cdot k_{cat,r} \cdot K_{mB}}{2 \cdot k_{cat,r} + k_{cat}}$	(3.8)
K_{eq}	$\frac{k_{cat} \cdot K_{mP} \cdot \left(2 \cdot k_{cat,r} + k_{cat}\right)}{2 \cdot k_{cat,r}^2 \cdot K_{mB}^2}$	(3.9)
K_{mA}	$\frac{k_{cat} \cdot K_{mB}}{2 \cdot k_{cat,r} + k_{cat}}$	(3.10)

Da alle Elementarreaktionen mechanistisch richtig berücksichtigt wurden, sollte sich das Modell für die Beschreibung von Reaktionsverläufen eignen. Aufgrund der Empfehlung von Vasic-Racki (2003) sollten jedoch zuerst Reaktionsanfangsraten ausgewertet werden. Dem damit verbundenen Nachteil vieler Experimente steht der Vorteil isolierbarer Phänomene entgegen. Dieser Vorteil wurde in dieser Arbeit genutzt. Dafür musste das allgemeingültige Modell zunächst modifiziert werden. Bei Reaktionsanfangsraten gilt, dass der Umsatz sehr klein ist. Unter diesen Umständen kann angenommen werden, dass die Substratkonzentration konstant bleibt und kein Produkt entsteht. Unter diesen Bedingungen vereinfacht sich Gleichung (3.4) in die Teilreaktionen für Hin- (3.11) und Rückreaktion (3.12):

$$v_I = -\frac{1}{2}\cdot\frac{dA}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat}\cdot E\cdot A^2}{K_{iA}\cdot K_{mB} + \left(K_{mB} + K_{mA}\right)\cdot A + A^2} \tag{3.11}$$

$$v_I = -\frac{1}{2}\cdot\frac{dA}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{-\frac{k_{cat}\cdot K_{mP}}{K_{iA}\cdot K_{mB}\cdot K_{eq}}\cdot E\cdot P}{K_{mP} + P} \tag{3.12}$$

Da die Rückreaktion nur ein Substrat verwendet, ist die Michaelis-Menten-Gleichung für die Auswertung von Reaktionsanfangsraten dieser Teilreaktion anwendbar. Durch Einsetzen der Definitionen (3.8) und (3.9) wurde die Michaelis-Menten-Gleichung erhalten. Demnach ist der Faktor im Zähler, der nur aus kinetischen Parametern besteht, nichts anderes als die Wechselzahl der Rückreaktion $k_{cat,r}$.

3.1.3.2 Modellanpassung an Reaktionsanfangsraten

Die untersuchte Modellreaktion stellt einen Sonderfall dar, da zwei identische Substrate miteinander reagieren. Die Aufnahme klassischer Substratsättigungskurven, in denen ein Substrat variiert wird, während das zweite im Überschuss vorliegt, ist nicht möglich. In dieser Arbeit wurde deshalb die mechanistische Teilreaktion (3.11) direkt an die Substratsättigungskurve angepasst. Dazu wurden Reaktionsanfangsraten bei verschiedenen DMBA-Konzentrationen bestimmt (Abbildung 3.7). Die Auftragung der DMBA-Konzentration gegenüber der Aktivität ergab eine leicht sigmoide Form. Die Anpassung der Gleichung (3.11) stimmte gut mit den experimentellen Daten überein. Die Rückreaktion wurde ebenfalls untersucht. Die Wechselzahl der Carbolyse war kleiner als die der Carboligation. Da nur TMB gespalten wird, wies die Sättigungskurve einen klassischen hyperbolen Kurvenverlauf auf, der durch die Michaelis-Menten-Gleichung gut angepasst werden konnte. Verglichen wurde außerdem die Anpassung des Literaturmodells (Stillger *et al.*, 2006). Dieses konnte den sigmoiden Kurvenverlauf nicht widerspiegeln und wies deshalb eine schlechtere Modellgüte auf. Dies konnte insbesondere durch die Summe der Residuen erkannt werden. Sie lag bei 26,4 für die Anpassung des Literaturmodells, während die Restabweichung beim mechanistischen Modell nur 8,5 betrug.

Die kinetischen Parameter unter Referenzbedingungen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Genau geschätzt wurden $k_{cat,ref}$ und $K_{mB,ref}$. Zwar ließ sich $K_{mA,ref}$ nicht mit Genauigkeit bestimmen, jedoch ist die Kinetik der BAL bereits durch 4 Parameter vollständig bestimmt. Der schlecht geschätzte Wert von $K_{mA,ref}$ ist somit unnötig. Die Rückreaktion konnte gut charakterisiert und $k_{cat,r,ref}$ und $K_{mP,ref}$ genau geschätzt werden.

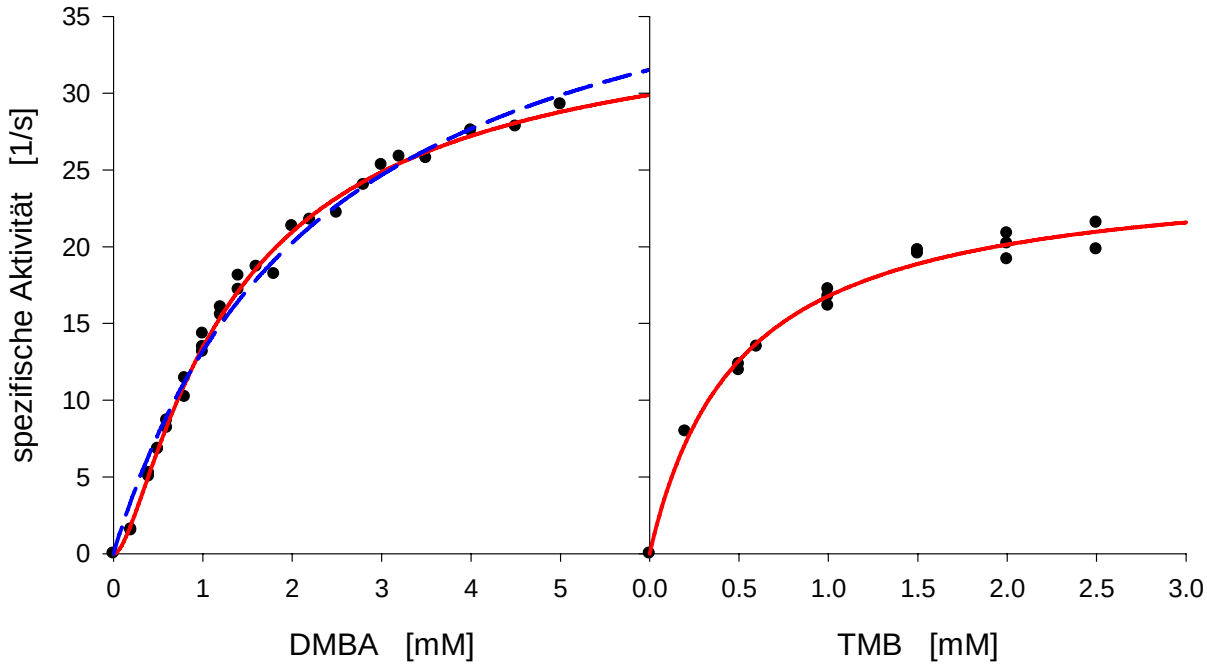


Abbildung 3.7: Reaktionsanfangsraten (●) und Anpassung des mechanistischen (—) bzw. des Literaturmodells (– – –).

3.1.3.3 Modellanpassung an Verlaufskurven und Beurteilung der Modellgüte

Anschließend wurde das Modell mit den identifizierten Startwerten für den technischen Einsatz an Verlaufskurven angepasst. Dabei wurde auch untersucht, wie genau die Modellparameter durch Reaktionsanfangsraten bestimmt werden konnten.

Dafür wurden sechs Verlaufskurven mit verschiedenen Substrat-, Produkt- und Enzym-anfangskonzentrationen gemessen. Nachdem im ersten Schritt die Passgüte des Modells nicht befriedigend war, wurde der sog. Selwyn-Test (Selwyn, 1965) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Enzymstabilität so gering war, dass mit fortschreitender Reaktionsdauer die Aktivität merklich abnahm (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde das Modell verfeinert. Die Inaktivierung wurde durch ein Gesetz erster Ordnung berücksichtigt:

$$\frac{dE}{dt} = -k_d \cdot E \qquad (3.13)$$

Die neue Modellstruktur wurde nun an die experimentellen Daten angepasst (Abbildung 3.8). Die Startkonzentrationen sind ebenfalls in den einzelnen Diagrammen angegeben. Die oberen 3 Versuche wurden mit DMBA als Substrat durchgeführt. In diesen Versuchen diente die Extinktion bei 325 nm als Messgröße. Man sieht, dass die Extinktion abnimmt und in ein Gleichgewicht läuft. Wurde TMB als Substrat vorgelegt (Abbildungen unten), so nahm die

Extinktion zu. Die Modellvorhersage war in allen Experimenten bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts sehr gut.

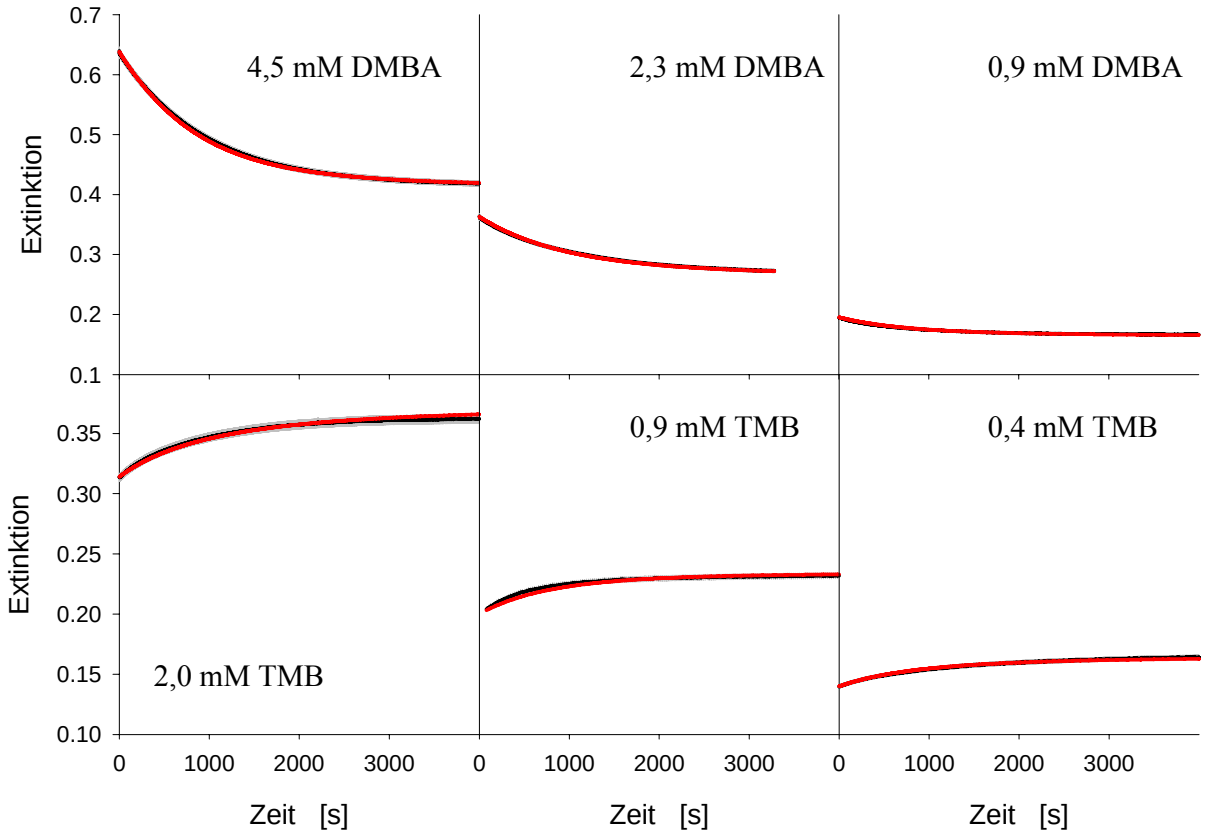


Abbildung 3.8: Modellanpassung (—) an Experimente (—) zur Modellidentifikation und Parameterschätzung.

Tabelle 3.4: Parameterschätzung aus der Analyse von Verlaufskurven und Reaktionsanfangsraten unter Referenzbedingungen.

Parameter	Verlaufskurven	Reaktionsanfangsraten	
	Mechanistisches Modell	Mechanistisches Modell	Literaturmodell
$k_{cat,ref}$	40,47 ± 0,15	36,51 ± 1,11	43,69 ± 1,61
$K_{mA,ref}$	-	0,361 ± 0,117	2,31 ± 0,167
$K_{mB,ref}$	1,020 ± 0,004	0,888 ± 0,037	-
$k_{cat,r,ref}$	23,06 ± 0,11	25,18 ± 0,69	25,18 ± 0,69
$K_{mP,ref}$	0,516 ± 0,004	0,501 ± 0,047	0,501 ± 0,047
$k_{d,ref}$	$(3{,}129 \pm 0{,}023)\cdot 10^{-4}$	-	-

Ebenso konnten die Modellparameter mit hoher Sicherheit bestimmt werden. Diese wurden den Werten aus der Reaktionsanfangsratenanalyse gegenübergestellt (Tabelle 3.4). Es zeigte sich, dass die Parameterwerte zwar unterschiedlich, im Rahmen der Fehlertoleranz jedoch vergleichbar waren. Insgesamt wies die dynamische Auswertung der Verlaufskurven geringere Standardabweichungen auf.

3.1.3.4 Zusammenfassung

Das vollständige mechanistische Modell musste vereinfacht werden, damit alle kinetischen Parameter bestimmt werden konnten. Als Erklärung dafür könnte die fehlende Unterscheidbarkeit der beiden Substrate angeführt werden: Viele Reaktionen, die auf dem gleichen Bi-Uni Mechanismus beruhen, verwenden unterschiedliche Substrate. Folglich liegen im Idealfall 3 Messgrößen vor, um 6 kinetische Parameter zu bestimmen. Im vorliegenden Fall hingegen sind die Substrate gleich. Es liegen nur eine Mess- (*A*) und eine Bilanzgröße (*P*) vor, um ebenfalls 6 Parameter zu bestimmen. Das Fehlen der weiteren Messinformation scheint der Grund für die schlechten Schätzergebnisse zu sein. Könnte zwischen dem erst- und dem zweitbindenden Substrat unterschieden werden, wären die Modellparameter mit großer Wahrscheinlichkeit identifizierbar. Deshalb wurde eine Modellvereinfachung getroffen. Diese Vereinfachung führte nicht dazu, dass die Bindungs- und Dissoziationskonstanten von A und B gleich sind. Obwohl A und B chemisch identisch sind, erscheint dieser Zusammenhang sinnvoll. Einerseits unterscheidet sich die Bindungsstelle am Enzym, wodurch chemische und sterische Unterschiede zu erwarten sind. Andererseits ist mit einer Veränderung der genannten Eigenschaften zu rechnen, nachdem das erste Molekül an das Enzym gebunden hat.

Reaktionsanfangsraten der Carboligation wurden bisher mit der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet (Hildebrand *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006). Bei der Reaktion handelt es sich jedoch um einen bimolekularen Mechanismus. Deshalb ist die Michaelis-Menten-Gleichung hier nicht anwendbar und eignet sich nicht für die Vorhersage des sigmoiden Verlaufs der Messdaten. Die bekannten Modelle (Hildebrand *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006) beinhalten außerdem keine unabhängigen Bindungskonstanten für die beiden Substrate. $K_{mA,ref}$ scheint deshalb ein Anpassungswert ohne physikalische Bedeutung und $k_{cat,ref}$ wurde überschätzt. Zudem führte die Annahme einer unimolekularen Reaktion (Stillger *et al.*, 2006) zu einer falschen Definition der Gleichgewichtskonstante. Als Konsequenz werden bei verschiedenen Anfangskonzentrationen von DMBA oder TMB unterschiedliche Gleichgewichtskonstanten ermittelt. Mit anderen Worten ist ein solches Modell nur für ein kleines Konzentrationsintervall gültig und daher nicht zu empfehlen. Im Gegensatz dazu wurde hier das mechanistische Modell direkt an die Messdaten angepasst. Dadurch konnten alle kinetischen Parameter bestimmt werden. Die Parameterwerte unterschieden sich kaum von denen, die durch Verlaufskurven ermittelt wurden. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Reaktionsanfangsraten in Kombination mit dem mechanistischen Modell sich

eigneten, gute Startwerte für die technische Anwendung zu identifizieren. Dies war vor allem für weitere Untersuchungen interessant und wurde entsprechend angewandt.

3.1.4 Einflussfaktoren auf den Reaktionsverlauf der BAL

Um die Produktausbeute der enzymatischen Reaktion zu maximieren, stehen verschiedene Wege offen. Naheliegend wäre die Enzymkonzentration zu erhöhen. Häufig steht der Katalysator aber nicht unlimitiert zur Verfügung, ist teuer oder wie im Fall der BAL nicht kommerziell erhältlich. Hier können durch richtige Einstellung der Temperatur, des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Lösungsvermittlerkonzentration hohe Erträge erzielt werden. Häufig beeinflussen die genannten Faktoren nicht nur die Aktivität, sondern auch die Reaktionsstabilität und das thermodynamische Gleichgewicht von Enzymen. Bisher wurde lediglich die Maximalgeschwindigkeit der BAL bei verschiedenen pH-Werten (Domínguez de María *et al.*, 2006; Janzen *et al.*, 2006; Stillger *et al.*, 2006) und die Lagerstabilität bei einigen Temperaturen (Janzen *et al.*, 2006), pH-Werten (Janzen *et al.*, 2006; Stillger *et al.*, 2006) und DMSO-Konzentrationen (Domínguez de María *et al.*, 2006; Janzen *et al.*, 2006) ermittelt. Ob durch die genannten Faktoren Bindungs- oder Gleichgewichtskonstanten beeinflusst waren, wurde nicht untersucht. Um den gesamten Reaktionsverlauf für eine technische Anwendung vorherzusagen, reichen deshalb die verfügbaren Informationen nicht aus.

In einer mehrstufigen experimentellen Analyse wurde dem entgegengetreten: Zuerst wurde untersucht, welche kinetischen Parameter durch Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und der DMF-Konzentration beeinflusst sind. Nach deren Identifikation, wurde ermittelt, durch welche thermodynamischen Beziehungen die beeinflussten Parameter beschrieben werden können. Aus diesen Beziehungen wurde ein thermodynamisches Modell entwickelt. Ziel der Modellierung war es, eine Funktion der kinetischen Parameter in Abhängigkeit der Einflussfaktoren zu bestimmen:

$$k_{cat}, k_{cat,r}, K_{mB}, K_{mP}, k_d = f(T, pH, I, DMF) \tag{3.14}$$

Damit die thermodynamischen Gleichungen einfach mit dem kinetischen Modell gekoppelt werden konnten, beinhalteten die einzelnen Gleichungen als gemeinsamen Bezugspunkt stets die Kinetik unter Referenzbedingungen v_{ref}. Eine Abweichung von den Referenzbedingungen kann man sich in einem n-dimensionalen Raum mit den Dimensionen *v*, *T*, *I*, *pH* und *DMF* vorstellen, indem vom Ursprung weg entlang der entsprechenden Dimension(en) gewandert wird (Abbildung 3.9).

Die Modellgüte wurde anschließend beurteilt, indem die Modellanpassung mit einer Reihe von Experimenten verglichen wurde. In diesen Experimenten wurde jeweils ein Einflussfaktor variiert und Verlaufskurven gemessen, während die restlichen bei Referenzbedingungen

konstant gehalten wurden. Durch die Modellanpassung an diese Experimente wurden die thermodynamischen Modellparameter geschätzt. Um auch zuverlässige Vorhersagen des Reaktionsverlaufs zu gewährleisten, wenn mehr als ein Einflussfaktor variiert wird, wurde das Modell unter solchen Gegebenheiten validiert.

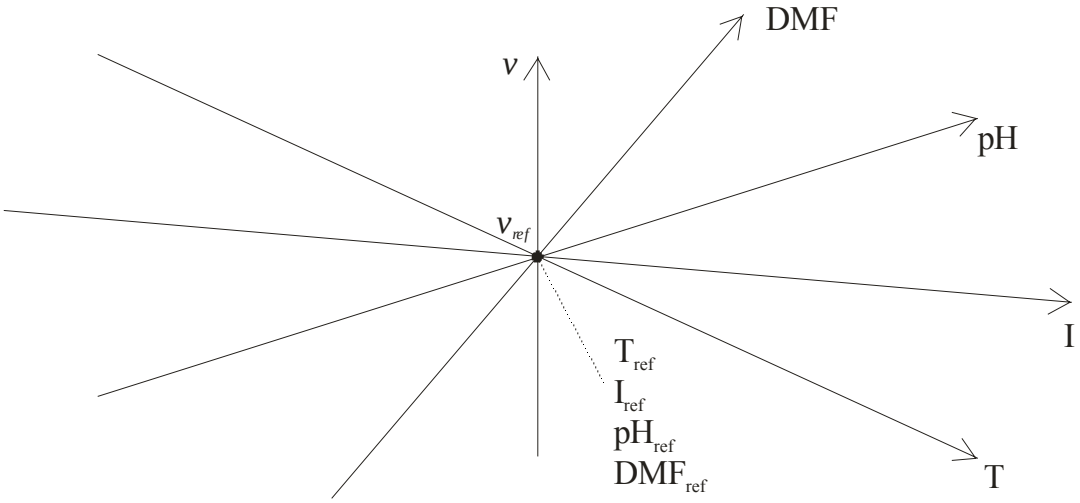


Abbildung 3.9: Strategie und gemeinsamer Bezugspunkt der thermodynamischen Modellierung im 5-dimensionalen Raum.

3.1.4.1 Sensitivität der kinetischen Parameter

Eine Maxime in der Reaktionstechnik ist, dass Modelle so einfach wie möglich sein sollen. Aus diesem Grund wurde allem voran untersucht, durch welche kinetischen Parameter der Reaktionsverlauf im untersuchten Konzentrationsbereich signifikant beeinflusst wird.

Im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse wurde jeder kinetische Parameter um + 50 % variiert. Anhand der Simulationsergebnisse kann der Einfluss der individuellen Modellparameter auf den gesamten Reaktionsverlauf untersucht werden. In Abbildung 3.10 ist zu erkennen, dass der Reaktionsverlauf durch alle Parameter beschrieben wird. k_{cat} und K_{mB} beeinflussen den gesamten Reaktionsverlauf, während $k_{cat,r}$ und K_{mP} erst nach und nach eine Auswirkung zeigen. Auffallend ist, dass verschiedene Gleichgewichtslagen erreicht werden. Dieser Sachverhalt kann durch die Definition des Gleichgewichtskoeffizienten erklärt werden. K_{eq} ist ein Summenparameter, der die kinetischen Konstanten k_{cat}, $k_{cat,r}$, K_{mP} und K_{mB} beinhaltet (vgl. Gleichung (3.9)). Aus den Ergebnissen der Sensitivitätsanalyse wurde der Schluss gezogen, dass alle kinetischen Parameter berücksichtigt werden müssen, um genaue Modellvorhersagen zu liefern.

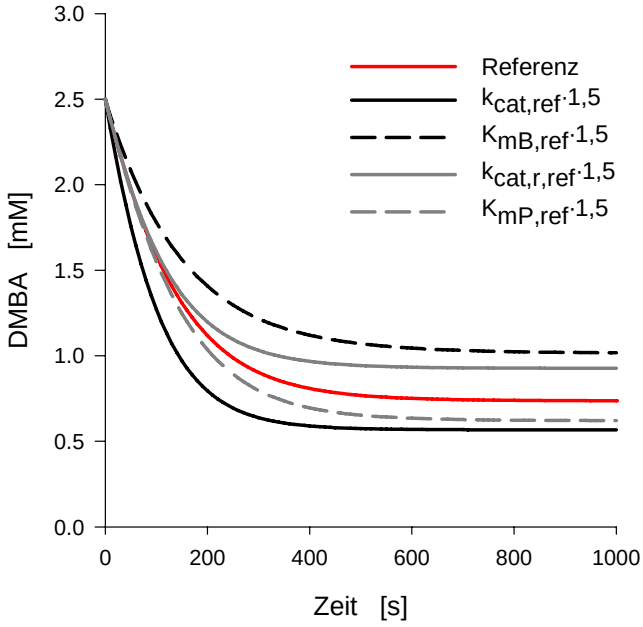


Abbildung 3.10: Sensitivitätsanalyse der kinetischen Parameter. *In silico*-Versuche unter Referenzbedingungen (—) und Verlaufskurven, die durch Variation der einzelnen Parameterwerte um jeweils + 50 % vorhergesagt wurden (Graustufen).

3.1.4.2 Identifikation und Modellierung der thermodynamischen Phänomene

Um zu ermitteln, welche kinetischen Parameter durch Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und DMF-Konzentration beeinflusst werden, wurden zunächst Reaktionsanfangsraten bei variierenden Einflüssen gemessen. Aus den so erhaltenen Sättigungskurven wurden anschließend die kinetischen Parameter durch nichtlineare Regression bestimmt. Als Ergebnis wurden kinetische Parameter in Abhängigkeit eines Einflussfaktors erhalten. Dabei gab die Änderung der Parameter einen Hinweis auf den funktionalen Zusammenhang zwischen den Parametern und den variierenden Einflussfaktoren (Bspw. exponentieller Anstieg).

Zunächst wurde die Temperatur zwischen 15 und 40°C variiert und für jede Temperatur jeweils eine Sättigungskurve für Hin- und Rückreaktion aufgenommen. Die daraus bestimmten kinetischen Parameter sind in Abbildung 3.11 gezeigt. Sowohl k_{cat} als auch $k_{cat,r}$ stiegen mit zunehmender Temperatur. Auch die Bindungskonstante von DMBA und TMB stieg, was darauf hinweist, dass die Affinität beider Reaktanden zum Enzym sank. Die halblogarithmische Darstellung über 1/T lässt einen linearen Zusammenhang erkennen.

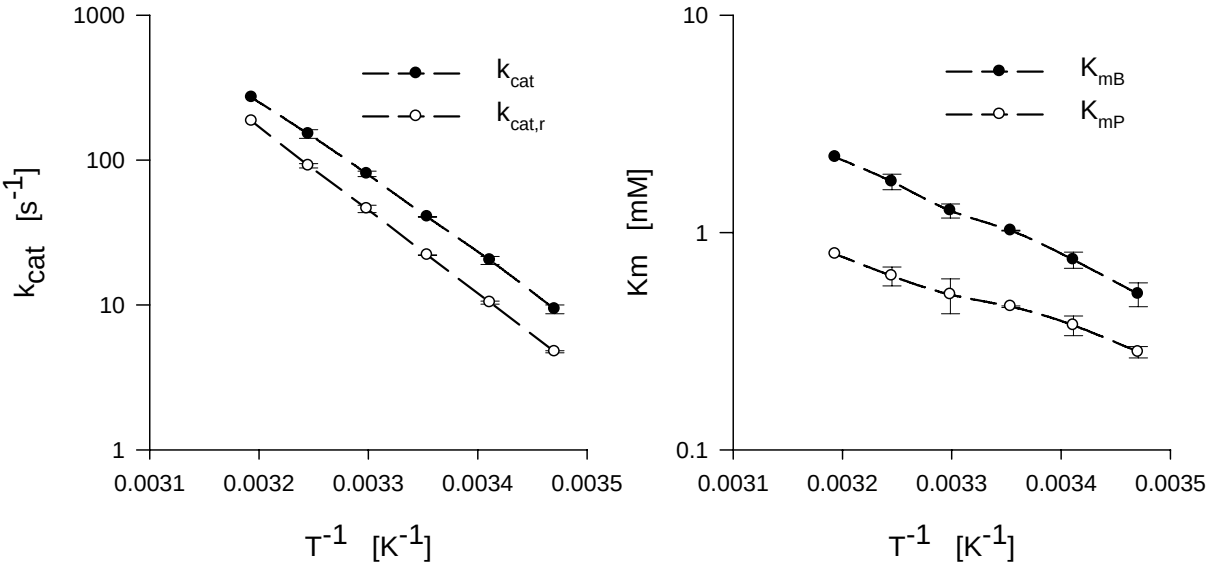


Abbildung 3.11: Temperatureinfluss auf die kinetischen Parameter.

Der Anstieg von k_{cat} und $k_{cat,r}$ wurde mit den folgenden Gleichungen beschrieben (Flaschel, 2006, abgewandelt):

$$k_{cat}(T) = k_{cat,ref} \cdot \exp\left[\frac{-E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \tag{3.15}$$

$$k_{cat,r}(T) = k_{cat,r,ref} \cdot \exp\left[\frac{-E_{a,r}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \tag{3.16}$$

wobei E_a die Aktivierungsenergie der Carboligation, $E_{a,r}$ die Aktivierungsenergie der Carbolyse, R die Allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur ist.

Analog lässt sich der Anstieg von K_{mB} und K_{mP} beschreiben:

$$K_{mi}(T) = K_{mi,ref} \cdot \exp\left[\frac{-\Delta G_i^0}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \tag{3.17}$$

wobei $K_{mi,ref}$ die Bindungskonstante bei der Referenztemperatur und ΔG_i^0 die freie Standardenthalpie von *i* sind.

Gleichungen (3.15) – (3.17) wurden an die entsprechenden Daten angepasst. Durch nichtlineare Regression gelang es, die thermodynamischen Modellparameter zu bestimmen (Daten nicht gezeigt). Wurden jedoch gesamte Reaktionsverläufe ausgewertet, so deutete die *Software*-gestützte statistische Analyse hohe Korrelationen zwischen den zu bestimmenden Parametern an. Als Folge hoher Korrelationen werden Parameter meist schlecht geschätzt,

obwohl das Modell die experimentellen Daten gut wiedergibt. Wahrscheinlich war das schlechte Schätzergebnis darauf zurückzuführen, dass die experimentellen Daten nicht ausreichten. Hier spielte jedoch die Anwendung eine größere Rolle, als die exakte Modellierung aller thermodynamischen Phänomene. Um möglichst viel TMB zu gewinnen, waren nur hohe DMBA-Startkonzentrationen von Interesse. Vor diesem Hintergrund wurden keine weiteren Experimente durchgeführt, sondern das Modell vereinfacht. Diese Maßnahme ist im Einklang mit einer Maxime in der Reaktionstechnik: Ein Modell sollte so einfach wie möglich sein.

Da die thermodynamischen Modellparameter E_a und $E_{a,r}$ sowie ΔG_B^0 und ΔG_P^0 in der gleichen Größenordnung waren, wurden diese Werte vereinfachend gleichgesetzt. Dies führte zu den folgenden Zusammenhängen:

$$K_{mB}(T) \sim K_{mP}(T) \tag{3.18}$$

$$k_{cat}(T) \sim k_{cat,r}(T) \tag{3.19}$$

Damit reduzierten sich die zu schätzenden Konstanten um die Hälfte. Die Modellgüte war annähernd gleich und die *Software*-gestützte statistische Auswertung ergab, dass die thermodynamischen Konstanten kaum korreliert und somit mit guter Präzision geschätzt wurden.

Zuletzt war der Einfluss der Temperatur auf die Enzymstabilität zu modellieren. In diesem Zusammenhang wurde angenommen, dass der Inaktivierungskoeffizient k_d mit steigender Temperatur exponentiell zunimmt und folgender Gesetzmäßigkeit gehorcht (Flaschel, 2006, abgewandelt):

$$k_d(T) = k_{d,ref} \cdot \exp\left[\frac{-E_{i,T}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \tag{3.20}$$

wobei $E_{i,T}$ die Inaktivierungsenergie ist.

Die bestimmten kinetischen Parameter in Abhängigkeit der Ionenstärke, des pH-Werts und der DMF-Konzentration sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Da die Enzymkonzentration in den Experimenten ungenau war, konnten k_{cat} und $k_{cat,r}$ nicht sicher ermittelt werden. Die Bindungskonstanten jedoch sind unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration. Es zeigte sich, dass K_{mB} zwischen 0,880 und 1,191 mM schwankte. Zum Teil war der Schätzfehler sehr klein. Das liegt daran, dass hier auch die Bindungskonstanten aus Kapitel 3.1.3.3 eingegliedert wurden, die anhand von Verlaufskurven bestimmt wurden. Bei den anderen, die durch Reaktionsanfangsraten ermittelt wurden, waren die Standardabweichungen jedoch eher groß, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die Zahl der Experimente auf das nötigste reduziert wurde, um dem anwendungsorientierten Anspruch gerecht zu werden. K_{mP} konnte

insgesamt besser bestimmt werden. Keiner der untersuchten Parameter änderte sich systematisch, wenn eine Bedingung variiert wurde. Deshalb und unter Berücksichtigung der Fehlergenauigkeit wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass sowohl K_{mB} als auch K_{mP} unabhängig von Ionenstärke, pH-Wert und DMF-Konzentration waren.

Tabelle 3.5: Einfluss von Ionenstärke, pH-Wert und DMF-Konzentration auf K_{mB} und K_{mP}. Nicht gemessene Werte sind mit - bezeichnet.

Variierter Einflussfaktor	Wert	K_{mB} [mM]	K_{mP} [mM]
Ionenstärke [mM]	50	0,914 ± 0,075	0,524 ± 0,054
	100	1,020 ± 0,004	0,516 ± 0,004
	200	1,020 ± 0,136	0,409 ± 0,053
	300	-	0,456 ± 0,028
	400	0,880 ± 0,040	-
pH-Wert [-]	6,5	-	0,530 ± 0,131
	7,8	1,143 ± 0,455	-
	8,5	1,020 ± 0,004	0,516 ± 0,004
	9,3	1,141 ± 0,396	-
	10,5	1,132 ± 0,126	0,514 ± 0,020
DMF [% (v/v)]	5	0,963 ± 0,230	-
	10	0,904 ± 0,218	0,501 ± 0,032
	15	1,068 ± 0,274	-
	20	1,191 ± 0,174	-
	25	1,020 ± 0,004	0,516 ± 0,004
	30	1,033 ± 0,185	-

Weitere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass auch die Gleichgewichtlage konstant blieb, wenn obige Faktoren verändert wurden. Diese Daten sind an dieser Stelle nicht explizit gezeigt, allerdings stand diese Annahme im Einklang mit den gemessenen Gleichgewichtslagen der Verlaufskurven, die in Kapitel 3.1.4.3 dargestellt werden. Somit folgte:

$$K_{eq}, K_{mB}, K_{mP}(I, pH, DMF) = konst. \tag{3.21}$$

Aus diesen Ergebnissen konnten weitere mathematische Schlussfolgerungen gezogen werden und machten die Notwendigkeit überflüssig, weitere Reaktionsanfangsraten zu messen, um k_{cat} und $k_{cat,r}$ zu ermitteln. Aus Gleichung (3.9) folgte unter der Annahme (3.21):

$$k_{cat}(I, pH, DMF) \sim k_{cat,r}(I, pH, DMF) \tag{3.22}$$

Die mathematische Modellierung der Einflussfaktoren Ionenstärke, pH-Wert und DMF-Konzentration beschränkte sich somit nur noch auf einen Parameter. Dies war entweder k_{cat} oder $k_{cat,r}$. Im Folgenden Fall wurde k_{cat} gewählt, während $k_{cat,r}$ der Proportionalitäts-bedingung gehorchte.

Um den Einfluss der Ionenstärke auf die Aktivität der BAL zu modellieren, wurde folgende Beziehung (z.B. Dale and White, 1983; Hiyama und Okada, 1977; Kossekova, 1989; abgewandelt) verwandt:

$$k_{cat}(I) = k_{cat,ref} \cdot 10^{C_I \cdot \left(\sqrt{I} - \sqrt{I_{ref}}\right)} \tag{3.23}$$

wobei C_I eine Konstante ist, die das Produkt aus Z_A, Z_B und 1,02 darstellt (Dale und White, 1983). Z_A und Z_B sind die elektrostatischen Ladungen der Reaktionspartner. Da sie nicht bestimmbar waren, wurden sie zu diesem Summenparameter zusammengefasst. Um zu beurteilen, ob die Stabilität der BAL von der Ionenstärke beeinflusst wird, wurde das Enzym bei verschiedenen Ionenstärken inkubiert und nach verschiedenen Zeiten die Restaktivität ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die so gemessene zeitliche Abnahme der Aktivität konnte durch einen Zerfall erster Ordnung beschrieben werden. Die Halbwertszeit der BAL war in allen Fällen gleich, woraus gefolgert wurde, dass die Stabilität unabhängig von der Ionenstärke war:

$$k_d(I) = k_{d,ref} \tag{3.24}$$

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Wechselzahl wird dem Ionisationszustand von ionischen Seitengruppen zugeschrieben, der durch die Ionisationskonstante pKs_i charakterisiert ist. Deshalb wurde die folgende Gleichung gewählt (Frey und Hegeman, 2007; Marangoni, 2003; Nemeria *et al.*, 2007; Taylor, 2002; Yang *et al.*, 1993, abgewandelt):

$$k_{cat}(pH) = k_{cat,ref} \cdot \frac{1 + 10^{pKs_1 - pH_{ref}} + 10^{pH_{ref} - pKs_2}}{1 + 10^{pKs_1 - pH} + 10^{pH - pKs_2}} \tag{3.25}$$

wobei pKs_1 die Säurekonstante einer Seitenkette und pKs_2 die Säurekonstante einer anderen Seitenkette bezeichnet. Es ist bekannt, dass der pH-Wert auch die Stabilität der BAL beeinflusst. Häufig ist auch eine glockenförmige Stabilitätskurve als Funktion des pH-Wertes zu finden. Nach Janzen *et al.* (2006) ist die BAL instabil im alkalischen Bereich und stabil im neutralen Bereich. Erst im schwach sauren Bereich beginnt die Stabilität wieder abzunehmen. Für die Synthese ist dieser Bereich jedoch uninteressant, da die Aktivität dort sehr gering ist (Domínguez de María *et al.*, 2006). In dem Restbereich konnte eine Gleichung angewendet

werden, die bspw. auch für die Penicillin G Acylase Verwendung fand (Kheirolomoom *et al.*, 1998, abgewandelt):

$$k_d(pH) = k_{d,ref} \cdot \exp\left[\frac{E_{i,pH}}{R} \cdot \left(\frac{1}{pH_{ref}} - \frac{1}{pH}\right)\right] \tag{3.26}$$

wobei $E_{i,pH}$ die Inaktivierungsenergie ist, die durch den pH-Wert auftritt.

Ein organisches Lösungsmittel kann die Enantioselektivität (Klibanov, 2003), Stabilität (Klibanov, 2001), Affinität (Halling, 1994) und Aktivität (Klibanov, 1997) in nicht vorhersagbarer Weise beeinflussen. Deshalb konnte der Einfluss von DMSO bzw. DMF nicht ohne Vorwissen mathematisch beschrieben werden. Hier wurde sich ausschließlich auf den Aktivitätsverlauf gestützt, der aus der Auswertung von Reaktionsanfangsraten resultierte (Daten nicht gezeigt). Demnach stieg die Aktivität zunächst. Bei einer Konzentration von etwa 15 % DMF lag die höchste Aktivität vor. Anschließend sank die Aktivität drastisch ab. Beschreiben konnte diesen Verlauf eine modifizierte Gaußfunktion:

$$k_{cat}(DMF) = k_{cat,ref} \cdot \exp\left[-C_{DMF} \cdot \left(\left(DMF - DMF_{\max}\right)^2 - \left(DMF_{ref} - DMF_{\max}\right)^2\right)\right] \tag{3.27}$$

wobei C_{DMF} den Modellparameter des DMF-Modells und DMF_{max} diejenige DMF-Konzentration bezeichnet, bei der maximale Aktivität vorliegt. Um zu ermitteln, ob die Stabilität der BAL von der DMF-Konzentration beeinträchtigt wird, wurde das Enzym verschiedenen DMF-Konzentrationen ausgesetzt und nach verschiedenen Zeiten die Restaktivität bestimmt. Die Aktivität nahm in allen Fällen exponentiell ab (Daten nicht gezeigt). Die daraus ermittelten Halbwertszeiten unterschieden sich. Es schien, als wäre die BAL stabiler ohne DMF. Andererseits wies die BAL auch eine große Halbwertszeit bei relativ hohen DMF-Konzentrationen auf. Insgesamt waren die Unterschiede jedoch verhältnismäßig gering. Eine Temperaturerhöhung von 2,5°C führte zur gleichen Stabilitätsminderung wie die Differenz aus kleinster und größter gemessener Halbwertszeit in DMF. Nicht zuletzt vor dem Hintergrund, ein einfaches Modell für die technische Anwendung zu entwickeln, wurde deshalb der Stabilitätsunterschied durch DMF vernachlässigt:

$$k_d(DMF) = k_{d,ref} \tag{3.28}$$

Alle thermodynamischen Gleichungen wurden in der Weise formuliert, dass der jeweilige Referenzparameterwert auf der rechten Seite als Produkt vorkam. In Gleichung (3.27) beispielsweise wurde der Referenzparameterwert $k_{cat,ref}$ verwendet, um die Änderung von k_{cat} zu beschreiben. Auf diese Weise konnte das kinetische Modell folgendermaßen mit den thermodynamischen Gleichungen gekoppelt werden:

$$k_{cat} = k_{cat,ref} \cdot \prod_n \frac{k_{cat}(n)}{k_{cat,ref}} \tag{3.29}$$

$$k_{cat,r} = k_{cat,r,ref} \cdot \prod_n \frac{k_{cat,r}(n)}{k_{cat,r,ref}} \tag{3.30}$$

$$K_{mB} = K_{mB,ref} \cdot \prod_n \frac{K_{mB}(n)}{K_{mB,ref}} \tag{3.31}$$

$$K_{mP} = K_{mP,ref} \cdot \prod_n \frac{K_{mP}(n)}{K_{mP,ref}} \tag{3.32}$$

$$k_d = k_{d,ref} \cdot \prod_n \frac{k_d(n)}{k_{d,ref}} \tag{3.33}$$

wobei *n* die Einflussfaktoren Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und DMF-Konzentration bezeichnet.

3.1.4.3 Beurteilung der Modellgüte

Ob die Gleichungen (3.15) - (3.33) tatsächlich geeignet sind, die Reaktionsverläufe der BAL-katalysierten Carboligation vorherzusagen, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurden Enzymreaktionen durchgeführt, in denen jeweils ein Einflussfaktor variiert wurde, während die restlichen bei Referenzbedingungen konstant gehalten wurden. Die gesamte Reaktion wurde bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts verfolgt. An alle diese Kurvenverläufe wurde das kombinierte Modell simultan angepasst. Die Anpassungsergebnisse und die tatsächlich gemessenen Werte werden nacheinander für verschiedene Temperaturen, Ionenstärken, pH-Werte und DMF-Konzentrationen präsentiert.

Die Temperatur wurde zwischen 20 und 55°C im Intervall von 5°C variiert. Bei allen untersuchten Temperaturen war die Vorhersagegenauigkeit des Modells bis zum Erreichen der Gleichgewichtslage gut (Abbildung 3.12). Entsprechend der Modellvorhersage stieg die Reaktionsrate mit steigender Temperatur. Gleichzeitig wurde das thermodynamische Gleichgewicht zu Seiten von DMBA verschoben, wodurch bei hohen Temperaturen geringere TMB-Konzentrationen gebildet wurden. Beide Effekte führten dazu, dass bei hohen Temperaturen die Reaktion schnell abgelaufen war.

Abbildung 3.13 stellt die Messungen und die Modellvorhersage bei verschiedenen Ionenstärken gegenüber. Die Modellgüte war in allen Experimenten gut. Es stellte sich heraus, dass die Reaktion bei der niedrigsten Ionenstärke am schnellsten abgeschlossen war. Daraus kann gefolgert werden, dass die höchste Aktivität bei der niedrigsten Ionenstärke

vorlag. Mit steigender Ionenstärke sank die Reaktionsrate. Die Gleichgewichtslage war nicht beeinflusst.

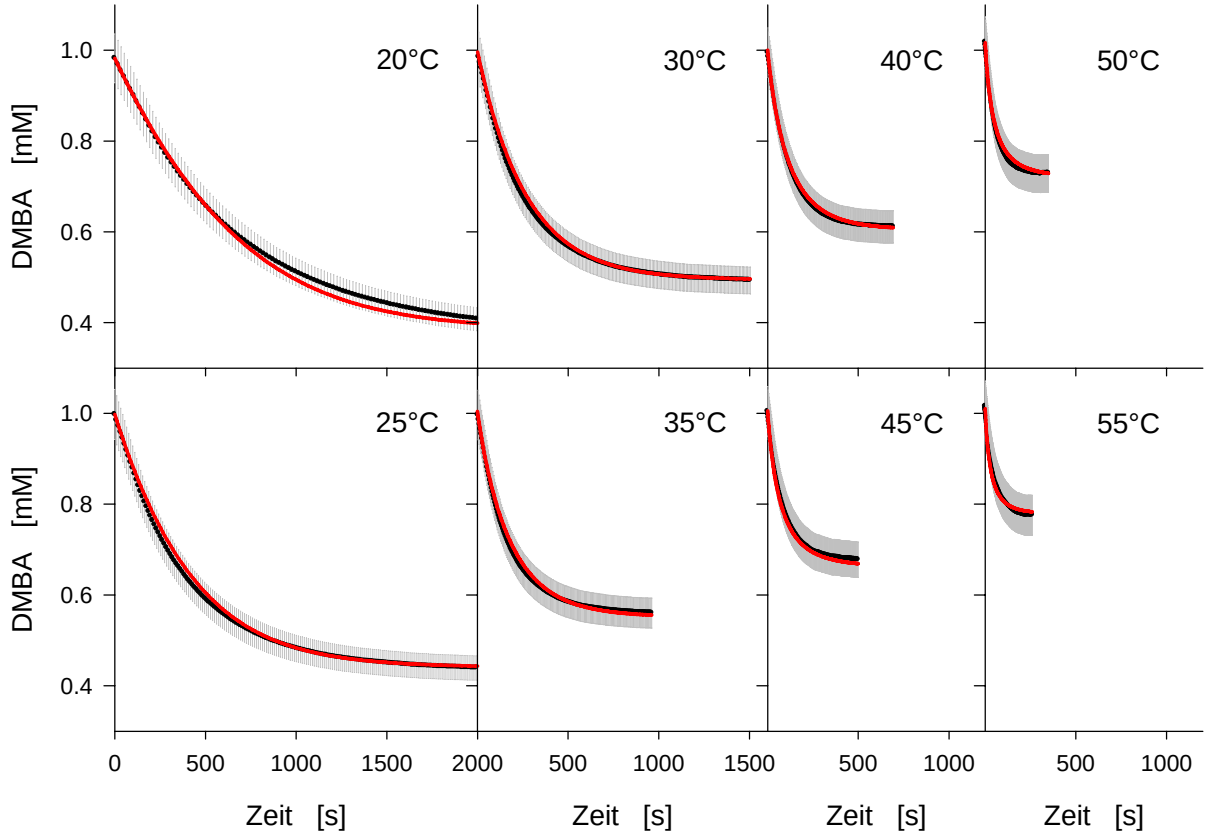


Abbildung 3.12: Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsverlauf. Modellvorhersage (—) und experimentelle Daten (—) mit Messfehler (grau) im DMSO-System.

Die Modellanpassung an pH-Experimente sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Modellgüte war auch hier bei allen pH-Werten gut. Die Reaktionsrate nimmt ab pH 7,2 mit steigendem pH-Wert zu. Die kürzeste Reaktionsdauer und somit die schnellste Reaktion wurde bei pH 9,0 gemessen. Bei alkalischeren pH-Werten nahm die Reaktionsrate wieder ab. Bei pH 10,4 war die Gleichgewichtslage am Ende der Reaktion anders als bei allen anderen untersuchten pH-Werten. Da der pH-Wert das thermodynamische Gleichgewicht an sich nicht beeinflusst, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die BAL bei diesem pH-Wert sehr stark inaktiviert wurde und somit die Reaktion nicht bis zum thermodynamischen Gleichgewicht ablief. Der Verlauf bei pH 10,1 war zum Ende der Reaktion vergleichsweise schlecht. Entweder war das Modell hier unpassend oder das Experiment nicht sorgfältig durchgeführt. Da im Mittel die Modellgüte einwandfrei war und Differenzen zwischen einem Modell und der Realität nie ganz beseitigt werden können, wurde auf weitere Experimente verzichtet.

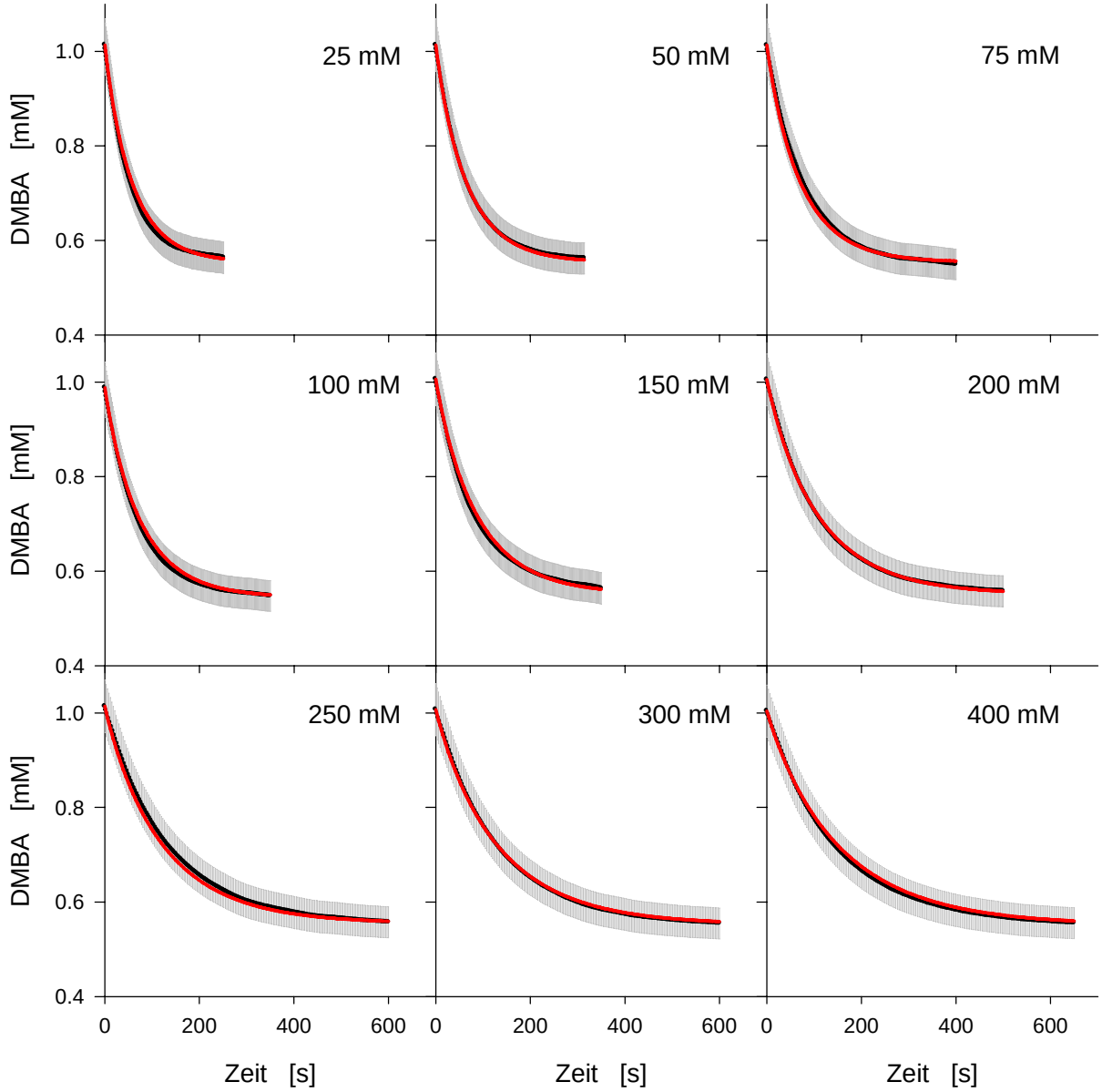


Abbildung 3.13: Einfluss der Ionenstärke auf den Reaktionsverlauf (—) mit Messfehler (grau) und Modellvorhersage (—). Die Ionenstärke wurde mit KPi eingestellt.

Verlaufskurven in Abhängigkeit der DMF-Konzentration sind in Abbildung 3.15 gezeigt. Die Aktivität der BAL war bei kleinen DMF-Konzentrationen hoch, wobei sie bis 15 % DMF leicht zunahm. Die schnellste Reaktion wurde bei 15 - 20 % DMF gemessen. Anschließend wurde die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender DMF-Konzentration sukzessive langsamer. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Reaktionsanfangsraten-versuche überein. Das mathematische Modell beschrieb die experimentellen Daten über den gesamten Reaktionsverlauf mit recht guter Genauigkeit.

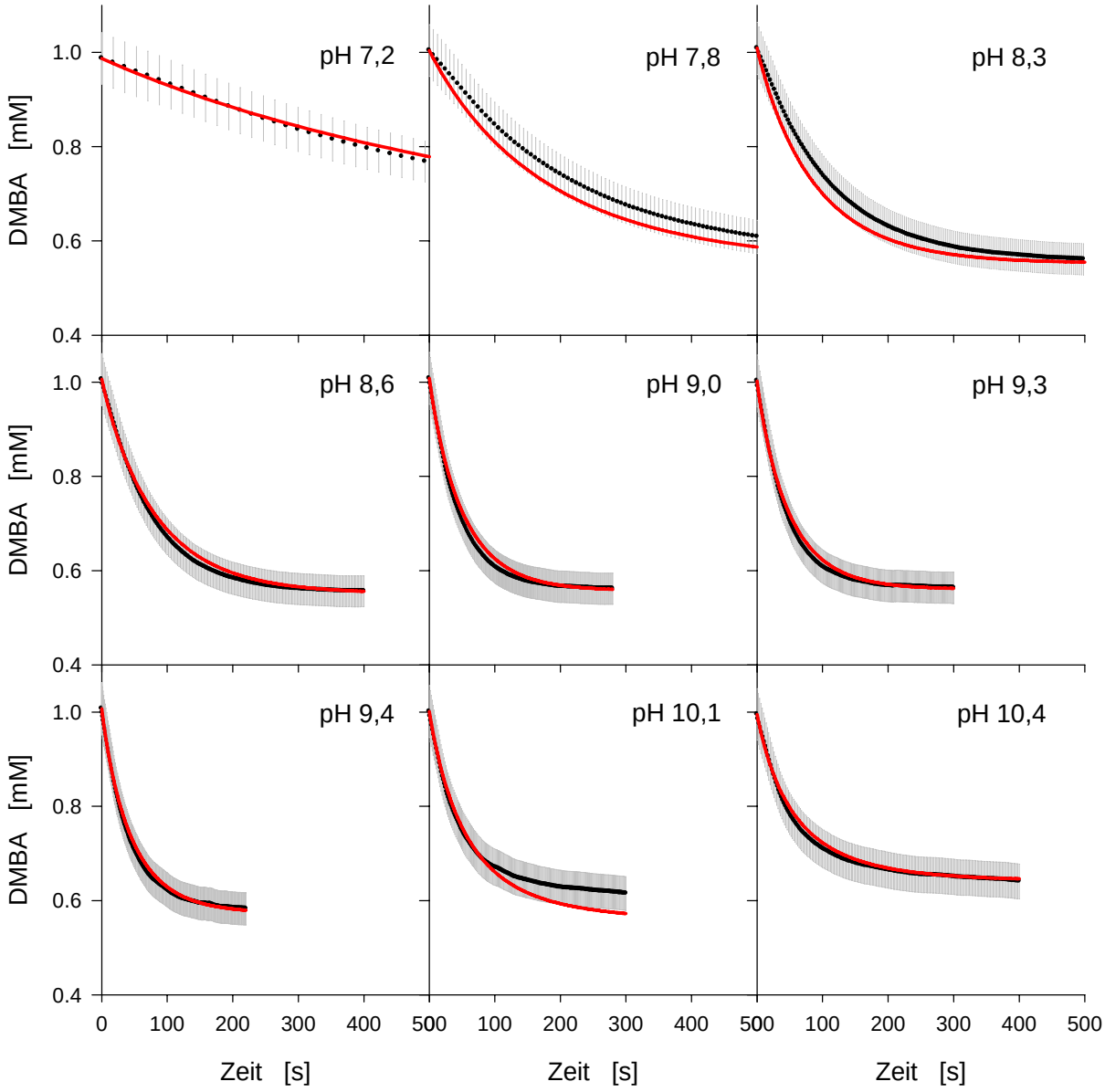


Abbildung 3.14: Einfluss des pH-Wertes auf den Reaktionsverlauf (—) mit Messfehler (grau) und Modellanpassung (—).

Um auch zuverlässige Vorhersagen des Reaktionsverlaufs zu gewährleisten, wenn mehr als ein Einflussfaktor variiert wird, wurde das Modell unter solchen Gegebenheiten validiert. Hierzu wurden alle Reaktionsbedingungen willkürlich variiert. Die Freiheitsgrade waren Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und DMF-Konzentration. Die resultierenden Experimente und die entsprechenden Modellvorhersagen von 6 Versuchen sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass das kombinierte Modell in der Lage war, alle Experimente unter den untersuchten Bedingungen mit großer Genauigkeit vorherzusagen. Dabei war die Vorhersagequalität durchgehend gut. Dies bedeutete einerseits, dass alle signifikanten

Phänomene in geeigneter Weise berücksichtigt wurden. Beispielsweise wurde ein inaktivierender Einfluss der Ionenstärke und der DMF-Konzentration vernachlässigt. Diese Annahme stützte sich auf Lagerstabilitätsmessungen. Obwohl angemerkt werden sollte, dass die Reaktionsdauer eher kurz war um geringe Unterschiede in der Enzymstabilität zu messen, bekräftigte nichtsdestotrotz die gute Modellvorhersage diese Annahme. Andererseits eröffnete sich nun die Möglichkeit verschiedene Szenarien zu simulieren. Nach Vasic-Racki *et al.* (2003) trägt ein Prozessmodell dazu bei, den Prozess zu verstehen und optimale Prozessbedingungen zu finden. Dabei reduziert die mathematische Berechnung die Zahl von aufwändigen Experimenten und spart auf diese Weise Zeit und Geld.

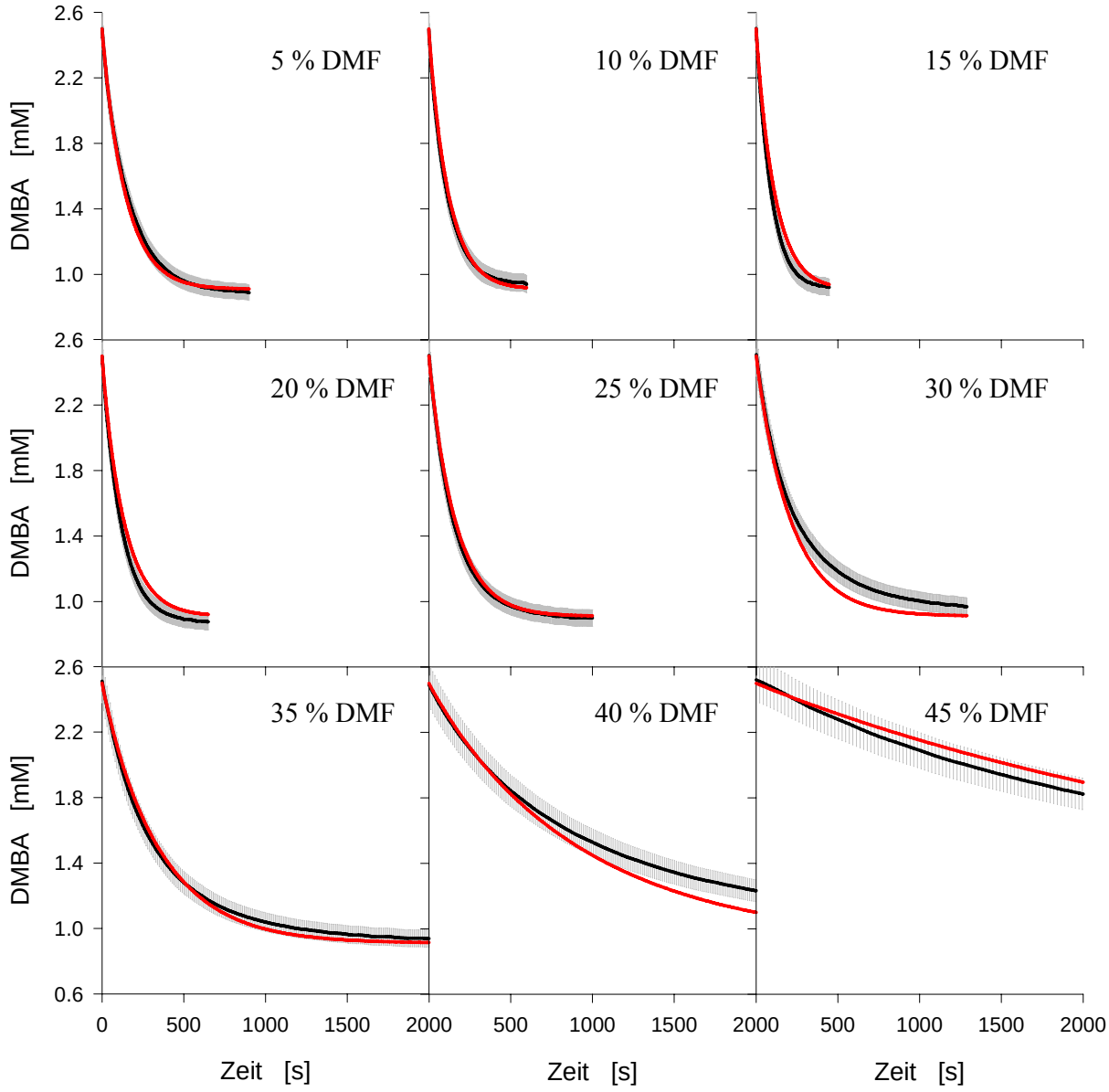


Abbildung 3.15: Modellvorhersage (—) und gemessene Werte (—) inklusive Messfehler (grau) gesamter Reaktionsverläufe bei verschiedenen DMF-Konzentrationen.

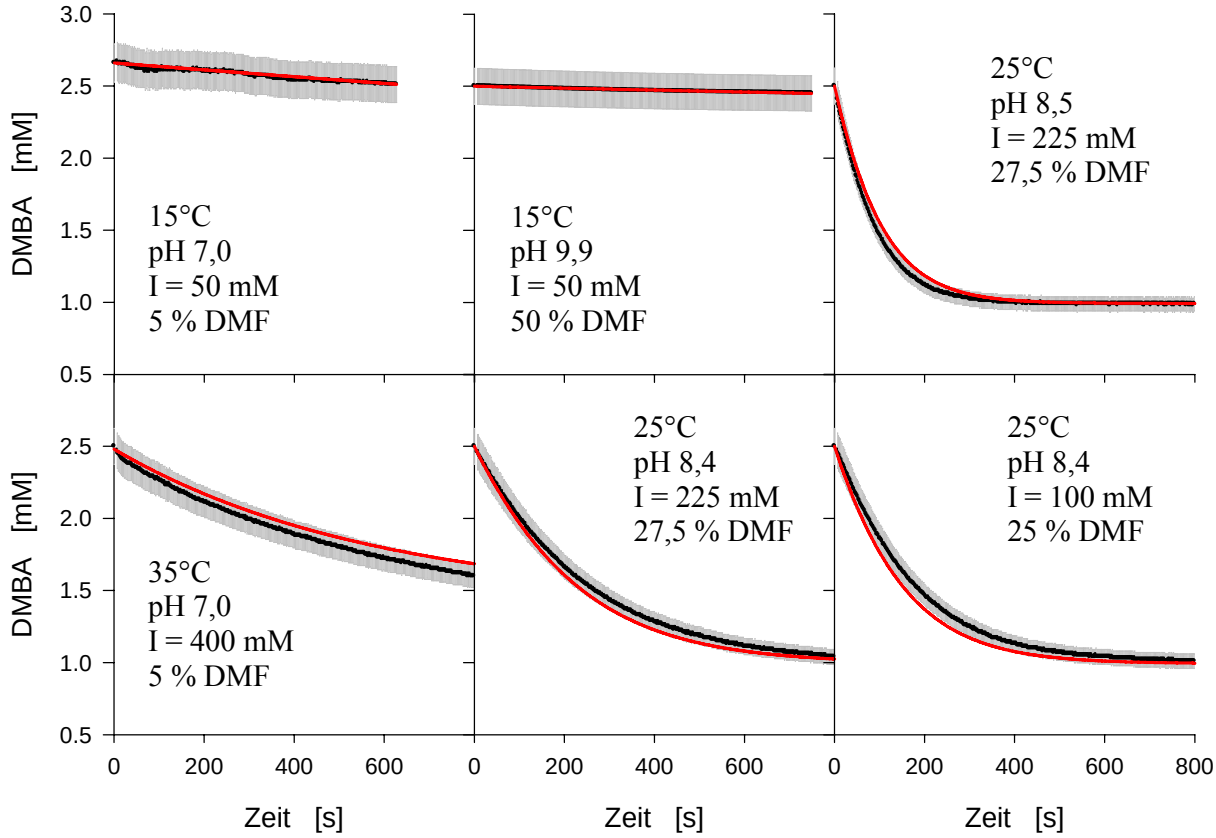


Abbildung 3.16: Validierung des Gesamtmodells. Gemessene (—) und simulierte (—) Reaktionsverläufe. Der Messfehler wurde als Standardabweichung grau eingezeichnet.

3.1.4.4 Bestimmung der thermodynamischen Modellparameter

Die thermodynamischen Modellparameter wurden in einer dynamischen Parameterschätzung durch Anpassung an die Experimente in Kapitel 3.1.4.3 mit Ausnahme der Validierungsversuche ermittelt. Um die Parameterschätzung statistisch zu beurteilen, wurde die Korrelationsmatrix analysiert. Diese gibt die Korrelation zwischen zwei Parametern an. Werte nahe 1 oder -1 deuten starke Korrelationen an. Unter diesen Umständen sind diese zwei Parameter nicht unabhängig voneinander zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass die meisten Parameter kaum korreliert waren. Allerdings wiesen drei Parameter hohe Korrelationen mit anderen auf. Diese Korrelationen entstanden dadurch, dass sich ein physikalischer Effekt gleichzeitig und in ähnlichem Ausmaß (positiv oder negativ) auf den Reaktionsverlauf auswirkt. Unter diesen Umständen konnten die Auswirkungen nicht isoliert voneinander betrachtet werden. Beispielsweise wiesen ΔG_B^0 und E_a einen relativ hohen Wert nahe 1 auf. Ebenso waren die beiden Modellparameter des DMF-Modells relativ stark korreliert. Die dritte explizit aufgeführte und auch größte Korrelation lag zwischen pKs_2 und $E_{i,pH}$ mit dem Wert 0,924 vor. Im basischen Bereich wirkten sich beide Parameter stark

auf den Reaktionsverlauf aus. Während pKs_2 die Wechselzahlen drückte, erniedrigte $E_{i,pH}$ die aktive Enzymkonzentration. Beide Effekte resultierten in einer Reduktion der Reaktionsrate. Der einzige Unterschied besteht darin, dass $k_{cat} \cdot E$ im ersten Fall von Beginn der Reaktion an niedrig ist und im zweiten Fall erst während der Reaktion sinkt (zeitabhängig).

Während die zuerst beschriebenen Korrelationen noch akzeptabel waren, wurden weitere Versuche durchgeführt, um die größte Korrelation zu beseitigen. Das Ziel der weiteren Experimente war es, die Auswirkungen der beiden Submodelle, die pKs_2 und $E_{i,pH}$ beherbergten, unterschiedlich zu gewichten. Dies gelang dadurch, dass die Enzymkonzentration variiert wurde. Hohe Enzymkonzentrationen führten zu schnellen Reaktionen, wodurch die zeitabhängige Inaktivierung in den Hintergrund rückte. Niedrige Enzymkonzentrationen hingegen betonten die Inaktivierung, da die Reaktion lange dauerte, bis das Gleichgewicht erreicht wurde. So konnte durch drei weitere Versuche bei pH = pKs_2 die Korrelation erfolgreich auf einen guten Wert von 0,673 gedrückt werden (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Korrelationsmatrix der geschätzten Modellparameter nach den zusätzlichen Versuchen. *Vor den zusätzlichen Versuchen lag der Wert bei 0,924.

E_a	1								
$E_{i,T}$	-0,266	1							
ΔG_B^0	0,790	-0,636	1						
C_I	0,004	-0,011	-0,013	1					
pKs_1	-0,083	-0,082	-0,030	0,068	1				
pKs_2	0,025	0,119	0,020	-0,030	-0,418	1			
$E_{i,pH}$	0,012	0,112	0,017	-0,014	0,221	0,673*	1		
C_{DMF}	0,018	0,024	-0,004	0,008	-0,152	0,057	0,029	1	
DMF_{max}	0,008	0,018	-0,008	0,007	-0,087	0,026	0,010	0,825	1
	E_a	$E_{i,T}$	ΔG_B	C_I	pKs_1	pKs_2	$E_{i,pH}$	C_{DMF}	DMF_{max}

Auch die Modellparameter änderten sich nach den Zusatzexperimenten. Letztendlich konnten diese ohne Ausnahme mit großer Sicherheit geschätzt werden. Die Werte sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Thermodynamische Parameterwerte aus Anpassung an Reaktionsverläufe nach den optimalen Versuchen. Startwerte wurden durch Reaktionsanfangsraten ermittelt. *Vor den optimalen Versuchen war pKs_2 = 10,641 ± 0,037 und $E_{i,pH}$ = 1,447 ± 0,031 kJ·mol^{-1}.

Submodell	Parameter	Startwerte	Optimale Werte
Temperatur	$E_a = E_{a,r}$ [kJ·mol^{-1}]	121,83	119,43 ± 0,88
	$\Delta G_B^0 = \Delta G_P^0$ [kJ·mol^{-1}]	70,51	77,40 ± 1,03
	$E_{i,T}$ [kJ·mol^{-1}]	-	299,99 ± 1,55
Ionenstärke	C_I [-]	-1,87·10^{-2}	(-1,905 ± 0,029)·10^{-2}
pH-Wert	pKs_1 [-]	7,82	8,382 ± 0,007
	pKs_2 [-]	10,71	10,283 ± 0,027*
	$E_{i,pH}$ [kJ·mol^{-1}]	-	1,291 ± 0,018*
DMF	C_{DMF} [(%, v/v)$^{-2}$]	4,22·10^{-3}	(3,65 ± 0,02)·10^{-3}
	DMF_{max} [%, v/v]	15,4	14,8 ± 0,1

Im Folgenden werden die Untersuchungen auf zwei verschiedene wässrig-organische Zweiphasensysteme ausgeweitet.

3.1.5 Kinetik der BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen

Neben einem Cosolvens kann die Löslichkeit der hydrophoben Reaktanden durch ein wasserunmischbares Lösungsmittel erhöht werden. In diesem Fall bildet sich ein wässrig-organisches Zweiphasensystem aus. Das Enzym wird dabei durch Stofftransport über die Phasengrenzfläche mit dem Substrat versorgt.

Zuerst wurden organische Lösungsmittel mit potentiell guten Lösungseigenschaften in Kooperation mit M. Peters (RWTH Aachen, ITMC) und M. Zavrel (RWTH Aachen, BioVT) identifiziert. Auf die Vorgehensweise wird hier nicht eingegangen, sie ist aber ausführlich in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung beschrieben (Peters *et al.*, 2008). Nach diesen Ergebnissen eignete sich Hexan weniger, wohingegen MIBK ausgezeichnete Lösungseigenschaften aufweisen sollte. Insbesondere da diese Studie nicht die

Enzymstabilität berücksichtigte, wurden beide Lösungsmittel untersucht. Aber auch andere Gründe führten dazu, Hexan nicht vorab zu eliminieren. Beispielsweise mochte die Substratkonzentration wegen eines ungünstigen Verteilungsgleichgewichts zwischen MIBK und Wasser in der reaktiven Phase zu gering sein, um hohe Reaktionsraten zu erzielen.

Um die Eignung der identifizierten Lösungsmittel für biokatalytische Reaktionen zu testen, wurden zunächst die Enzymstabilität und anschließend die Verteilung sowie der Stofftransport untersucht. Anschließend wurde eine Modellstruktur für das reaktive Zweiphasensystem entworfen. Da die in Kapitel 3.1.3 identifizierte enzymkinetische Gleichung nicht zwangsläufig in den wässrig-organischen Zweiphasensystemen gültig sein muss (Halling, 1994; Klibanov, 1997), wurde die intrinsische Enzymkinetik direkt in beiden Zweiphasensystemen neu bestimmt. Um zu gewährleisten, dass die Modellgüte für die Vorhersage gesamter Reaktionsverläufe gut ist, wurde das Modell an Verlaufskurven evaluiert. Abschließend wurde die Problematik diskutiert, inwieweit die Messungen durch den Stofftransport maskiert und damit die Ergebnisse verfälscht wurden. Für die Versuche in diesem Kapitel und dessen Unterkapiteln wurden ausnahmslos die Referenzbedingungen beibehalten (siehe Tabelle 3.2).

3.1.5.1 Enzymstabilität im Zweiphasensystem

Es ist bekannt, dass sich die Lager- und Prozessstabilität der BAL unterscheidet. Deshalb konnte die Lagerstabilität nicht genutzt werden, um Aussagen über die Stabilität während der Reaktion zu treffen. Allerdings war es durchaus möglich, Stabilitätsunterschiede zu beurteilen. Deshalb wurde die Restaktivität der BAL gemessen, nachdem sie unterschiedlich lange in den jeweiligen Zweiphasensystemen inkubiert wurde. Um zwischen molekularer und Phasentoxizität zu unterscheiden, wurden Messungen ohne Lösungsmittel, mit Lösungsmittel-gesättigtem Puffer und im Zweiphasensystem durchgeführt. Da der Reaktorinhalt umgepumpt werden musste, um die Reaktanden zu quantifizieren, wurde außerdem untersucht, ob die Pumpe die Stabilität der BAL beeinflusst. Die Aktivitätsabnahme in allen Experimenten folgte einem Zerfall erster Ordnung in der Enzymkonzentration analog Gleichung (3.13). In Tabelle 3.8 sind die Messergebnisse zusammengefasst.

In Versuch A wurde der kleinste Inaktivierungskoeffizient ermittelt. Die Unterschiede zwischen den Inaktivierungskoeffizienten B - F waren statistisch nicht signifikant, so dass die Stabilität in diesen Versuchen konstant war. Aus der Differenz von A und B wurde geschlossen, dass das Umpumpen der wässrigen Phase die BAL stark schädigt. Hierzu wurde eine Membranpumpe verwendet, wodurch die hohe mechanische Belastung wahrscheinlich dazu führte, dass das Enzym relativ instabil war. Die Pumpe diente der rationalen Prozessentwicklung. Die Frage, ob in der späteren technischen Anwendung keine oder eine andere Pumpe eingesetzt werden sollte, muss in weiteren Anwendungen erörtert werden. Da B und C bzw. B und E identisch waren, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass eine

molekulare Toxizität weder von Hexan noch von MIBK ausgeht. Da C und D bzw. E und F keinen Unterschied aufwiesen, wurde gefolgert, dass keine Phasentoxizität von dem Lösungsmittel zu erwarten war. Außerdem scheinen sich Hexan und MIBK hinsichtlich der Enzymtoxizität ähnlich zu verhalten, da C und E bzw. D und F gleich waren. Zusammenfassend konnte kein negativer Einfluss der Lösungsmittel auf die Stabilität der BAL festgestellt werden. Aus dieser Sicht eigneten sich beide Lösungsmittel gleichermaßen. Abgesehen von den beschriebenen Konsequenzen wurde eine interessante Auffälligkeit beobachtet. In Kapitel 3.1.3.3 wurde im gepumpten Reaktor und unter Reaktionsbedingungen ein Inaktivierungskoeffizient von $(3{,}129 \pm 0{,}023)\cdot10^{-4}$ s^{-1} gemessen. Die Lagerstabilität im gepumpten Reaktor betrug jedoch nur $(8{,}51 \pm 0{,}93)\cdot10^{-5}$ s^{-1}. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Stabilität der BAL durch Anwesenheit der Reaktanden beinahe um den Faktor 4 vermindert wird. Da bekannt ist, dass Benzaldehyd mit Aminofunktionen Schiff'sche Basen bildet und zur Inaktivierung mancher Enzyme führt (Biselli *et al.*, 2002), könnte dies eine Erklärung für diese Beobachtung darstellen.

Tabelle 3.8: Lagerstabilität der BAL in An- und Abwesenheit der organischen Phase. $Puffer_{[Hexan]}$ bzw. $Puffer_{[MIBK]}$ bedeutet, dass die wässrige Phase mit Hexan bzw. MIBK gesättigt wurde.

Versuch	Wässrige Phase	Organische Phase	Gepumpt	k_d [s^{-1}]
A	Puffer	-	Nein	$(4{,}66 \pm 0{,}52)\cdot10^{-6}$
B	Puffer	-	Ja	$(8{,}51 \pm 0{,}93)\cdot10^{-5}$
C	$Puffer_{[Hexan]}$	-	Ja	$(9{,}81 \pm 1{,}21)\cdot10^{-5}$
D	$Puffer_{[Hexan]}$	Hexan	Ja	$(8{,}85 \pm 1{,}24)\cdot10^{-5}$
E	$Puffer_{[MIBK]}$	-	Ja	$(8{,}32 \pm 0{,}88)\cdot10^{-5}$
F	$Puffer_{[MIBK]}$	MIBK	Ja	$(8{,}22 \pm 0{,}40)\cdot10^{-5}$

3.1.5.2 Verteilung und Stofftransport

Es wurde angenommen, dass die Puffersalze und die BAL vollständig in der wässrigen Phase verbleiben. DMBA und TMB verteilten sich hingegen zwischen den Phasen entsprechend ihres Gleichgewichtskoeffizienten. Aber auch der Lösungsvermittler DMF kann in der organischen Phase löslich sein und dahin übergehen. In Kapitel 3.1.4.2 wurde gezeigt, dass die Kinetik der BAL von der DMF-Konzentration abhängig ist. Um reproduzierbare DMF-

Konzentrationen in der reaktiven Phase einzustellen, wurde deshalb zunächst die Verteilung von DMF gemessen. Zwischen MIBK und Puffer ist der Verteilungskoeffizient bis etwa 15 % (v/v) DMF konstant. Dann ist die Verteilung stark nicht-linear (Daten in Tabelle 2.10). Um konstant 25 % (v/v) DMF in Puffer einzusetzen, mussten zusätzlich 2,56 % (v/v) DMF in MIBK gelöst werden. In Hexan konnte DMF nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde angenommen, dass DMF ausschließlich in der wässrigen Phase löslich ist.

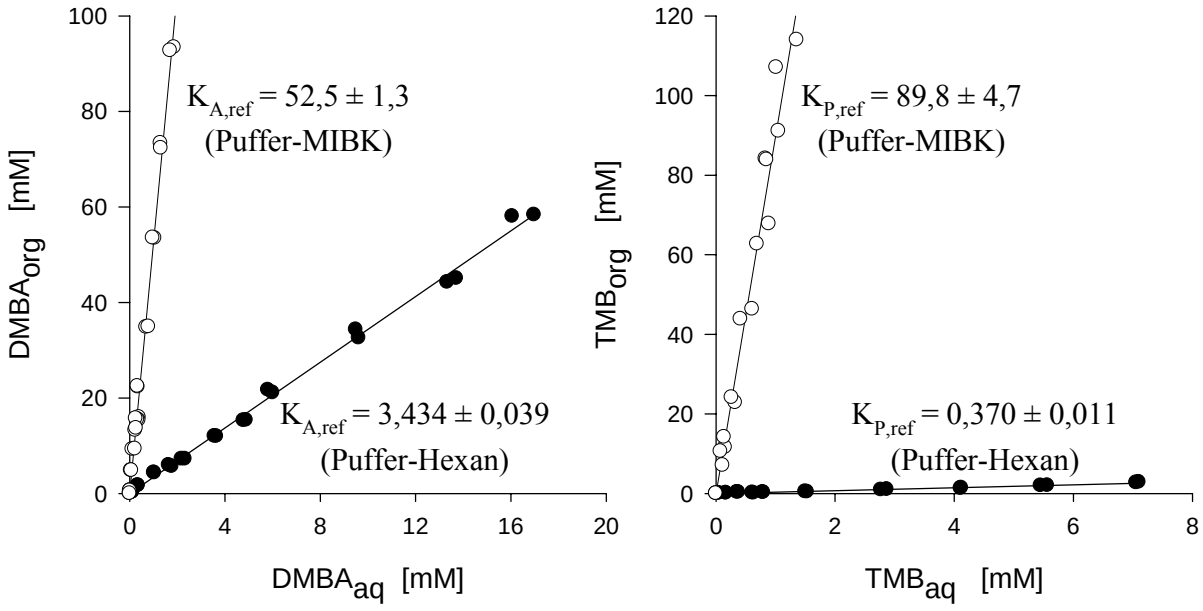


Abbildung 3.17: Verteilung von DMBA und TMB in den wässrig-organischen Zweiphasensystemen Puffer-Hexan und Puffer-MIBK.

Theoretisch kann der Verteilungskoeffizient von DMBA und TMB direkt aus Stofftransportversuchen ermittelt werden. Da diese Experimente jedoch aufwändiger waren, war es nur möglich eine sehr begrenzte Anzahl von Versuchen durchzuführen, was zu einer geringeren statistischen Sicherheit führte. Deswegen wurde der Verteilungskoeffizient getrennt ermittelt und bei den Auswertungen der Stofftransportversuche vorgegeben. Die Verteilung von DMBA und TMB ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die Verteilung beider Stoffe war im untersuchten Konzentrationsbereich linear. In Puffer-Hexan lag DMBA vermehrt in der organischen Phase vor, während TMB eher in der wässrigen Phase vorgefunden wurde. In Puffer-MIBK hingegen wurden sowohl sehr hohe DMBA- als auch TMB-Konzentrationen in der organischen Phase gemessen. Die Verteilungskoeffizienten in MIBK waren etwa um den Faktor 15 bei DMBA bzw. 240 bei TMB größer als in Hexan. Diese Beobachtung stützte die *a priori*-Kalkulationen mit Cosmo-RS (Peters *et al.*, 2008), die im Zuge der erwähnten Kooperation durchgeführt wurden. Aus den Ergebnissen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass MIBK ein weitaus größeres Extraktionsvermögen als Hexan hat. Da die einsetzbare Maximalkonzentration an DMBA durch die Löslichkeit in der

wässrigen Phase beschränkt wurde (≤ 25 mM), war auch aus dieser Sicht MIBK attraktiver, weil es eine höhere DMBA-Dichte zuließ.

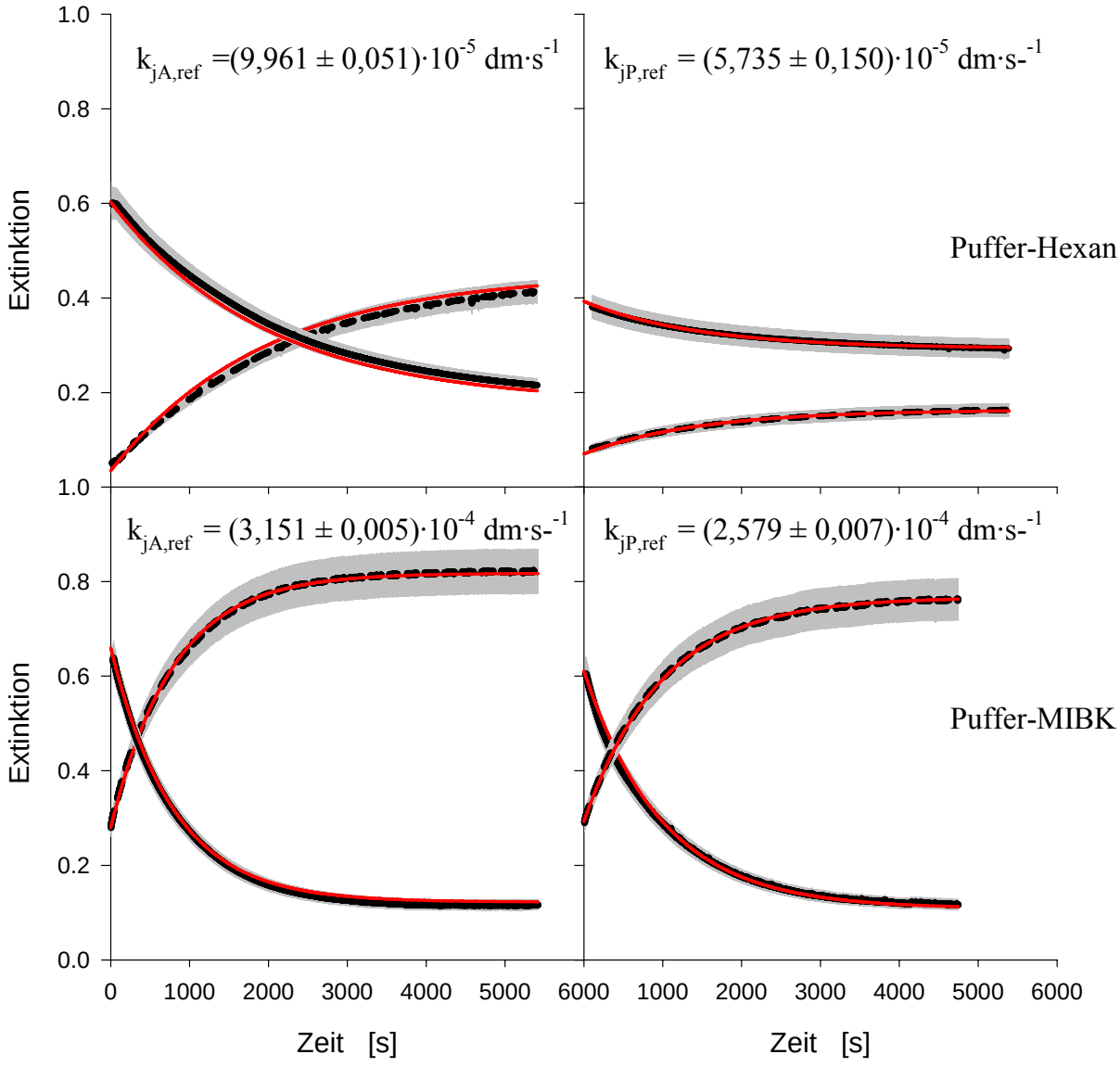


Abbildung 3.18: Gemessener Stofftransport (schwarz) von DMBA (links) und TMB (rechts) über die Phasengrenzfläche des Zweiphasensystems Puffer-Hexan (oben) und Puffer-MIBK (unten). Anpassung des Stofftransportmodells (rote Linie) an die Extinktion in wässriger (durchgezogene Linie) und organischer Phase (gestrichelte Linie) zur Bestimmung der Stoffdurchgangskoeffizienten von DMBA $k_{jA,ref}$ und TMB $k_{jP,ref}$.

Ausgehend von den Verteilungskoeffizienten wurde der Stofftransport von DMBA und TMB in beiden Zweiphasensystemen gemessen. Insgesamt wurden 6 (Puffer-Hexan) bzw. 8 (Puffer-MIBK) Versuche ausgewertet. Exemplarisch ist jeweils eine Messung gezeigt (Abbildung 3.18). Aus den Messungen wurden die jeweiligen Stoffübergangskoeffizienten

geschätzt, die ergänzend in die Abbildung eingefügt sind. Der Stofftransportkoeffizient wirkt sich vor allem zu Beginn des Experiments aus, während die Gleichgewichtslage durch den Verteilungskoeffizienten bestimmt wird. Da zum Schluss die Modellvorhersage gut war, kann gefolgert werden, dass die statisch ermittelten Gleichgewichtskoeffizienten gut bestimmt wurden. Auch der dynamische Bereich konnte gut durch das Stofftransportmodell beschrieben und folglich die Transportkoeffizienten sicher bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass $k_{jA,ref}$ generell größer als $k_{jP,ref}$ war. Dies wurde dadurch erklärt, dass DMBA etwa halb so groß wie TMB ist und deshalb einen geringeren Widerstand bei der Diffusion durch die Grenzschicht erfährt. Weiterhin wurde beobachtet, dass der Stofftransportkoeffizient in Puffer-MIBK generell größer war. Eine Erklärung dafür könnte der Einfluss des Lösungsmittels auf die Dicke der Grenzschicht sein. Weitere Schlüsse zu ziehen, wäre an dieser Stelle jedoch zu hypothetisch und physikalisch tiefschürfende Erkenntnisse waren nicht das Ziel dieser Arbeit.

3.1.5.3 Entwicklung eines mathematischen Modells für Zweiphasensysteme

Ein mathematisches Modell wurde für wässrig-organische Zweiphasensysteme entwickelt. Es sollte sowohl auf ansatzweise als auch auf kontinuierliche Betriebsweisen anwendbar sein. Dabei sollte es keine Rolle spielen, ob eine Enzymreaktion stattfindet, oder das Modell nur dazu benutzt wird, um den isolierten Stofftransport in Abwesenheit des Katalysators zu ermitteln. Das Modell sollte demnach für die in Abbildung 3.19 gezeigten Fälle universell einsetzbar sein und wird im Folgenden am Beispiel einer kontinuierlichen Reaktionsführung entwickelt:

Die Massenbilanz berücksichtigt die wässrige und organische Phase. Beide Phasen wurden vor jedem Experiment mit der jeweils anderen Phase gesättigt. Deshalb wird das Volumen der beiden Phase als konstant angenommen. Beide Phasen werden als ideal durchmischt angesehen. Außerdem wird angenommen, dass die BAL nur in der wässrigen Phase löslich ist und deshalb ausschließlich dort die Reaktion stattfindet. Beide Phasen sind miteinander über den Stofftransport gekoppelt. Demnach ändert sich die Konzentration in der wässrigen Phase $c_{aq,i}$ bedingt durch die Reaktionsrate v_{II} und dem Stofftransport J_i von i:

$$\frac{dc_{aq,i}}{dt} = -\frac{J_i}{V_{aq}} - x_i \cdot v_{II} \tag{3.34}$$

wobei x_i der Stöchiometriekoeffizient von i und V_{aq} das Volumen der wässrigen Phase bezeichnet.

In die organische Phase fließt im kontinuierlichen Betrieb ein Volumenstrom F mit der Konzentration $c_{zu,i}$. Damit das Volumen der organischen Phase V_{org} konstant bleibt, fließt der gleiche Volumenstrom über einen Überlauf ab. Durch den Zulauf wird die Konzentration von i in der organische Phase $c_{org,i}$ verdünnt, wenn $c_{zu,i} < c_{org,i}$ ist, oder aufkonzentriert, wenn $c_{zu,i} > c_{org,i}$ ist. Da die organische Phase gerührt wird, wird angenommen, dass sich $c_{org,i}$

unmittelbar einstellt und die Konzentration im Überlauf auch $c_{org,i}$ beträgt. Mathematisch kann dies durch die folgende Bilanzgleichung beschrieben werden:

$$\frac{dc_{org,i}}{dt} \cdot V_{org} = J_i + \left(c_{zu,i} - c_{org,i}\right) \cdot F \tag{3.35}$$

Der Stofftransport von *i* über die Phasengrenzfläche *a* wurde beschrieben durch:

$$J_i = k_{ji} \cdot a \cdot \left(c_{aq,i} - \frac{c_{org,i}}{K_i} \right) \tag{3.36}$$

wobei J_i der molare Stoffstrom und k_{ji} der Stoffdurchgangskoeffizient von *i* ist. Triebkraft dafür ist das Konzentrationsgefälle, das sich aus der Abweichung von der thermodynamischen Gleichgewichtlage berechnet. K_i bezeichnet den Verteilungskoeffizienten, der berechnet wurde nach:

$$K_i = \frac{c_{aq,i}}{c_{org,i}} \tag{3.37}$$

wobei $c_{aq,i}$ bzw. $c_{org,i}$ die molare Konzentration von *i* in der wässrigen bzw. organischen Phase des entsprechenden Zweiphasensystems im thermodynamischen Gleichgewicht ist.

Der zweite Grund für eine Konzentrationsänderung ist die enzymatische Umsetzung. Wie bereits beschrieben, kann die enzymkinetische Gleichung dem Einphasensystem nicht entlehnt werden, ohne deren Validität für das Zweiphasensystem zu überprüfen. Da im Zweiphasensystem keine anderen Produkte auftraten und auch die Enantioselektivität unverändert war, konnte angenommen werden, dass auch der Reaktionsmechanismus unverändert war. Die bereits entwickelte enzymkinetische Gleichung basiert auf diesem Mechanismus und durfte deshalb übertragen werden:

$$v_{II} = \frac{k_{cat} \cdot E \cdot \left(A_{aq}^2 - \frac{P_{aq}}{K_{eq,II}} \right)}{K_{iA,II} \cdot K_{mB,II} + \left(K_{mB,II} + K_{mA,II}\right) \cdot A_{aq} + A_{aq}^2 + \frac{K_{iA,II} \cdot K_{mB,II}}{K_{mP,II}} \cdot P_{aq} \cdot \left(1 + \frac{A_{aq}}{K_{iB,II}}\right)} \tag{3.38}$$

wobei A_{aq} und P_{aq} die molaren Konzentrationen von DMBA und TMB in der wässrigen Phase sind. Die Definitionen der Makrokonstanten bleiben unverändert. Der Index *II* kennzeichnet die kinetischen Parameter für das Zweiphasensystem.

An dieser Stelle soll kurz dargestellt werden, wie das entwickelte kontinuierlich reaktive Modell universell eingesetzt werden kann. Im reaktiven ansatzweisen Betrieb wurde *F* gleich

Null gesetzt, wodurch der Verdünnungsterm entfiel. Im nichtreaktiven ansatzweisen Betrieb wurde zusätzlich v_{II} gleich 0 gesetzt, wodurch die Enzymreaktion eliminiert wurde.

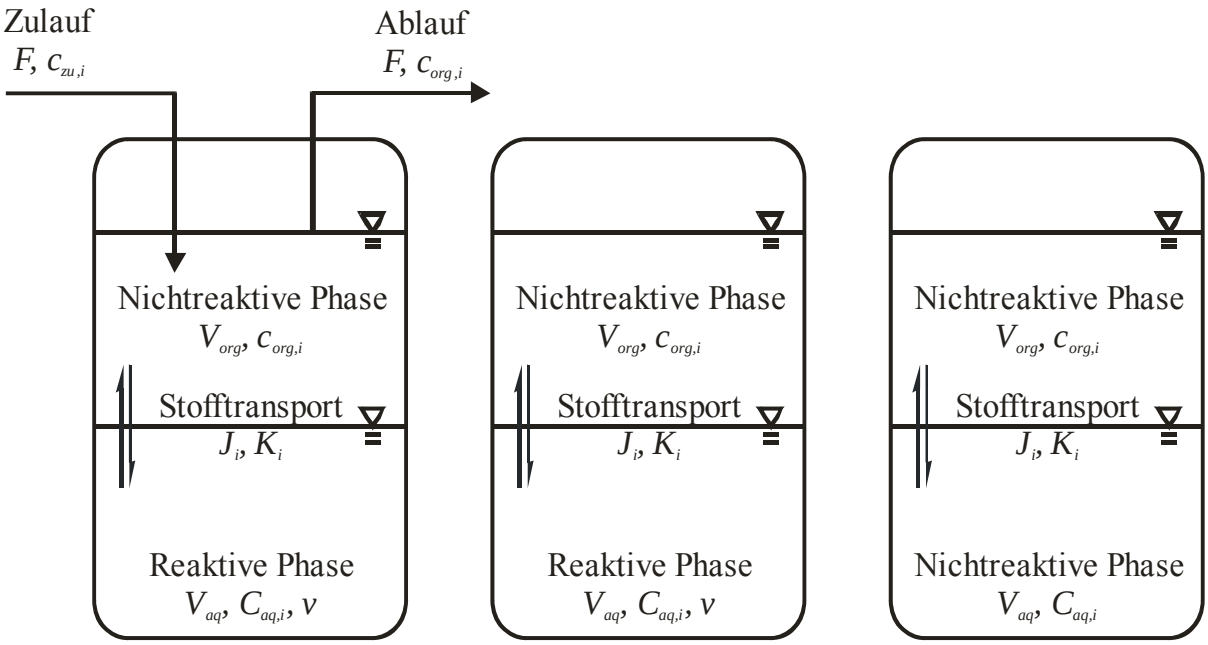


Abbildung 3.19: Kontinuierlich reaktives (links), ansatzweise reaktives (Mitte) und ansatzweise nichtreaktives (rechts) Zweiphasensystem in dieser Arbeit.

Basierend auf dem Modell, wurde im nächsten Kapitel die intrinsische Enzymkinetik untersucht. Bisher wurde lediglich beschrieben, dass die Modellstruktur der enzymkinetischen Gleichung gleich bleibt. Die kinetischen Parameter selbst mussten noch anhand geeigneter Experimente überprüft werden.

3.1.5.4 Bestimmung der intrinsischen Enzymkinetik durch Reaktionsanfangsraten

Da die Enzymkinetik im Zweiphasensystem vom Stofftransport überlagert ist, wurden zunächst Reaktionsbedingungen ermittelt, unter denen die Enzymreaktion vernachlässigbar wenig verfälscht wird. Die Auswertung sollte mit konventionellen Methoden unter Bestimmung von Reaktionsanfangsraten realisierbar sein. Der Stofftransport sollte idealerweise keine Rolle spielen und es sollte gelten:

$$J_i = 0 \tag{3.39}$$

wobei J_i den molaren Stoffstrom (=Stofftransport) von i bezeichnet. Um dieser Annahme gerecht zu werden, wurden die Freiheitsgrade des reaktiven Zweiphasensystems bestimmt, die unter Einhaltung der Referenzbedingungen variiert werden konnten. Dies waren die Phasenvolumina, die Anfangskonzentration von DMBA bzw. TMB und die Enzymkonzentration.

Diese Variablen wurden dahingehend optimiert, dass die Enzymreaktion beschleunigt und gleichzeitig der Stofftransport gebremst wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst und werden im Folgenden anschaulich erklärt: Um während der Messung den Stofftransport praktisch zu unterbinden, wurden die Konzentrationen in der wässrigen und organischen Phase im Verteilungsgleichgewicht eingestellt. Weiterhin wurde eine hohe Enzymkonzentration gewählt, um die Reaktionsrate zu erhöhen. Mit fortschreitender Reaktion findet zwangsläufig Stofftransport statt, da die Konzentrationen immer mehr vom Verteilungsgleichgewicht abweichen. Um den resultierenden Stofftransport zu minimieren, wurde das Phasenverhältnis aus wässriger und organischer Phase maximiert. Dies verkleinert den Stofftransport, da nur eine geringe Stoffmenge ausreicht, um die Gleichgewichtskonzentration in der organischen Phase wiederherzustellen. Ein positiver Nebeneffekt ist, dass sich dadurch die Konzentration in der wässrigen Phase kaum ändert, wodurch das Ergebnis wenig verfälscht wird.

Tabelle 3.9: Optimierung der Reaktionsbedingung für die Bestimmung der intrinsischen Enzymkinetik im wässrig-organischen Zweiphasensystem.

	V_{aq} [mL]	V_{org} [mL]	$c_{i,aq}$ [mM]	$c_{i,org}$ [mM]	E [nM]
Freiheitsgrade	5 - 10	0,25 - 10	0,2 - 5,0	0,2 - 25	1,667 - 16,7
Optimierung	10	0,25	0,2 - 5,0	$K_i \cdot c_{i,aq}$	16,7

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen wurden Reaktionsanfangsraten in den Zweiphasensystemen Puffer-Hexan und Puffer-MIBK gemessen und unter Vernachlässigung des Stofftransports ausgewertet (Abbildung 3.20). Der sigmoide Verlauf der Sättigungskurve von DMBA war auch im Zweiphasensystem sichtbar, d.h. auch hier ist eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik unpassend. Die Wechselzahl der Carboligation ist größer als die der Carbolyse. In beiden Zweiphasensystemen wurde ein annähernd gleicher Verlauf erhalten. Die Messungen decken sich mit den Beobachtungen im Einphasensystem.

Dies konnte durch die Parameterschätzung bestätigt werden. In Tabelle 3.10 sind die Parameterwerte gegeben, die durch nichtlineare Regression der Kurvenverläufe bestimmt wurden. Es stellte sich heraus, dass alle kinetischen Parameter mit guter Genauigkeit bestimmt werden konnten. Zwischen den Parameterwerten in Puffer-Hexan und Puffer-MIBK konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden mit Ausnahme von $k_{cat,r,ref,II}$. Der Wert schien in Puffer-Hexan kleiner als in Puffer-MIBK zu sein. Berücksichtigt man die Standardabweichung war dieser Unterschied marginal, aber dennoch signifikant. Allerdings lag $k_{cat,r,ref}$ - der entsprechende Wert im Einphasensystem - zwischen den beiden Werten. Wird die Fehlertoleranz berücksichtigt, lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten im Einphasensystem und in Puffer-Hexan bzw. Puffer-MIBK vor. Dadurch konnte durch

Messung von Reaktionsanfangsraten direkt in den untersuchten Zweiphasensystemen gezeigt werden, dass

$$k_{cat,II} \approx k_{cat} \tag{3.40}$$

$$K_{mB,II} \approx K_{mB} \tag{3.41}$$

$$k_{cat,r,II} \approx k_{cat,r} \tag{3.42}$$

$$K_{mP,II} \approx K_{mP} \tag{3.43}$$

wodurch schließlich die Schlussfolgerung gezogen werden konnte, dass die intrinsische Enzymkinetik der BAL in Puffer-Hexan bzw. Puffer-MIBK im Vergleich zu reinem Puffer identisch ist:

$$v_{II} \approx v \tag{3.44}$$

Tabelle 3.10: Parameterschätzung durch Modellanpassung an Reaktionsanfangsraten in wässrig-organischen Zweiphasensystemen. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der einphasigen Kinetik eingefügt.

Parameter	Puffer-Hexan	Puffer-MIBK	Puffer
$k_{cat,ref,II}$	37,82 ± 1,58	35,88 ± 1,59	36,51 ± 1,11
$K_{mB,ref,II}$	0,917 ± 0,059	0,888 ± 0,050	0,888 ± 0,037
$k_{cat,r,ref,II}$	24,41 ± 0,60	25,73 ± 0,53	25,18 ± 0,69
$K_{mP,ref,II}$	0,471 ± 0,034	0,431 ± 0,030	0,501 ± 0,047

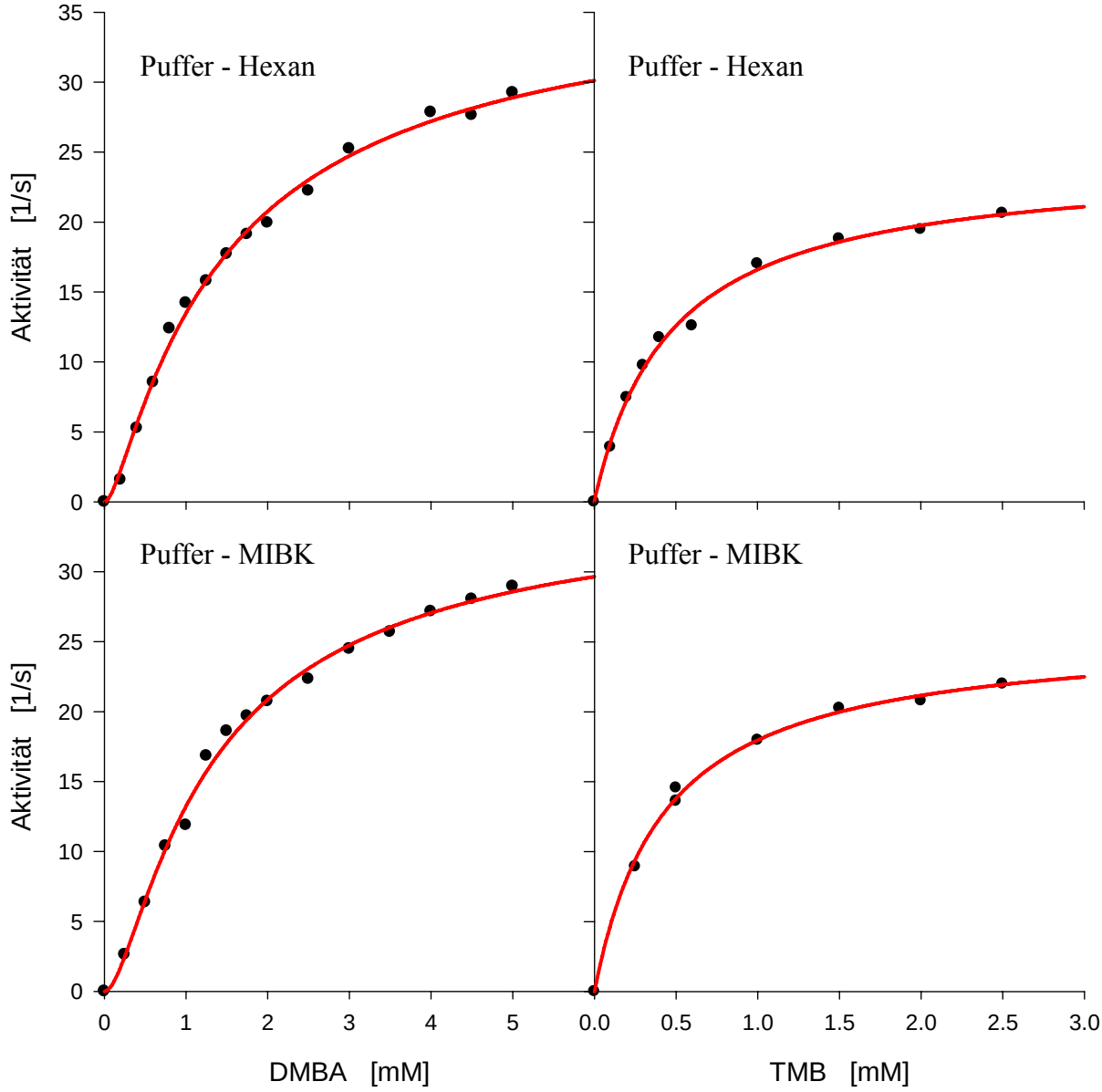


Abbildung 3.20: Gemessene Reaktionsanfangsraten (●) und Modellanpassung (—) in den wässrig-organischen Zweiphasensystemen Puffer-Hexan und Puffer-MIBK.

3.1.5.5 Beurteilung der Modellgüte anhand von Reaktionsverläufen

Um das Modell des reaktiven Zweiphasensystems zu evaluieren, wurden die Reaktionsbedingungen rational ausgelegt: Die Anfangskonzentration wurde in der wässrigen Phase vorgelegt. In der organischen Phase lag weder DMBA noch TMB vor. Außerdem wurde eine hohe Enzymkonzentration eingesetzt. In Kooperation mit C. Michalik (LPT, RWTH Aachen) konnten die Bedingungen durch eine rechnergestützte optimale Versuchsplanung bestätigt werden. Unter diesen Bedingungen bewegte man sich nahe der einphasigen Verlaufskurven, da die Enzymreaktion schnell im Vergleich zum Stofftransport war. Der Stofftransport war jedoch im Gegensatz zur Untersuchung der

Reaktionsanfangsraten nicht vernachlässigbar. Die Messungen und die Modellvorhersage sind in Abbildung 3.21 dargestellt. An der Produktzunahme ist zu erkennen, dass die Enzymreaktion stattfand. Außerdem wurde beobachtet, dass sich infolge des Stofftransports in der organischen Phase Substrat und Produkt anreicherte. Insgesamt stimmen die gemessenen Konzentrationen gut mit den vom Modell vorhergesagten Werten überein. Die gute Modellvorhersage deutete darauf hin, dass die Enzymkinetik und der Stofftransport richtig modelliert wurden und die identifizierten Parameterwerte ebenfalls stimmig waren.

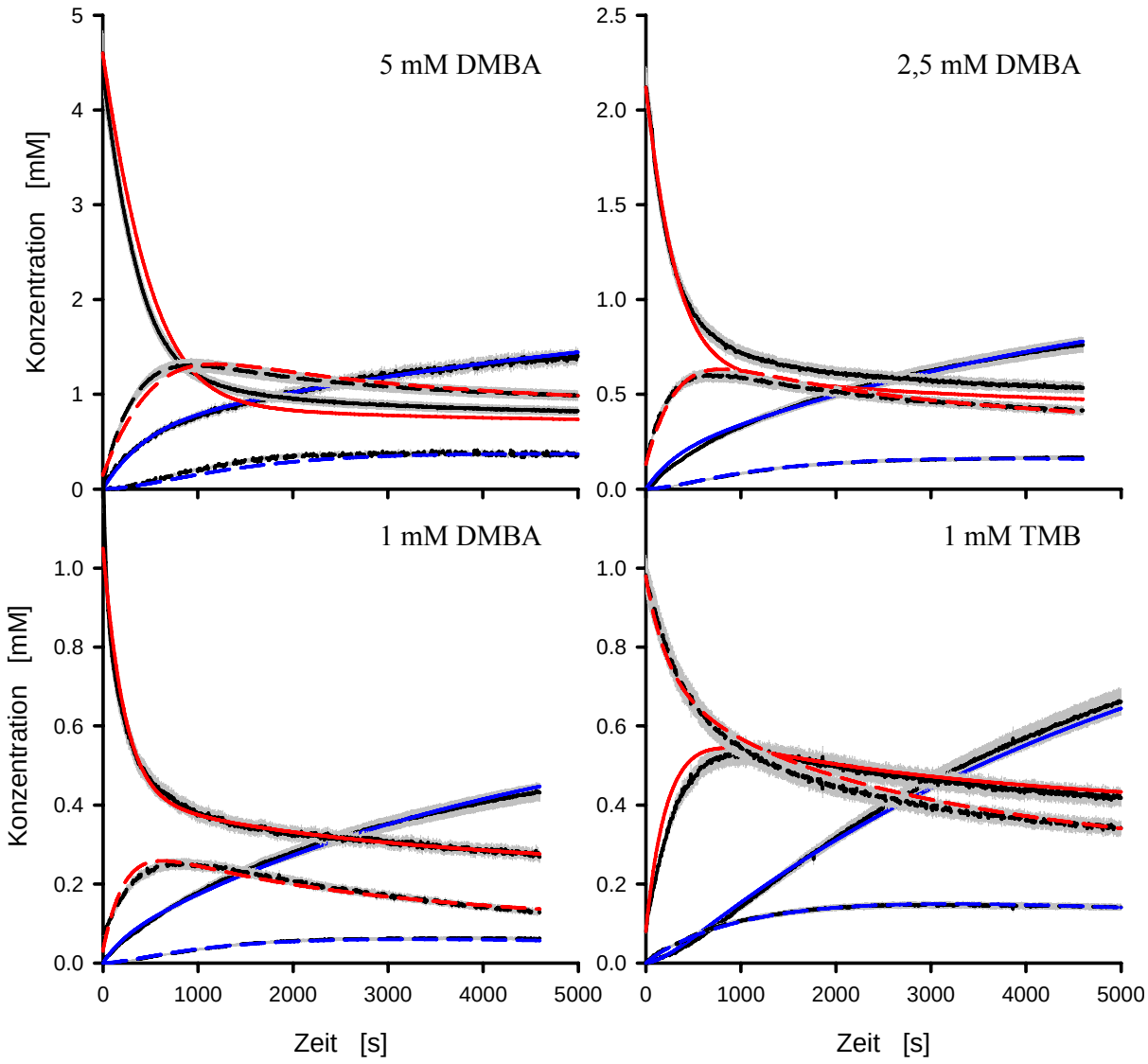


Abbildung 3.21: Modellvorhersage (farbig) und gemessener Reaktionsverlauf (schwarz) im Zweiphasensystem Hexan-Puffer. Folgende Konzentrationen wurden gemessen: A_{aq}: rot durchgezogene Linie; P_{aq}: rot gestrichelte Linie; A_{org}: blau durchgezogene Linie; P_{org}: blau gestrichelte Linie. Reaktionsbedingung sind in Kapitel 2.6.6 angeben.

3.1.5.6 Kritische Einschätzung der Ergebnisse

In diesem Kapitel werden drei Fragestellungen beantwortet: (1) Wie groß ist der Fehler in den Reaktionsanfangsratenbestimmungen, der aufgrund der Vernachlässigung des Stofftransports zu erwarten war? (2) Kann die Enzymkinetik in den Verlaufskurvenexperimenten beurteilt werden oder ist sie durch den Stofftransport zu stark maskiert? (3) Reagiert die BAL auch in der Phasengrenzschicht?

Um die erste Frage zu beantworten, wurden Versuche *in silico* durchgeführt. Ein Versuchsset berücksichtige dabei den Stofftransport (=Realverlauf), das andere vernachlässigte ihn (=Spekulativverlauf). Wenn der Stofftransport zu vernachlässigen ist, dann stimmen die Verläufe der beiden Sets überein und die Auswertung der Experimente ergibt dasselbe Ergebnis. Die Experimente wurden so ausgelegt, dass sie die Zeitdauer von 100 s nicht überschritten. Da die Reaktionsanfangsraten *in vitro* über einen Zeitraum von 60 s gemessen wurden, wurden die *in silico*-Experimente zusätzlich nach dieser Dauer ausgewertet. Die Startkonzentrationen wurden auf 5,0 mM und 0,2 mM DMBA bzw. 2,5 mM und 0,2 mM TMB gesetzt, was *in vitro* die jeweils höchste und niedrigste Konzentration darstellte. Beide Zweiphasensysteme wurden untersucht.

Es zeigte sich, dass der Verlauf der *in silico*-Experimente annähernd unabhängig davon war, ob der Stofftransport berücksichtigt wurde (Daten nicht gezeigt). Kaum sichtbare Unterschiede waren nach 60 s und sehr geringe Diskrepanzen nach 100 s zu beobachten. Aus den Differenzen zwischen Real- und Spekulativverlauf wurde der Fehler *e* unter der Voraussetzung berechnet, dass die Versuche konventionell durch lineare Regression der Konzentrationsänderung über den Zeitraum *t* ausgewertet werden. Die Steigung *X* der Regressionsfunktion war dabei ein Maß für die Reaktionsrate im Zeitraum *t*:

$$X(t) \sim v(t) \tag{3.45}$$

Der relative Fehler *e* berechnete sich dann nach:

$$e(t) = 1 - \frac{X_{Spekulativ}(t)}{X_{Real}(t)} \tag{3.46}$$

wobei die Indizes darauf hinweisen, um welches Versuchsset es sich handelte. In Tabelle 3.11 sind die Fehler für die Zweiphasensysteme Puffer-Hexan und Puffer-MIBK zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass im gleichen Zweiphasensystem der Fehler bei DMBA generell größer ist als bei TMB. Außerdem ist *e* kleiner, je kürzer die Messdauer. Schließlich ist *e* abhängig davon, ob DMBA oder TMB als Substrat eingesetzt wird und in kleinerem Maße davon, in welcher Konzentration. Zuletzt zeigte sich, dass der Fehler abhängig vom gewählten Lösungsmittel ist: In Puffer-MIBK wurde ein größerer Fehler als in Puffer-Hexan gemessen.

Tabelle 3.11: Fehler bei der Messung von Reaktionsanfangsraten im Zweiphasensystem, der durch die Vernachlässigung des Stofftransports resultierte.

DMBA [mM]	TMB [mM]	Fehler *e(t)* in Puffer-Hexan		Fehler *e(t)* in Puffer-MIBK	
		t = 60 s	t = 100 s	t = 60 s	t = 100 s
5,0	-	- 0,9 %	- 1,6 %	- 2,2 %	- 3,5 %
0,2	-	- 0,8 %	- 1,4 %	- 1,6 %	- 2,5 %
-	2,5	- 0,5 %	- 0,9 %	- 1,2 %	- 2,0 %
-	0,2	- 0,7 %	- 1,2 %	- 1,4 %	- 2,2 %

Um die beschriebenen Unterschiede von *e* zu erklären, wurde der Verlauf der Hatta-Zahl *Ha* in den Experimenten berechnet. Die Hatta-Zahl wurde ursprünglich empfohlen, um zwischen reaktionslimitierten ($Ha < 0{,}3$) und stofftransportlimitierten ($Ha > 3$) Reaktionen zu unterscheiden. Reaktionslimitierte Reaktionen laufen langsam ab und finden vornehmlich in der Bulkphase statt. Stofftransportlimitierte Reaktionen sind hingegen schnell und finden vor allem nahe der Grenzfläche statt. Das Hatta-Modell wurde später erfolgreich auf Enzymreaktion in Zweiphasensystemen übertragen, um das Prozessregime zu charakterisieren (Fernandez und Cabral, 2008; Trusek-Holownia, 2003; Trusek-Holownia und Noworyta, 2000). Deshalb wird auch hier diese Klassifizierung benutzt. Da im vorliegenden Fall das Substrat bereits zu Beginn in der reaktiven Phase vorlag, kann die Reaktion nicht stofftransportlimitiert sein. Aus diesem Grund wurde hier lediglich anhand der Grenzwerte beurteilt, ob die Enzymkinetik dominierte ($Ha > 3$) oder der Stofftransport dominierte ($Ha < 0{,}3$). *Ha* berechnet sich nach:

$$Ha_i = \frac{x_i \cdot V_{aq} \cdot v}{J_i} \tag{3.47}$$

wobei x_i den Stöchiometriefaktor von *i* bezeichnet. Ist beispielsweise Ha_{DMBA} groß, so änderte sich die Konzentration von DMBA vorwiegend als Folge der enzymatischen Umsetzung. Unter diesen Umständen eignet sich die DMBA-Konzentration, um die Enzymkinetik (fast) isoliert vom Stofftransport zu beurteilen. Beispielhaft sind 4 Verläufe der Hatta-Zahl während der Reaktionsanfangratenmessung in Abbildung 3.22 dargestellt.

Die wichtigste Beobachtung in diesem Zusammenhang war, dass die Hatta-Zahl durchwegs sehr groß war, wobei zu Beginn Ha_{TMB} größer als Ha_{DMBA} war, und anschließend in unterschiedlichem Maße abfiel. Daran konnte nochmals verdeutlicht werden, dass sich die gemessene Konzentration maßgeblich durch die Enzymreaktion änderte. Auch zeigte sich, dass die Hatta-Zahl mit den in Tabelle 3.11 bestimmten Fehlern korrelierte: Je größer die Hatta-Zahl, desto kleiner war der Fehler. Daraus wurde geschlossen, dass die Unterschiede in

den Fehlern von verschiedenen Reaktionsraten und/oder unterschiedlichem Stofftransport herrühren. Dies wiederum kann dadurch erklärt werden, dass die Reaktionsrate abhängig von der Startkonzentration und dem eingesetzten Substrat (verschiedene kinetische Parameter und Stöchiometriefaktoren von DMBA und TMB) war. Gleichfalls war der Stofftransport von den genannten Faktoren abhängig (Startkonzentration, verschiedene Stofftransport- und Verteilungskoeffizienten von DMBA und TMB). Unabhängig von allen physikalischen Erklärungen war die bedeutendste Schlussfolgerung, die aus den Ergebnissen gezogen werden konnte, dass *e* stets kleiner als die Messunsicherheit (5 %, Daten nicht gezeigt) war und deshalb vernachlässigt werden konnte.

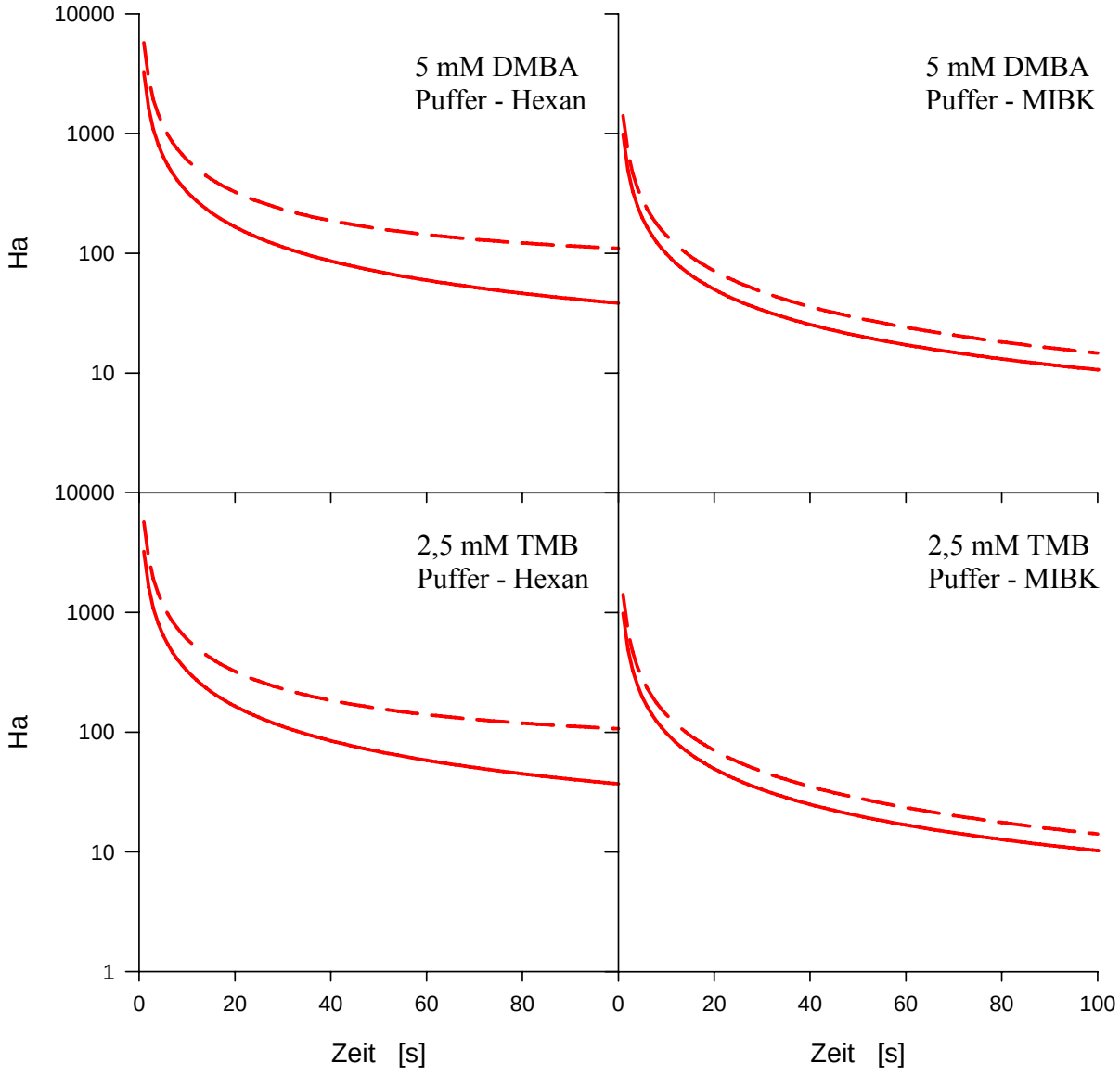


Abbildung 3.22: Simulation von Ha_{DMBA} (▬) und Ha_{TMB} (– –) während der Messung der Reaktionsanfangsraten in den Zweiphasensystemen Puffer-Hexan und Puffer-MIBK bei verschiedenen Anfangsbedingungen.

Die Frage, ob auch die gemessenen Verlaufskurven sich eignen, um die intrinsische Enzymkinetik zu beurteilen, wurde ebenfalls anhand der Hatta-Zahl diskutiert. In Abbildung 3.23 sind die Hatta-Zahlen von DMBA und TMB aufgetragen, die während der Reaktion auftraten. Dabei wurden exemplarisch zwei Reaktionsverläufe aus Abbildung 3.21 herausgegriffen. Wurde 5 mM DMBA als Substrat vorgelegt, zeigte sich, dass zu Beginn der Reaktion Ha_{DMBA} und Ha_{TMB} größer als 3 waren, d.h. hier änderten sich die Konzentration von DMBA und TMB infolge der Enzymreaktion. Nach und nach gewann der Stofftransport die Überhand. Anschließend stand wieder die Enzymreaktion im Vordergrund. Qualitativ wurde dieser Verlauf auch bei den beiden nicht gezeigten Experimenten beobachtet. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich in diesen Versuchen sowohl die Enzymkinetik als auch der Stofftransport auf den Reaktionsverlauf auswirkten. Wurde TMB als Substrat eingesetzt, so wurde nur der reaktionsdominierende Bereich durchlaufen, d.h. hier konnte der Stofftransport zwar weniger, die Enzymreaktion hingegen erfolgreich beurteilt werden. Zusammenfassend wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass sich alle Experimente eigneten, die intrinsische Enzymkinetik zu überprüfen. Da das Modell alle vier Reaktionen über die gesamte Zeit gut vorhersagte (siehe Abbildung 3.21) konnte bestätigt werden, dass sowohl die Enzymreaktion als auch der Stofftransport richtig modelliert wurde. Dies bekräftigte einmal mehr die Validität der vereinfachten zweiphasigen Reaktionsanfangsratenbestimmung. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, das bereits bestimmte Modell für das Zweiphasensystem aus Puffer-MIBK zu bestätigen.

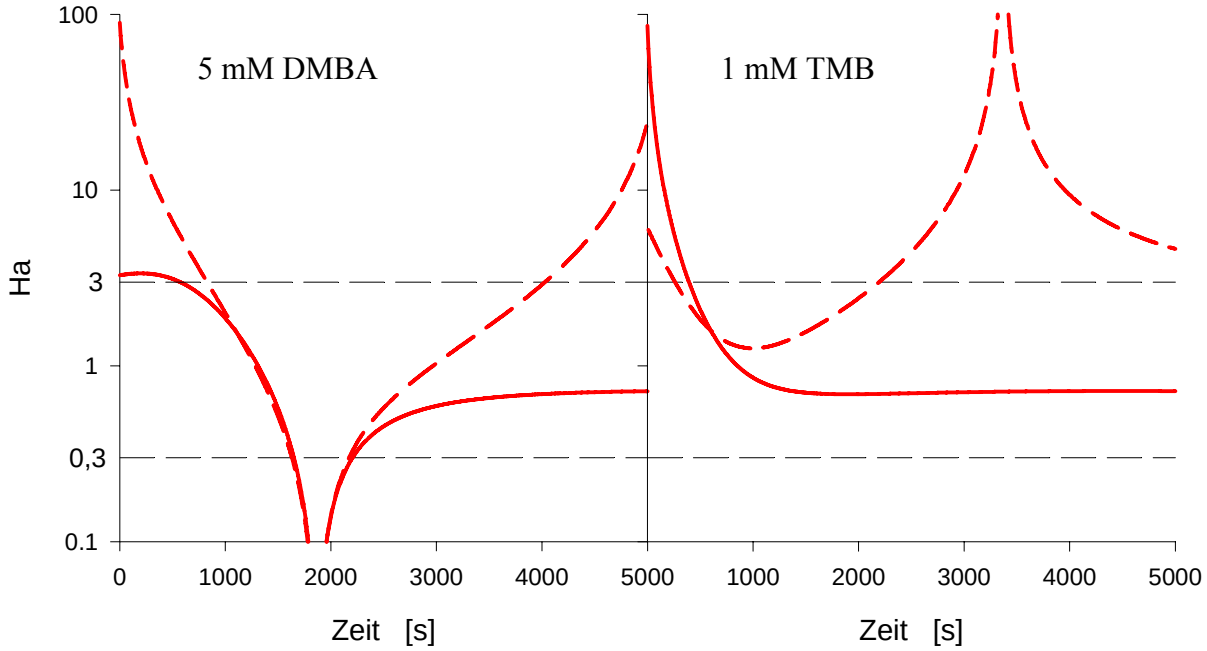


Abbildung 3.23: Entwicklung der Hatta-Zahl von DMBA (——) und TMB (– –) während der Enzymreaktion im Zweiphasensystem Puffer-Hexan.

Da während einer reaktiven Extraktion der Stofftransport als Folge einer effektiven Erhöhung des Stofftransportkoeffizienten intensiviert werden kann (Ermakov *et al.*, 2001), wurde zuletzt untersucht, ob die BAL bereits in der Phasengrenzschicht reagieren kann. Dieses Phänomen kann zunehmend bei $Ha > 3$ beobachtet werden. Kann auch die Enzymreaktion in der Phasengrenzschicht stattfinden, dann bildet sich ein ausgeprägtes Konzentrationsprofil in der Grenzschicht und der Stoffdurchgangskoeffizient ist sowohl durch die Hydrodynamik als auch die Enzymreaktion bestimmt. Dieses Zweiphasensystem ist kaum vorhersag- oder bestimmbar. Deshalb wurde experimentell untersucht, ob der Stoffdurchgangskoeffizient bei steigender Reaktionsgeschwindigkeit tatsächlich erhöht war. Dabei wurde die größte UV-spektrometrisch messbare DMBA-Konzentration in Hexan gelöst (25 mM). In der wässrigen Phase wurden unterschiedliche Enzymkonzentrationen gelöst. Gemessen wurde die Abnahme der Absorption in der organischen Phase. Dabei zeigte sich, dass die Abnahme zum Zeitpunkt Null unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration war (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung stand im Einklang mit der Modellvorhersage, die einen konstanten Stoffdurchgangskoeffizienten annahm. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass eine Grenzschichtreaktion ausgeschlossen werden kann.

3.1.6 Einflussfaktoren auf die Reaktordynamik im Zweiphasensystem (BAL)

Biokatalytische Anwendungen zielen auf hohe Stoffumsätze ab. Um eine möglichst hohe Substratdichte einzusetzen, sollten die guten Lösungseigenschaften der organischen Phase ausgenutzt werden. Unter diesen Voraussetzungen muss das Substrat aus der organischen in die wässrige Phase diffundieren, um anschließend umgesetzt zu werden. Die Geschwindigkeit, mit der dies stattfindet, kann gezielt beeinflusst werden. Damit der Stofftransport nicht den limitierenden Faktor darstellt, sollte er schnell im Vergleich zur Reaktionsrate sein. Im Folgenden werden zunächst zwei konstruktionstechnische Möglichkeiten aufgezeigt, um den Stofftransport zu erhöhen. Anschließend sollte untersucht werden, ob eine Veränderung der Reaktionsbedingungen auch den Stofftransport und das Verteilungsgleichgewicht beeinträchtigt, da an früherer Stelle gezeigt wurde, dass Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und DMF-Konzentration den Reaktionsverlauf der BAL-katalysierten Carboligation beeinflussen. Die physikalische ist nach der konstruktions-technischen Analyse gleichzeitig der letzte Schritt der experimentellen Analyse, die für eine Reaktionsoptimierung grundlegend ist.

Anmerkung: Im Folgenden wird nur das Zweiphasensystem Puffer-Hexan untersucht, auch wenn das System Puffer-MIBK nach dem derzeitigen Erkenntnisstand geeigneter scheint. Die Gründe sind pragmatischer Natur. Der Aufwand war nicht gerechtfertigt, beide Systeme weiterhin so ausführlich zu untersuchen. Es war vielmehr Ziel dieser Arbeit, anhand der untersuchten Modellreaktionen eine systematische Vorgehensweise zu beschreiben, um die Grundlagen für eine anschließende Prozessoptimierung zu schaffen.

3.1.6.1 Analyse und Modellierung der Einflüsse auf die Reaktordynamik

Konstruktionstechnisch konnten unter anderem die Phasengrenzfläche und der Rührer verändert werden. Nach Gleichung (3.36) ist der Stofftransport direkt proportional zur Phasengrenzfläche. Deshalb ist es möglich, den Stofftransport zu erhöhen, indem die Phasengrenzfläche vergrößert wird. Besonders attraktiv für technische Anwendungen wären Reaktoren mit großem Durchmesser und geringer Höhe. Ebenso stellt die Emulgierung der organischen Phase eine viel versprechende Lösung dar, wenn der Stofftransport zu langsam ist. Fraglich ist, ob der in dieser Arbeit genutzte Reaktoraufbau geeignet ist, um hohe Produktivitäten zu erreichen. Diesem Sachverhalt wird in Kapitel 3.2.2 auf den Grund gegangen.

Außerdem konnte der Stofftransport beschleunigt werden, indem die Rührergeschwindigkeit erhöht wurde. Alternativ kann der Energieeintrag auch durch einen größeren Rührer erhöht werden. Der beschriebene Effekt wurde beobachtet, als die Rührerdrehzahl der wässrigen Phase erhöht wurde (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung wurde dadurch erklärt, dass die Scherkräfte in der jeweiligen Flüssigkeitsphase vergrößert werden, wodurch die Grenzschichten abgetragen bzw. dünner werden. Die gleiche Beobachtung wurde gemacht, als die Rührerdrehzahl in der organischen Phase erhöht wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Zweifilmtheorie. Diese besagt unter anderem, dass die Phasengrenze von einer diesseitigen und einer jenseitigen laminaren Grenzschicht umgeben ist. Der beschriebene Mechanismus ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

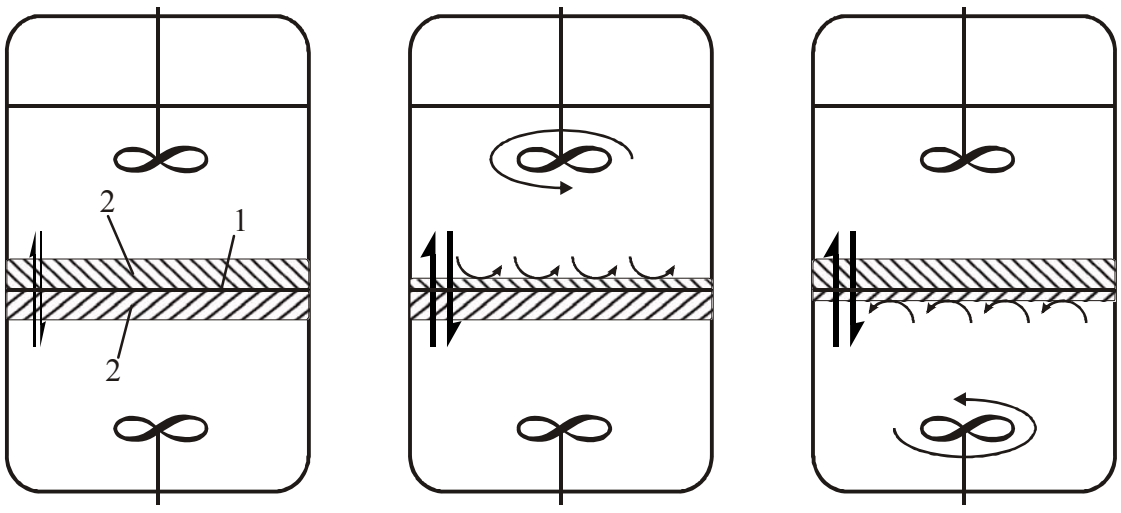


Abbildung 3.24: Erklärung des erhöhten Stofftransports als Folge größeren Leistungseintrags. 1: Phasengrenze, 2: Phasengrenzschicht.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu gewinnen, war es notwendig, dass *a* bekannt war. Praktisch konnten deshalb nicht beliebig hohe Drehzahlen eingestellt werden, da ansonsten

die Phasengrenze unruhig und die Bestimmung von *a* unsicher wurde. Deshalb wurde ein geeigneter Sicherheitsabstand von der oberen Drehzahlgrenze gewählt. Die daraus resultierende Drehzahl wurde in den folgenden wie auch in den bereits beschriebenen (Kapitel 3.1.5) Experimenten beibehalten. Eine mathematische Beschreibung erübrigte sich, da geringere Drehzahlen aufgrund der langsameren Versorgung mit Substrat unattraktiv für effiziente Anwendungen sind. Das thermodynamische Verteilungsgleichgewicht kann durch die beschriebenen verfahrenstechnische Maßnahmen nicht beeinflusst werden.

Anschließend wurde der Einfluss der thermodynamischen Zustandsgrößen auf Verteilung und Stofftransport untersucht. Der pH-Wert und die Ionenstärke zeigten keine Auswirkungen auf den Stofftransport und das Verteilungsgleichgewicht (Daten nicht gezeigt). Die Temperatur hingegen beeinflusste diese Phänomene. In Abbildung 3.25 sind die Verteilung von DMBA und TMB zwischen Puffer-Hexan dargestellt. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Diagramme. DMBA löste sich zunehmend in der wässrigen Phase, je höher die Temperatur eingestellt wurde. Dabei sank der Gleichgewichtskoeffizient jedoch nur wenig. Im Gegensatz dazu war TMB bei höheren Temperaturen besser in Hexan löslich und K_{TMB} stieg vergleichsweise stark. Mathematisch konnte der Verteilungskoeffizient in Abhängigkeit von der Temperatur durch einen exponentiellen Zusammenhang beschrieben werden:

$$K_i(T) = K_{i,ref} \cdot \exp\left(C_{T,i}^{GGW} \cdot \left(T - T_{ref}\right)\right) \tag{3.48}$$

wobei $C_{T,i}^{GGW}$ der Modellparameter des Temperatur-Gleichgewichtmodells des Stoffes *i* ist.

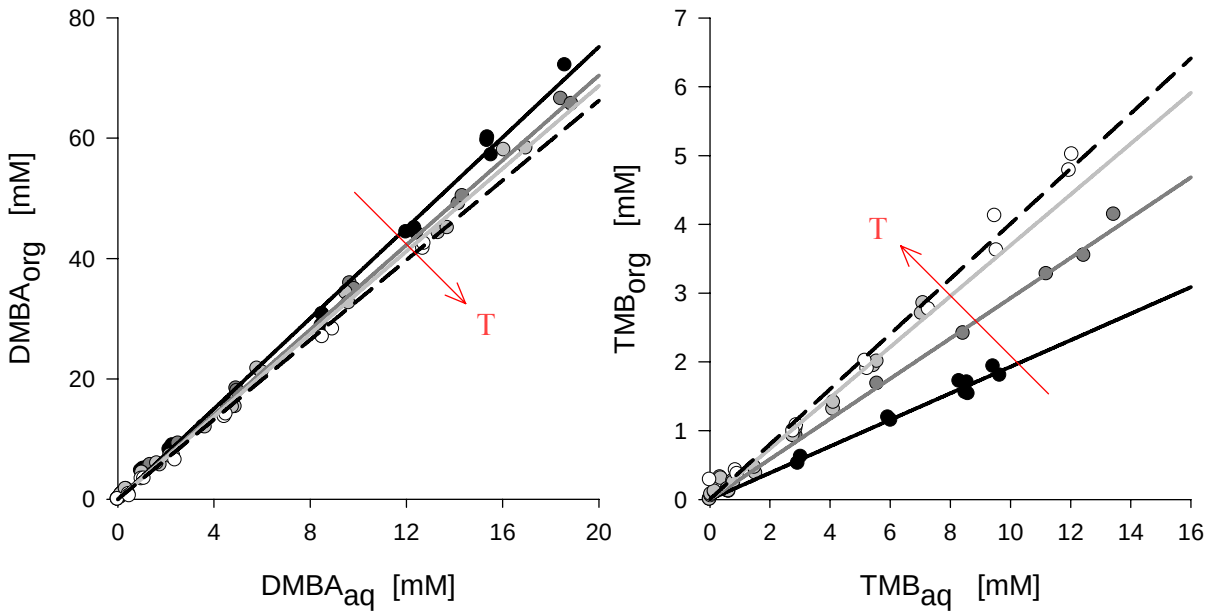


Abbildung 3.25: Einfluss der Temperatur im Intervall von 5 bis 25 °C auf die Verteilung von DMBA und TMB in Puffer-Hexan.

Um den Stofftransport zu bestimmen, wurde die Extinktion der wässrigen Phase über einen Zeitraum von etwa 2 h verfolgt. Die so ermittelten Reaktionsverläufe wurden einzeln an das entwickelte Modell (siehe Kapitel 3.1.5.3) unter Berücksichtigung von Gleichung (3.48) angepasst. Dadurch konnten für jedes einzelne Experiment die Stofftransportkoeffizienten k_{jA} und k_{jP} in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt werden. Die Auftragung von k_{jA} und k_{jP} über T deutete einen exponentiellen Verlauf an (Daten nicht gezeigt), der durch folgenden Zusammenhang approximiert wurde:

$$k_{ji}(T) = k_{ji,ref} \cdot exp\left(C_{T,i}^{ST} \cdot \left(T - T_{ref}\right)\right) \tag{3.49}$$

wobei $C_{T,i}^{ST}$ der Modellparameter des Temperatur-Stofftransportmodells von *i* ist.

Da die Löslichkeit der Reaktanden durch Zugabe von DMF stark erhöht werden konnte, war anzunehmen, dass DMF auch das Verteilungsgleichgewicht beeinflusst. Deshalb wurde zunächst die Verteilung von DMBA und TMB bei verschiedenen DMF-Konzentrationen gemessen (Abbildung 3.26).

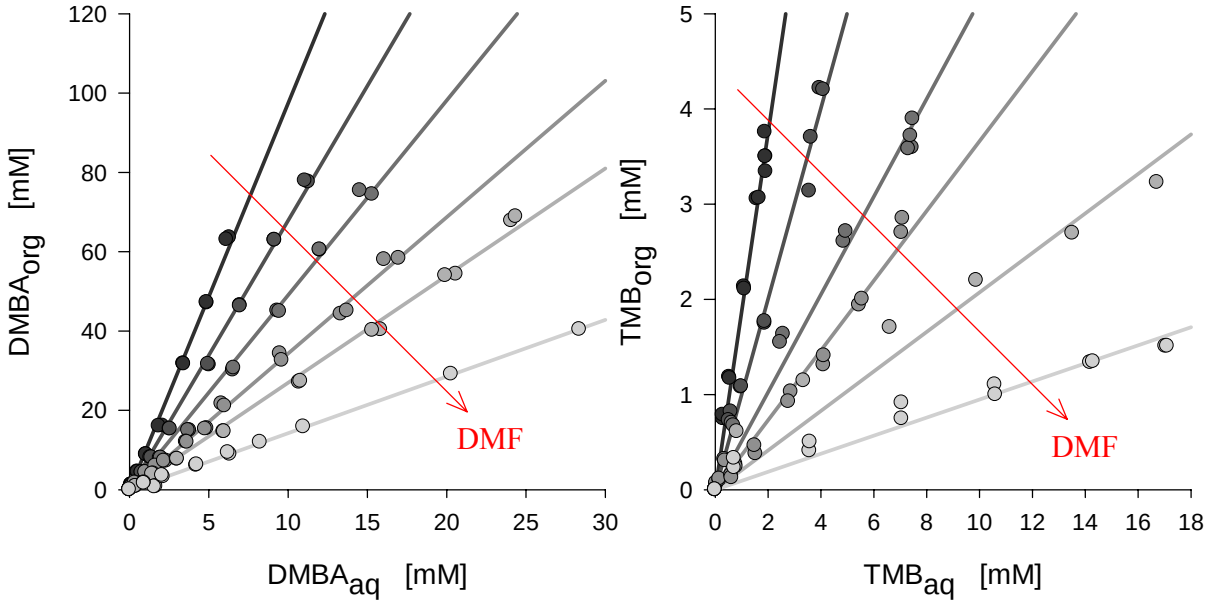


Abbildung 3.26: Verteilung von DMBA und TMB in Puffer-Hexan bei verschiedenen DMF-Konzentrationen von 5 bis 45 % (v/v).

Je mehr DMF eingesetzt wurde, desto mehr DMBA und TMB lagen im Puffer vor. Nachdem der Verteilungskoeffizient von *i* als Funktion der DMF-Konzentration $K_i(DMF)$ aufgetragen wurde (Daten nicht gezeigt), erklärte eine Exponentialfunktion den funktionalen Zusammenhang:

$$K_i(DMF) = K_{i,ref} \cdot \exp\left(C_{DMF,i}^{GGW} \cdot \left(DMF - DMF_{ref}\right)\right) \tag{3.50}$$

wobei $C_{DMF,i}^{GGW}$ der Modellparameter des DMF-Gleichgewichtmodells von *i* ist.

Der Stofftransport wurde wie oben beschrieben ermittelt. Der Zusammenhang zwischen k_{ji} und DMF konnte ebenfalls durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$k_{ji}(DMF) = k_{ji,ref} \cdot exp\left(C_{DMF,i}^{ST} \cdot \left(DMF - DMF_{ref}\right)\right) \tag{3.51}$$

wobei $C_{DMF,i}^{ST}$ der Modellparameter des DMF-Stofftransportmodells von *i* ist.

3.1.6.2 Beurteilung der Modellgüte und Parameterschätzung

Nun wurden die identifizierten Verteilungs- und Stofftransportgleichungen in das zweiphasige Grundmodell implementiert (siehe Kapitel 3.1.5.3). Da die Gleichungen auf der rechten Seite die entsprechenden Referenzparameter als Produkt beinhalteten, konnte analog Kapitel 3.1.4.3 vorgegangen werden. Als Bezugspunkt wurde die Verteilung und der Stofftransport bei Referenzbedingungen gewählt (siehe Kapitel 3.1.5.2):

$$K_i = K_{i,ref} \cdot \prod_i \frac{K_i(i)}{K_{i,ref}} \tag{3.52}$$

$$k_{j.i} = k_{j.i,ref} \cdot \prod_i \frac{k_{j.i}(i)}{k_{j.i,ref}} \tag{3.53}$$

Nun wurden alle Stofftransportexperimente simultan an das entwickelte Modell angepasst. In Abbildung 3.27 sind die experimentellen Daten und Anpassungsergebnisse bei Temperaturvariation gegenübergestellt. Beispielhaft ist der Stofftransport von DMBA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Steigung mit höherer Temperatur steiler wird. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Stofftransportkoeffizient größer ist. Eine analoge Beobachtung konnte bei TMB gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Die Modellgüte war ähnlich gut wie die von DMBA. Betont werden sollte an dieser Stelle, dass der Stofftransport bei 25 °C im Rahmen des Referenzbedingungen bereits berücksichtigt wurde. Höhere Temperaturen waren wegen der großen Flüchtigkeit der organischen Lösungsmittel nicht praktikabel. Wurde die DMF-Konzentration variiert, so wurden die Kurvenverläufe in Abbildung 3.28 erhalten. Hier sind beispielhaft die gemessenen Verläufe und Modellanpassungen von TMB abgebildet. Auch hier wurde mit zunehmender DMF-Konzentration ein steigender Stofftransportkoeffizient gemessen. Außerdem war am Ende der Messung die Gleichgewichtslage höher, was auf einen sinkenden Gleichgewichtskoeffizienten hinweist. Diese Beobachtung stand im Einklang mit den zuvor gemessenen Verteilungsgleichgewichten. Die Kurvenverläufe von

DMBA waren ähnlich und die Modellanpassungen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Auch hier war der Stofftransportkoeffizient größer, je mehr DMF im Reaktionsansatz vorlag.

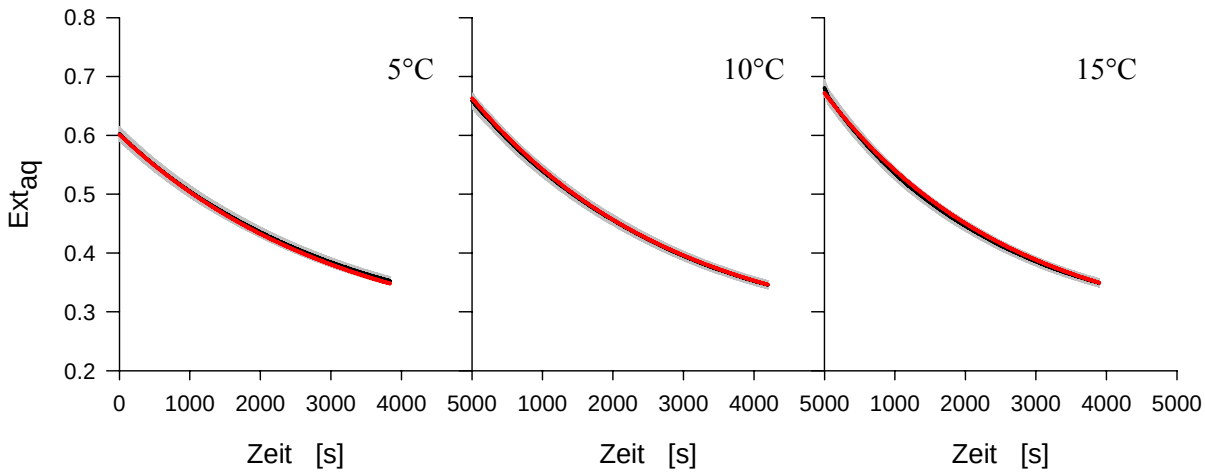


Abbildung 3.27: Modellanpassung (—) an den gemessenen (—) Stofftransport von DMBA in Puffer-Hexan bei verschiedenen Temperaturen.

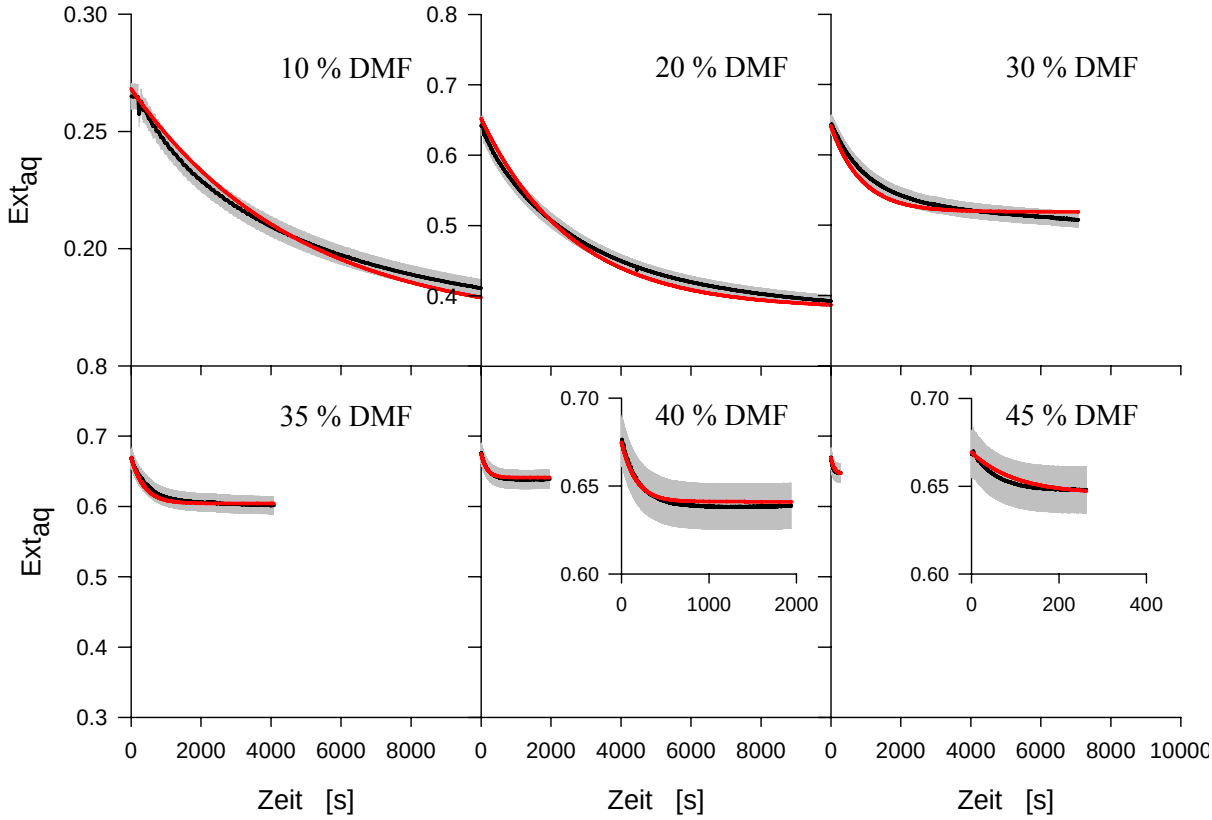


Abbildung 3.28: Messung (—) und Modellvorhersage (—) des Stofftransports von TMB bei verschiedenen DMF-Konzentrationen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Ordinate bei 10 % DMF. Wegen geringer Löslichkeit wurden 1 statt 5 mM TMB eingesetzt.

Die Modellvorhersage aller Experimente war durchgehend gut. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass sowohl die Gleichgewichts- als auch die Stofftransportmodelle gut gewählt wurden und die Modellparameter mit guter Genauigkeit bestimmt wurden. Diese sind in Tabelle 3.12 angegeben. Wegen der hohen Datendichte in den statischen Versuchen wurden die Gleichgewichtsmodellparameter aus diesen Experimenten bestimmt. Die dynamische Parameterschätzung erfasste nur die Stofftransportmodellparameter.

Tabelle 3.12: Modellparameter des Verteilungs- und Stofftransportmodells in Abhängigkeit der Temperatur und DMF-Konzentration.

Parameter	Wert	Parameter	Wert
$C_{T,A}^{GGW}$ [K^{-1}]	-0,0049 ± 0,0004	$C_{DMF,A}^{GGW}$ [-]	-6,397 ± 0,094
$C_{T,A}^{ST}$ [K^{-1}]	0,0141 ± 0,0003	$C_{DMF,A}^{ST}$ [-]	0,03064 ± 0,00014
$C_{T,P}^{GGW}$ [K^{-1}]	0,0300 ± 0,0034	$C_{DMF,P}^{GGW}$ [-]	-11,58 ± 0,27
$C_{T,P}^{ST}$ [K^{-1}]	0,0144 ± 0,0007	$C_{DMF,P}^{ST}$ [-]	0,03137 ± 0,00023

3.1.7 Bewertung der kinetischen und thermodynamischen Gleichungen

Zum ersten Mal konnten mechanistische kinetische Modelle der FDH und BAL entwickelt werden. Das neue Modell der FDH konnte die experimentellen Daten deutlich besser vorhersagen als das Literaturmodell. Das Literaturmodell ist ein formalkinetisches, das eine Doppel-Michaelis-Menten-Gleichung darstellt. Von dem mechanistischen Modell unterscheidet es sich durch die Michaelis-Menten-Annahme, die, wie hier gezeigt werden konnte, ungenau ist. Da die FDH aus *Candida boidinii* (E.C.1.2.1.2) zu den bedeutendsten Biokatalysatoren zählt und erfolgreich im Industriemaßstab für organische Synthesen eingesetzt wird, wird durch den Wechsel auf das neue Modell großes Optimierungspotential gesehen.

Ebenso wurde bisher kein mechanistisches Modell der BAL veröffentlicht. Explizit wurde die Vorhersage der beiden Literaturmodelle (Hildebrand *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006) nicht untersucht, da sie unter anderem durch eine falsche Definition der Gleichgewichtskonstanten (Stillger *et al.*, 2006) offensichtlich schlechte Vorhersagen liefern würden. Im zweiten Fall wurde fälschlicherweise die Michaelis-Menten-Gleichung für die Bestimmung der kinetischen Parameter zweier identischer Substrate angewandt (Hildebrand *et al.*, 2007), obwohl es sich um eine bimolekulare Reaktion handelt. Im Gegensatz dazu wurde ein neues

Modell entwickelt, das die beschriebenen Mängel behob. Dadurch wurden sehr gute Modellvorhersagen möglich, was die Grundlage für jede rationale Prozessführung ist.

Die thermodynamischen Gleichungen wurden – wenn möglich – der Literatur entlehnt. Es stellte sich heraus, dass die meisten Gleichungen bekannt und häufig angewandt wurden. So wurde der Einfluss der Temperatur durch die Arrheniusgleichung, durch einen Deaktivierungsterm und durch Van't Hoff'sche Gleichungen modelliert. Um den pH-Einfluss mathematisch zu beschreiben, waren ein Aktivierungs- und Inaktivierungsterm notwendig. Die Ionenstärke konnte durch eine Funktion in Anlehnung an die Debye-Hückel-Gleichung berücksichtigt werden. Um die komplexe Natur des Einflusses von DMF auf die Enzymkinetik zu modellieren, wurde eine empirische Funktion gewählt. Die Wahl fiel auf eine abgeänderte Gaußfunktion, da die Gleichung nur zwei Parameter benötigte, wovon ein Parameter eine physikalische Bedeutung hatte, und die experimentellen Daten mit hoher Genauigkeit beschreiben konnte. Alle Gleichungen wurden in einem umfassenden Modell zusammengefasst und ließen so exzellente Vorhersagen des gesamten Reaktionsverlaufes bei jeder untersuchten Kombination von Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und DMF-Konzentration zu.

Eine analoge Methodik ist bisher selbst bei anderen Enzymreaktionen in dem vorliegenden Detailgrad nicht bekannt. Allerdings wurde häufiger nur der Einfluss der Temperatur und/oder des pH-Werts auf die Enzymkinetik modelliert. Dabei wurden im Wesentlichen zwei Unterschiede festgestellt. Zum einen behandelten die meisten vergleichbaren Arbeiten einfache irreversible unimolekulare Reaktionsmechanismen (vgl. Ho und Humphrey, 1970; Illanes *et al.*, 2000; Jurado *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 1989), weshalb diese Ergebnisse evtl. auf viele Reaktionen nicht übertragbar sind. Außerdem wurde häufig der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf einen oder mehrere K_m-Wert(e) nicht untersucht (vgl. Daniel *et al.*, 2001; Eisenthal *et al.*, 2006; Flaschel, 2006; Kadam *et al.*, 2004). Um diesen Sachverhalt näher zu erläutern, muss auf die mathematischen Zusammenhänge der Enzymkinetik zurückgegriffen werden. Dies wird anhand einer Arbeit erklärt, die am ehesten mit der vorliegenden vergleichbar ist. Hierbei handelt es sich um die Veröffentlichung von Willeman *et al.* (2002), die ebenfalls ein ThDP-abhängiges Enzym untersuchten, welches dem gleichen Reaktionsmechanismus folgt wie die BAL. Sie analysierten die enzymatische Synthese von (*R*)-Mandelonitril durch eine Hydroynitrillyase und modellierten die Temperaturabhängigkeit der Wechselzahl sowie der Gleichgewichtskonstanten. Der Einfluss auf K_{mA}, K_{iA}, K_{mB}, K_{mP} und K_{iP} wurde vernachlässigt. Aus den verwandten makrokinetischen Parametern und den entsprechenden mikrokinetischen Zusammenhängen (Tabelle 3.13) kann eine eindeutige mathematische Lösung bestimmt werden: $k_{-1} = k_3$. Diese Lösung führt zu einem Sonderfall, bei dem $K_{mP} = K_{iP}$ und $K_{mA} = K_{iA}^{-1}$ ist. Da in der Studie sieben anstelle von vier unabhängigen Parameter verwandt wurden, ist das Gleichungssystem stark überbestimmt. An dieser Stelle muss betont werden, dass das Gleichungssystem bereits einen abhängigen

Parameter enthält, selbst wenn der hergeleitete Sonderfall nicht auftreten würde, da der allgemeine Bi-Uni Mechanismus durch 6 mikrokinetische und somit auch 6 makrokinetische unabhängige Parameter bestimmt ist.

Tabelle 3.13: Zusammenhang der makro- und mikrokinetischen Parameter und angenommener Temperatureinfluss auf die kinetischen Parameter in der Arbeit von Willeman *et al.* (2002).

makrokinetische Parameter	mikrokinetische Parameter	Annahme
k_{cat}	k_3	temperaturabhängig
K_{eq}	$\frac{k_1 \cdot k_2 \cdot k_3}{k_{-1} \cdot k_{-2} \cdot k_{-3}}$	temperaturabhängig
K_{mA}	$\frac{k_3}{k_1}$	konstant
K_{iA}	$\frac{k_1}{k_{-1}}$	konstant
K_{mB}	$\frac{k_3 + k_{-2}}{k_2}$	konstant
K_{mP}	$\frac{(k_3 + k_{-2}) \cdot k_{-1}}{(k_{-1} + k_{-2}) \cdot k_{-3}}$	konstant
K_{iP}	$\frac{k_3}{k_{-3}}$	konstant

Zuletzt wurde zum ersten Mal der Stofftransport für die BAL-katalysierte Carboligation quantifiziert und darüberhinaus die wichtigsten Einflüsse der thermodynamischen Zustandsvariablen auf die Dynamik der untersuchten Zweiphasensysteme systematisch untersucht und modelliert.

3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen (BAL)

In den vorherigen Kapiteln wurde die Enzymreaktion ausführlich untersucht. Um die Vorteile eines Zweiphasensystems auszunutzen, wurde außerdem untersucht, welche Auswirkungen die Änderung der Reaktionsbedingungen auf den Stofftransport und das Verteilungsgleichgewicht haben. Alle kinetischen und thermodynamischen Phänomene wurden

modelliert. Die Modellparameter konnten durch Auswertung dynamischer Experimente ermittelt werden. Dadurch wurde die Grundlage für den technisch wichtigsten Schritt geschaffen: Die Enzymreaktion sollte optimiert werden.

Um die Vorzüge der hier präsentierten Vorgehensweise zu demonstrieren, wurden verschiedene Szenarien anhand von Fallbeispielen erwogen und die besten Reaktionsbedingungen modellgestützt berechnet. Nach Abbildung 1.6 können drei grundsätzlich unterschiedliche Faktoren optimiert werden. (1) Zu den enzymspezifischen Faktoren zählen etwa stabilere Enzymmutanten, die nicht Thema dieser Arbeit waren. (2) Reaktionsspezifische Maßnahmen beinhalten die Reaktionsbedingungen, wie z.B. Temperatur und pH-Wert. Dieser Punkt wird in Kapitel 3.2.1 behandelt. (3) Die Reaktorgeometrie und die damit verbundenen Variationen der Phasengrenzfläche und des Phasenverhältnisses bilden verfahrenstechnische Möglichkeiten, um die Produktivität zu erhöhen. Dies wird in Kapitel 3.2.2 verdeutlicht.

Die Produktkonzentration am Ende der Reaktion kann erhöht werden, indem die Enzymkonzentration E vergrößert oder die Reaktionsdauer t_R verlängert wird. Solange die Inaktivierung zu vernachlässigen ist, hängen E und t_R umgekehrt proportional voneinander ab. Unter diesen Umständen ist $v \sim E \cdot t_R$. Aus diesem Grund wurden jeweils die optimalen Bedingungen für unterschiedliche Werte von $E \cdot t_R$ ermittelt.

3.2.1 Maximierung der RZA durch reaktionsspezifische Maßnahmen

Im 1. Fallbeispiel wurde im Einphasensystem für verschiedene Kombinationen an E und t_R die vier Einflussfaktoren Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und DMF-Konzentration so optimiert, dass die RZA maximal wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment und stellt die maximal mögliche RZA dar unter der Voraussetzung, dass die Reaktionsbedingungen geeignet eingestellt werden (die entsprechenden Einstellungen dazu werden im nächsten Absatz präsentiert). Je größer $E \cdot t_R$ war, desto höhere RZA waren erreichbar. Ab einem gewissen Wert brachte eine weitere Erhöhung von $E \cdot t_R$ jedoch keine Verbesserung der Produktivität. Wie erwartet sinkt bei gleichem $E \cdot t_R$ jedoch steigender Reaktionsdauer die RZA. Die Produktkonzentration am Ende der Reaktion war hingegen bei gleichem $E \cdot t_R$ etwa gleich. Diese Beobachtung kann durch die oben erwähnte Proportionalität von $E \cdot t_R$ erklärt werden.

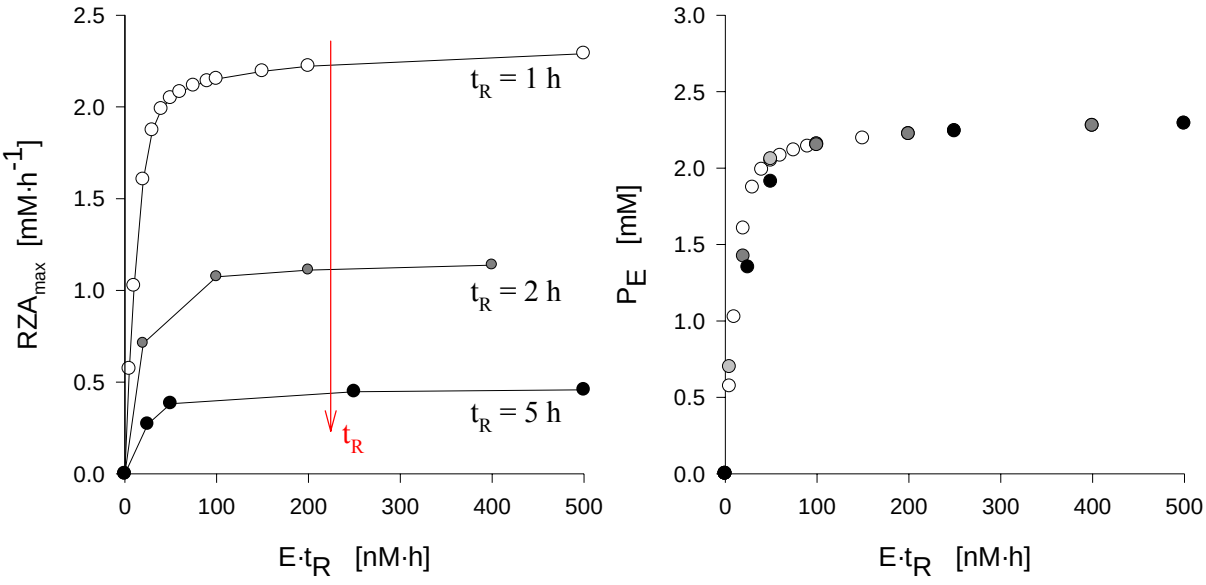


Abbildung 3.29: Maximierte RZA (links) und die entsprechende Produktkonzentration (rechts) bei verschiedenen Werten von *E* und t_R. Die Freiheitsgrade der Optimierung waren Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und DMF-Konzentration.

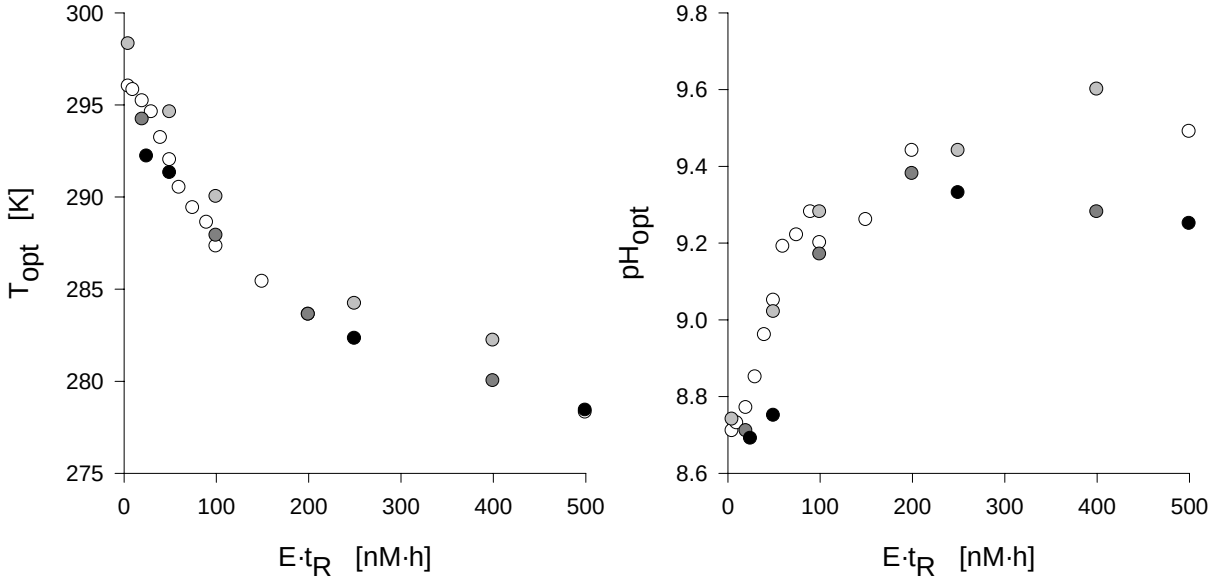


Abbildung 3.30: Optimale Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit von $E \cdot t_R$ im Einphasensystem.

Wurden nun die ermittelten optimalen Einstellungen für jeden Punkt untersucht, so zeigte sich, dass die Ionenstärke 25 mM und der DMF-Gehalt 14,8 % (v/v) betragen sollte. Diese Werte wurden in allen *in silico*-Experimenten empfohlen. Im Gegensatz dazu stellte sich überraschenderweise heraus, dass stets unterschiedliche Reaktionsbedingungen für

Temperatur und pH-Wert empfohlen wurden (Abbildung 3.30). Ausgehend von niedrigem $E{\cdot}t_R$, bei dem vergleichsweise hohe Temperaturen in Kombination mit niedrigeren pH-Werten empfohlen werden, verschieben sich die optimalen Bedingungen zu niedrigerer Temperatur und alkalischerem pH-Wert, wenn bei hohem $E{\cdot}t_R$ gearbeitet wird. In dieser Abbildung sind viele weitere Informationen enthalten, deren Erklärung aufgrund der Komplexität recht umfangreich ist. Deshalb wird dieser Zusammenhang zunächst im Zweiphasensystem aus Puffer-Hexan untersucht und an späterer Stelle nochmals aufgegriffen, um ihn gebündelt mit den weiteren Beobachtungen zu erläutern.

Das Zweiphasensystem stellt gleichzeitig das 2. Fallbeispiel dar. In diesem Reaktionssystem wurde qualitativ der gleiche Zusammenhang beobachtet. Wie zuvor stellt jeder Punkt das Ergebnis eines eigenen *in silico*-Versuchs dar (Abbildung 3.31). Wieder steigt die maximal mögliche RZA mit zunehmendem $E{\cdot}t_R$ und sinkt mit zunehmender Reaktionsdauer bei gleichem $E{\cdot}t_R$. Quantitativ wurden jedoch folgende Unterschiede vorgefunden: Die maximal mögliche RZA erreicht erst bei höherem $E{\cdot}t_R$ einen Sättigungswert. Der absolute Wert der RZA ist dabei deutlich kleiner, d.h. in dem untersuchten Zweiphasensystem verschlechterte sich die RZA im Vergleich zum Zweiphasensystem. Außerdem waren die Produktivitäts-unterschiede weniger stark ausgeprägt, wenn t_R erhöht wurde. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Reaktion stofftransportlimitiert war. Durch Vergrößerung der Stoffaustauschfläche konnte diese Annahme bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Welche Reaktionsbedingungen für die einzelnen Versuche im Zweiphasensystem empfohlen werden, stellt Abbildung 3.31 dar. Auch hier wurde ein ähnlicher Zusammenhang wie im Beispiel zuvor beobachtet. Die Ionenstärke sollte in allen Versuchen auf 25 mM eingestellt werden, um maximale RZA zu erreichen. Im Gegensatz zum Einphasensystem wurden jedoch auch unterschiedliche DMF-Konzentrationen vorgeschlagen, die sich in Abhängigkeit von $E{\cdot}t_R$ änderten. Außerdem fielen im Gegensatz zum vorherigen Beispiel die Verläufe von T_{opt}, pH_{opt} und DMF_{opt} nicht auf einer Linie zusammen, wenn t_R variiert wurde. Das bedeutet, dass die optimalen Bedingungen sensitiver auf solche Systemänderungen reagieren.

Zusammenfassend konnte anhand der zwei Fallbeispiele gezeigt werden, dass die maximal mögliche RZA im Einphasensystem bei vergleichbarer Enzymkonzentration und Reaktionsdauer stets größer ist. Ab $E{\cdot}t_R \approx 100$ nM·h kann die RZA durch Zugabe einer höheren Katalysatorkonzentration kaum erhöht werden. Im Zweiphasensystem ist dieser Grenzwert erst ab etwa 600 nM·h erreicht. Zu beiden Seiten des Grenzwerts ist die Reaktion unökonomisch, da links davon die RZA sinkt, und rechts davon Enzym verschwendet wird. Basierend auf diesen Ergebnissen können für organische Synthesen jeweils ein geeignetes Arbeitsfenster ermittelt werden: Im Einphasensystem beträgt der optimale Temperaturbereich 287 bis 290 K, der als Schnittfläche mit der Punktwolke ausgehend von 100 nM·h bestimmt wurde. Der zugehörige pH-Bereich lag zwischen 9,17 und 9,28. Im Zweiphasensystem wurden die optimalen Reaktionsbedingungen ausgehend von 600 nM·h bestimmt. Hier

können Temperaturen zwischen 295 und 301 empfohlen werden. Der optimale pH-Bereich befindet sich zwischen 7,9 und 8,4. Die DMF-Konzentration sollte auf 14 bis 22 % (v/v) eingestellt werden. Die genauen Werte sind dabei der Reaktionsdauer anzupassen.

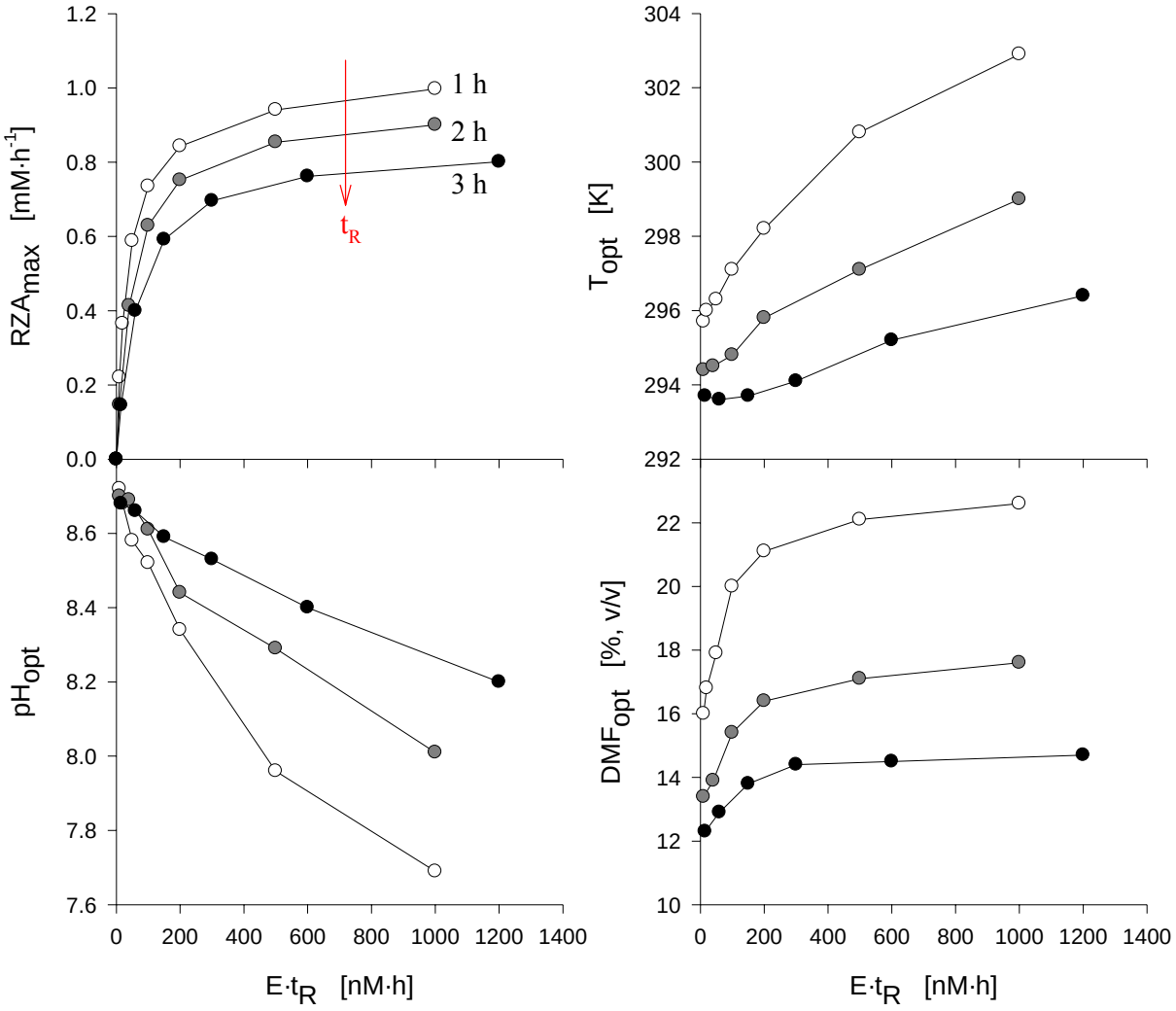


Abbildung 3.31: Maximierte RZA in Puffer-Hexan bei verschiedenen Werten von E und t_R (oben links). Optimale Temperatur (oben rechts) und pH-Wert (unten links) bzw. DMF-Konzentration (unten rechts).

Nun wurde die Frage beantwortet, weshalb unterschiedliche Kombinationen aus Temperatur und pH-Wert und zusätzlich im Zweiphasensystem der DMF-Konzentration in Abhängigkeit von E und t_R empfohlen wurden. In diesem Zusammenhang bekannt ist die Tatsache, dass ein sog. Temperaturoptimum bei der Bestimmung von Reaktionsanfangsraten als Kompromiss von Aktivität und Stabilität entsteht. Weiterhin ist bekannt, dass sich dieses Optimum je nach Messdauer unterscheidet. Da dieser Zusammenhang für die Beurteilung von Reaktionsanfangsraten und nicht für die Produktkonzentration am Ende einer reversiblen

Reaktion bekannt ist, wurde zunächst der Temperatureinfluss für die vorliegende Reaktion im Einphasensystem isoliert von den restlichen Einflüssen untersucht.

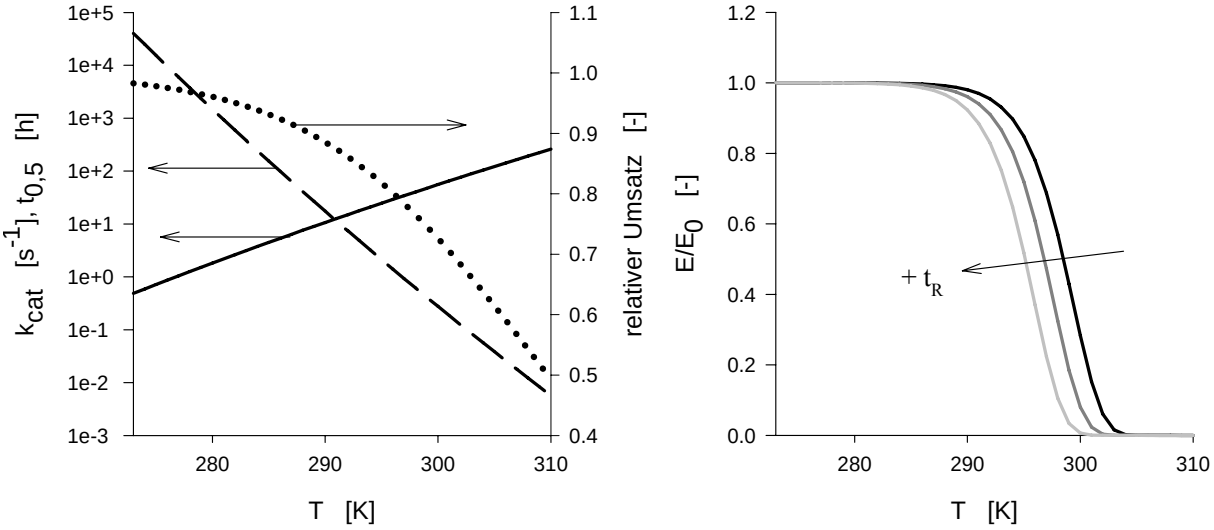
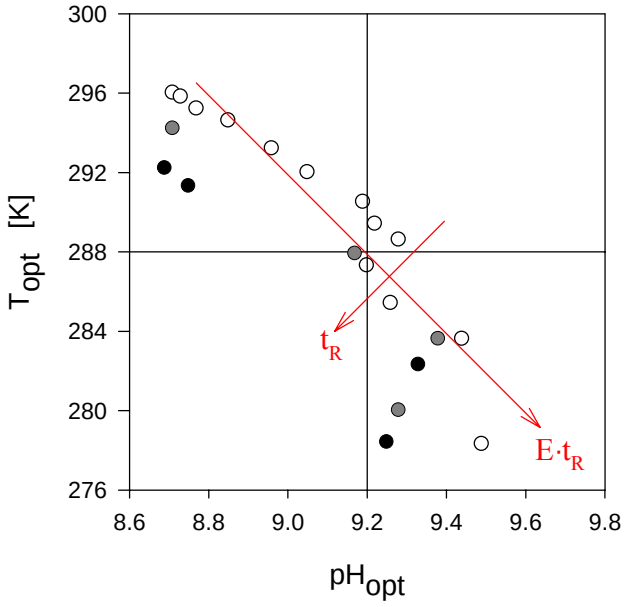


Abbildung 3.32: Temperaturoptimum einer reversiblen Reaktion als Kompromiss von Aktivität (——), Stabilität (— —) und thermodynamischem Gleichgewicht (·····) (links). Einfluss der Reaktionsdauer auf die aktive Restenzymkonzentration (rechts).

Dazu wurde die Aktivität als Funktion der Temperatur aufgetragen. Die Stabilität wurde in Form der Halbwertszeit $t_{0,5}$ ausgedrückt. Da die Gleichgewichtslage von der Temperatur abhing, wurde die bei der entsprechenden Temperatur maximal erreichbare Produktkonzentration berechnet (Abbildung 3.32 links). Es ist zu erkennen, dass die Aktivität (k_{cat}) exponentiell ansteigt, während die Stabilität ($t_{0,5}$) exponentiell abnimmt. Der thermodynamisch erreichbare Umsatz sank, wenn die Temperatur erhöht wurde. Diese zum Teil gegenläufigen Effekte münden in einem optimalen Kompromiss aus Aktivität, Stabilität und der Gleichgewichtslage. In Abbildung 3.32 rechts ist die Restenzymkonzentration als Funktion der Temperatur für unterschiedliche Reaktionszeiten abgebildet. Es ist zu erkennen, dass nach verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Restenzymkonzentrationen vorliegen. Daraus resultiert eine unterschiedliche Gewichtung der Stabilität im Vergleich zur Aktivität und Gleichgewichtslage. Als Konsequenz werden verschiedene optimale Temperaturen bei unterschiedlichen t_R empfohlen. Jedoch kann nicht nur die Stabilität eine unterschiedliche Gewichtung (über t_R) annehmen. Ebenso kann die Aktivität verschieden gewichtet werden, indem beispielsweise die Enzymkonzentration verändert wird. Die Konsequenz ist auch hier ein veränderter optimaler Kompromiss. Da im vorliegenden Fall auch der pH-Wert die Enzymaktivität und -stabilität beeinflusst, ist dieser Zusammenhang ebenfalls auf den pH-Wert übertragbar. Da die Stabilität durch Ionenstärke und DMF-Konzentration nicht beeinflusst wird, erklärt dies, dass diese Werte im Einphasensystem konstant blieben. Hier

wurden erwartungsgemäß diejenigen Werte empfohlen, unter denen maximale Aktivität vorlag. Diese Hypothese ist im Einklang mit allen *in silico*-Versuchen und erklärt das Zustandekommen der verschiedenen optimalen Reaktionsbedingungen. Im Zweiphasensystem äußerten sich zusätzlich der Stofftransport und die Verteilung in komplexer Weise. Aus diesem Grund kann die Beobachtung, dass die optimale DMF-Konzentration sich änderte, nicht erklärt werden.

Weiterhin kann aufgrund der Zeitabhängigkeit der Inaktivierung geschlossen werden, dass bei langen Reaktionen die Inaktivierung eine stärkere Gewichtung annimmt, während bei kurzen Reaktionen eher der positive Effekt der Aktivierung überwiegt. Dies kann in Abbildung 3.33 gesehen werden. In dieser Abbildung wurden die Daten aus dem 1. Fallbeispiel neu aufgetragen und in vier Bereiche unterteilt, die qualitativ beurteilt wurden. Die Kriterien waren dabei, welches Phänomen sich in einer Synthese vorteilhaft oder nachteilig auswirkte. Hier zeigte sich neben weiteren systematischen Effekten, dass mit steigendem t_R zunehmend Bedingungen empfohlen werden, unter denen die BAL sehr stabil ist, und bestätigte damit die aufgestellte Hypothese.



hohe Aktivität geringe Stabilität ungünstiges Gleichgewicht	sehr hohe Aktivität sehr geringe Stab. ungünstiges Gleichgewicht
geringe Aktivität sehr hohe Stabilität günstiges Gleichgewicht	moderate Aktivität hohe Stabilität günstiges Gleichgewicht

Abbildung 3.33: Beurteilung der optimalen Reaktionsbedingungen aus physikalischer Sicht.

3.2.2 Maximierung der RZA durch verfahrenstechnische Maßnahmen

Im dritten und letzten Fallbeispiel sollte untersucht werden, ob durch verfahrenstechnische Maßnahmen die RZA erhöht werden kann. In diesem Zusammenhang wurde das Zweiphasensystem aus Puffer-MIBK untersucht, da die Substratlöslichkeit höher als in Puffer-Hexan war. In MIBK wurden 10-mal höhere DMBA-Konzentrationen gelöst

(250 mM). Im Folgenden sollte durch optimale Einstellung des Phasenverhältnisses $V_{org} \cdot V_{aq}^{-1}$ die RZA maximiert werden.

In Abbildung 3.34 sind im linken Diagramm die höchstmögliche RZA als Funktion von $E \cdot t_R$ dargestellt unter der Voraussetzung, dass das Phasenverhältnis richtig eingestellt wird. Wenn ein anderes Phasenverhältnis gewählt wird, dann sinkt die Produktivität. Es wurde beobachtet, dass die erreichbare RZA abhängig von der Enzymkonzentration war (t_R war in diesen Versuchen konstant). Außerdem wurde beobachtet, dass alle Verläufe früher oder später abflachen und dann durch höhere Enzymkonzentrationen keine Produktivitätssteigerung möglich ist. Auffallend war jedoch, dass durch Vergrößerung der Stoffaustauschfläche deutlich höhere RZA erreicht werden können. Daraus wurde geschlossen, dass die Reaktion ab einer gewissen Katalysatorkonzentration stofftransportlimitiert ist. Diese Limitierung kann dadurch verhindert werden, dass der Stofffluss durch eine größere Stoffaustauschfläche erhöht wird. In dem rechten Diagramm sind die zu jedem Punkt gehörigen optimalen Phasenverhältnisse aufgetragen. Es wurde beobachtet, dass das Phasenverhältnis mit steigender Enzymkonzentration zunahm. Außerdem wurden bei verschiedenen Austauschflächen unterschiedliche Phasenverhältnisse bestimmt. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen empfiehlt das Modell ein geringes Phasenverhältnis um maximale RZA zu erreichen. Bei hohen Enzymkonzentrationen eignet sich hingegen ein großes Phasenverhältnis besser.

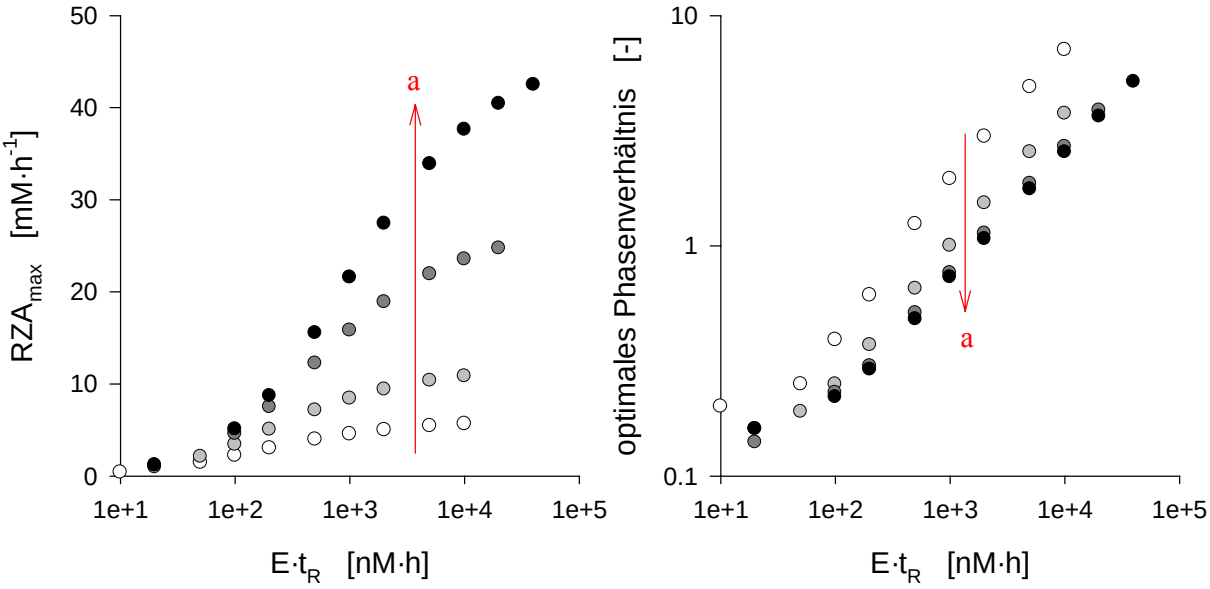


Abbildung 3.34: Maximierte RZA in Puffer-MIBK bei verschiedenen *a*. Der Freiheitsgrad der Optimierung war das Phasenverhältnis.

Aus der modellgestützten Analyse wurde geschlossen, dass die RZA durch die Wahl des Zweiphasensystems aus Puffer-MIBK im Vergleich zu den zuvor untersuchten Systemen

deutlich erhöht werden konnte. Bestimmend für hohe RZA im Zweiphasensystem ist nicht nur die Substratlöslichkeit und das beste Phasenverhältnis, sondern besonders die Größe der Stoffaustauschfläche. Im Beispiel konnten dadurch fast 20-fache Produktivitätssteigerungen erreicht werden.

In einer früheren Arbeit wurde die BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen immobilisiert eingesetzt, um Benzoine zu synthetisieren. Dadurch gelang es eine RZA von bis zu 2,0 $mM \cdot h^{-1}$ zu erreichen (Hischer *et al.*, 2005). Dieser Wert ist etwa vergleichbar zu den hier bestimmten Werten im konstruktionstechnisch unmodifizierten Zweiphasensystem. Weiterhin wurde bereits eine Emulsion aus Puffer und MTBE untersucht, wodurch die Produktivität der BAL auf 4 - 5 $mM \cdot h^{-1}$ gesteigert werden konnte (Stillger, 2004, berechnet nach 1 h). Allerdings war nach den hier gewonnenen Erkenntnissen die Substratanfangskonzentration (A_{org} = 90 mM) als auch das Phasenverhältnis ($V_{org} \cdot V_{aq}^{-1}$ = 1) ungünstig. Deshalb wurden basierend auf den Simulationsergebnissen Experimente rational ausgelegt, um das Optimierungspotenzial auszunutzen. Zwei Experimente wurden mit $V_{org} \cdot V_{aq}^{-1}$ = 4 durchgeführt. Ein Versuch wurde in einem Reaktor mit breiter Grenzfläche (11,3 cm^2) und geringer Bauhöhe bei $E \cdot t_R = 1 \cdot 10^4$ nM·h angesetzt. Im anderen Versuch wurde ein emulgiertes Zweiphasensystem erzeugt, indem der untere Rührer auf 20 s^{-1} eingestellt wurde. Da anzunehmen war, dass die Phasengrenzfläche deutlich größer als im vorherigen Beispiel war, wurde $E \cdot t_R$ auf $1 \cdot 10^5$ nM·h erhöht. Die Reaktionsverläufe wurden per HPLC verfolgt und sind in Abbildung 3.35 gezeigt. Es zeigte sich, dass im ersten Beispiel bereits eine RZA von 19,0 $mM \cdot h^{-1}$ erreicht werden konnte (berechnet nach 1 h). Die Modellvorhersage stellte sich auch hier als recht gut heraus. Durch die Emulgierung der wässrigen Phase in MIBK konnte die Produktivität weiter auf 53,0 $mM \cdot h^{-1}$ gesteigert werden (berechnet nach 1 h). Da die Phasengrenzfläche der Emulsion nicht bestimmt werden konnte, wurde sie durch die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten geschätzt. Während des Versuches konnte außerdem eine Flockenbildung beobachtet werden. Dies wurde auf eine erhöhte Enzyminaktivierung in der Emulsion zurückgeführt. Deshalb wurde auch der Inaktivierungskoeffizient in der Emulsion durch das Modell geschätzt. Dadurch gelang es unter der Annahme, dass der Stofftransportkoeffizient unverändert war, eine effektive Grenzfläche von 69,6 ± 3,1 cm^2 zu ermitteln, was zu der hohen Produktivität führte. Allerdings war der geschätzte Inaktivierungskoeffizient mit $(1{,}06 \pm 0{,}05) \cdot 10^{-3}$ s^{-1} etwa um das 3,4-fache größer als im konventionellen Zweiphasensystem. Woher die starke Inaktivierung in der Emulsion resultierte, ist bisher ungeklärt. Allerdings wurde in Kapitel 3.1.5.1 die Schlussfolgerung gezogen, dass von Puffer-MIBK keine Phasen- oder molekulare Toxizität zu erwarten war. Dies deutet darauf hin, dass die BAL wahrscheinlich durch die hohe mechanische Belastung inaktiviert wird.

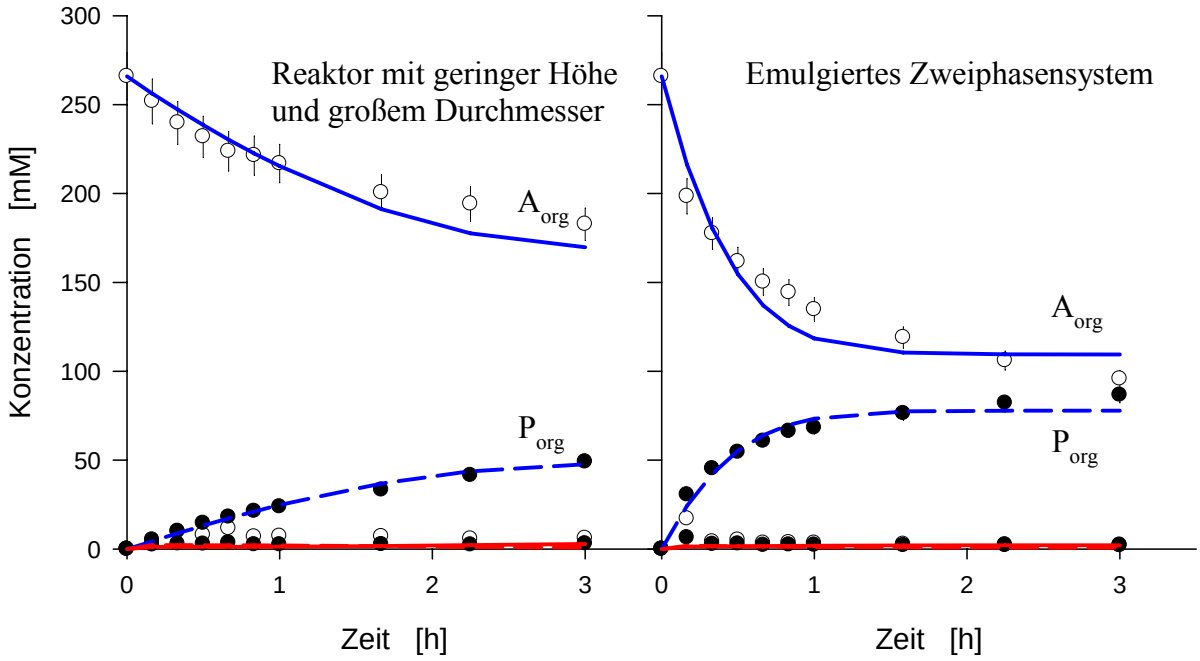


Abbildung 3.35: Organische Synthesen im optimierten Puffer-MIBK-System. Modellvorhersage (Linien) und gemessene Konzentrationen (Punkte). Folgende Konzentrationen wurden gemessen: A_{aq}: rot durchgezogene Linie; P_{aq}: rot gestrichelte Linie; A_{org}: blau durchgezogene Linie; P_{org}: blau gestrichelte Linie.

3.2.3 Konsequenzen für technische Anwendungen

Verschiedene Veröffentlichungen deuteten bereits an, dass die optimalen Reaktionsbedingungen von bestimmten Nebenbedingungen abhängen (Ho und Humphrey, 1970; Illanes *et al.*, 2000; Willeman *et al.*, 2002). Dabei wurde insbesondere die Reaktionsdauer als kritischer Faktor hervorgehoben. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Sachverhalt weiter untersucht und es konnte nun gezeigt werden, dass diese Beobachtungen auch auf reversible Reaktionen übertragbar sind. Außerdem waren neben der optimalen Temperatur auch der optimale pH-Wert und im Zweiphasensystem die optimale DMF-Konzentration abhängig von der Reaktionsdauer. Anschließend konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass neben der Reaktionsdauer auch die Katalysatorkonzentration die Lage der Optima bestimmt, und weiterhin erklärt werden, dass diejenigen optimalen Reaktionsbedingungen variabel sind, die sowohl Aktivität als auch Stabilität beeinflussen. Die Komplexität des Zweiphasensystems erschwerte allerdings eine rationale Erklärung dafür, weshalb auch DMF variabel war. Mit großer Wahrscheinlichkeit hängt dies damit zusammen, dass DMF sowohl die Enzymaktivität als auch den Stofftransport beeinflusst.

Wenn die Enzymkonzentration die Lage der optimalen Bedingungen durch unterschiedliche Gewichtung der Aktivität im Verhältnis zur Stabilität und Gleichgewichtslage verschiebt, so

kann als Konsequenz eine weitere Schlussfolgerung gezogen werden: Die Aktivität kann beispielsweise auch durch die Ionenstärke beeinflusst und so anders gewichtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die optimalen Reaktionsbedingungen auch von den Bedingungen beeinflusst werden, die nur die Aktivität beeinträchtigen.

Im letzten Beispiel konnte zudem gezeigt werden, dass das optimale Phasenverhältnis ebenfalls von $E{\cdot}t_R$ abhängt. Da das beste Phasenverhältnis außerdem von der Stoffaustauschfläche abhing, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass ebenso verfahrenstechnische Maßnahmen die Lage der optimalen Betriebsbedingungen beeinflussen. Da a direkt proportional zum Stofftransport ist, kann der gleiche Effekt durch Erhöhung des Stofftransportkoeffizienten (bspw. durch höhere Rührergeschwindigkeit) erzielt werden. Eine weitere Größe, die hier nicht präsentiert wurde, jedoch einen ähnlichen Effekt bewirkte, ist die Reaktorgröße, da bei geometrischer Ähnlichkeit das Verhältnis aus Volumen und Grenzfläche nicht gleich bleibt, wenn der Maßstab verändert wird. Nach den vorliegenden Erkenntnissen wäre insbesondere die Emulgierung der organischen Phase für effiziente Synthesen zu empfehlen, da dadurch eine sehr große Austauschfläche ermöglicht wird. Diese Schlussfolgerung konnte im letzten Schritt experimentell verifiziert werden. Durch die modellgestützte Optimierung gelang es, wesentlich höhere Produktivitäten als in bisherigen Arbeiten zu erreichen.

Zusammenfassend wurde demonstriert, dass die optimalen Reaktionsbedingungen durch Änderung des Prozesses oder konstruktionstechnische Abweichungen schnell aus dem optimalen Bereich driften. Um den damit verbundenen Produktivitätseinbruch zu kompensieren, sollten bei jeder Änderung die Auswirkungen auf den Prozess simuliert und ggfs. die optimalen Bedingungen neu berechnet werden. Kann nicht auf ein Modell zurückgegriffen werden, müssen Experimente durchgeführt werden, um einen suboptimalen Prozess zu vermeiden. Da die modellgestützte Lösung die Zahl von zeit- und kostenaufwändigen Versuchen verringert, ist diese Methode der empirischen Vorgehensweise vorzuziehen.

3.3 Biochemischer Vergleich mit anderen Arbeiten (BAL)

Im letzten Kapitel werden die bisher gewonnen Ergebnisse in den Zusammenhang der aktuellen Forschungen gestellt und Schlussfolgerungen aus biochemischer Sicht gezogen. Dabei werden zum Teil bisher nicht beschriebene Ergebnisse gezeigt, die im Zuge der modellgestützten Analyse aufgedeckt werden konnten. Motiviert von deren Wichtigkeit für weitere Arbeiten, sollten diese Beobachtungen in diesem Kapitel abgehandelt werden.

3.3.1 Vergleich der Temperaturabhängigkeit

In der Literatur wurde eine Aktivierungsenergie von 17 $kJ \cdot mol^{-1}$ berechnet, indem die Arrheniusgleichung an das Temperaturprofil bis zum Temperaturmaximum angepasst wurde (Janzen, 2002). Im Gegensatz dazu lag die Aktivierungsenergie hier bei fast 120 $kJ \cdot mol^{-1}$. Zwei Gründe mögen den Unterschied erklären: (1) In der Literatur waren die untersuchten Reaktionspartner nicht substituiert, sondern es wurde das Reaktionssystem Benzaldehyd/Benzoin untersucht. (2) Der Literaturwert könnte verfälscht sein, da die Aktivität im Temperaturmaximum deutlich von der Inaktivierung überlagert ist. Abgesehen davon weisen die hier ermittelte Aktivierungs- sowie Inaktivierungsenergie von knapp 300 $kJ \cdot mol^{-1}$ für Enzymreaktionen typische Werte auf, das die Richtigkeit der hier bestimmten Werte stützen mag.

3.3.2 Ionenstärke – eine missachtete Größe

Es ist bekannt, dass viele Enzyme durch die Ionenstärke beeinflusst sind. Aus diesem Grund ist die Ionenstärke als kritische Variable bei enzymkinetischen Messungen zu sehen (Laidler und Bunting, 1973). Trotzdem wird sie nur in seltenen Fällen beachtet (Dale und White, 1983). Auch in den Arbeiten, die sich mit der BAL befasst hatten, blieb die Ionenstärke unberücksichtigt. Das führte soweit, dass in den meisten Publikationen die Versuche mit konstanter Pufferkapazität durchgeführt wurden, während die Ionenstärke sich änderte, wenn unterschiedliche pH-Werte eingestellt wurden (Nemeria *et al.*, 2007; Stillger *et al.*, 2006; Janzen *et al.*, 2006; Dominguez de Maria *et al.*, 2006). Bei Phosphatpuffer, der in den meisten Arbeiten Verwendung fand, kann sich die Ionenstärke bis um das 3-fache verändern. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Kinetik der BAL stark von der Ionenstärke abhängt und dieses Ergebnis stellt aufgrund der beschriebenen Problematik die bisher veröffentlichten pH-Aktivitäts-Profile in Frage.

Um Sekundäreffekte in den hier durchgeführten Experimenten auszuschließen, wurde die Ionenstärke nur durch KPi eingestellt anstatt Fremdionen in den Reaktionsansatz zu bringen. Sekundäreffekte können durch chaotrope oder kosmotrope Salze hervorgerufen werden. Chaotrope Salze (z.B. Ba^{2+}, Ca^{2+}) können beispielsweise zur Denaturierung von Proteinen führen (Voet und Voet, 2004).

3.3.3 DMF – die Lösung?

In den Arbeiten mit BAL sind wässrige DMSO-Lösungen etabliert. 17 – 40 % (v/v) DMSO vermochten die hydrophoben Reaktanden ausreichend zu lösen (z.B. Demir *et al.*, 2003; Demir *et al.*, 2002; Hischer *et al.*, 2005; Janzen *et al.*, 2006; Nemeria *et al.*, 2007; Stillger *et*

al., 2006). Hier wurde DMF als Alternative zu DMSO vorgestellt. Untersuchungen zeigten, dass TMB in 25 % (v/v) DMF etwa doppelt so gut löslich ist wie in 30 % (v/v) DMSO (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde dieser Vorteil auf Kosten der Stabilität erkauft. Unter Prozessbedingungen war die BAL in DMF um den Faktor 3 instabiler als in DMSO (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Welches ist das wahre pH-Maximum?

Bei allen untersuchten pH-Werten waren im vorliegenden Fall K_{mB}, K_{mP} und K_{eq} konstant. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das pH-Maximum für die Carbolyse und Carboligation gleich ist. Aus dem physikalischen Zusammenhang folgte außerdem, dass sich k_{cat} proportional zu $k_{cat,r}$ verhalten musste. Diese Beobachtungen und Schlüsse standen im Einklang mit Literaturdaten: K_{mP} war innerhalb der Messschwankungen bei pH 6,0 und 8,0 gleich (Nemeria *et al.*, 2007). Außerdem berichteten Janzen *et al.* (2006), dass zum einen das pH-Maximum für die Hin- und Rückreaktion etwa gleich ist. Zum anderen präsentierten sie ähnliche pH-Aktivitäts-Profile für die Carbolyse und Carboligation, was die Proportionalität von k_{cat} proportional zu $k_{cat,r}$ bestätigte.

Die absolute Lage des pH-Maximums ist bisher jedoch nicht bekannt, da sich die Angaben in der Literatur stark unterscheiden. Die ermittelten pH-Maxima und pKs-Werte verschiedener Arbeiten sind in Tabelle 3.14 gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass pH_{opt} bzw. *pKs* bis zu annähernd 3 Einheiten voneinander abwichen. Gute Übereinstimmung wurde mit den Arbeiten von de Maria *et al.* (2006) und Stillger at al. (2006) vorgefunden. Aus der Reihe schlagen insbesondere Nemeria *et al.* (2007), aber auch Janzen *et al.* (2006) veröffentlichte Werte, die sich stark von den anderen Ergebnissen unterschieden.

Zum Teil mögen die Messungen in der Literatur von den bereits beschriebenen Ionenstärke-Effekten überlagert sein. Zum Teil deuteten weitere Informationen darauf hin, dass DMSO eine bedeutende Rolle spielen könnte. Einerseits zeichnet sich eine Systematik ab, wenn pH_{max} in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration betrachtet wird. Andererseits sprechen bisher nicht präsentierte Messergebnisse dafür: Wurde DMSO als organisches Lösungsmittel in der vorliegenden Arbeit untersucht, so unterschied sich das kombinierte Modell nur durch die thermodynamische Beziehung von $k_{cat}(DMSO)$. Die identifizierte Gleichung beschrieb gesamte Reaktionsverläufe gut, wenn nur jeweils ein Einflussfaktor variiert wurde. Wurden jedoch Verlaufskurven gemessen, bei denen DMSO-Konzentration und pH-Wert gleichzeitig variiert wurden, dann unterschieden sich die Simulationen von den gemessenen Kurven (Daten nicht gezeigt). Dies deutete auf eine Wechselwirkung zwischen der DMSO-Konzentration und dem pH-Wert hin.

Tabelle 3.14: pH-Maxima in der Literatur unter Angabe der DMSO-Konzentration. [1]Dissoziationskonstanten wurden zum Teil aus den veröffentlichten Daten geschätzt. [2]DMSO-Lösung lag in Phosphatpuffer mit konstanter Ionenstärke von 50 mM vor. [3]DMSO-Lösungen lagen in 50 mM Phosphatpuffer vor. [4]DMSO-Lösungen lagen in 10 mM Phosphatpuffer vor. [5]DMSO-Lösung lag in 50 mM 3-Komponenten-Puffer vor.

pH_{max}	pKs_1	pKs_2	*DMSO* [%, v/v]	Referenz
9,46	7,99	10,92	30[2]	diese Studie
9,5	8,0 – 8,5[1]	10,5 – 11,0[1]	30[3]	Dominguez de Maria *et al.*, (2006)
9,0	8,0 – 8,3[1]	10,0 – 10,3[1]	30[4]	Stillger at al., 2006
6,5 – 7,5	5,35	8,50	17[5]	Nemeria *et al.*, 2007
8,0	7,0 – 7,5[1]	9,0 – 10,5[1]	0[3]	Janzen *et al.*, 2006

3.3.5 *DMSO* und *pH* – zwei korrelierte Größen?

Um die Vermutung zu überprüfen, dass bei den Aktivitätsmessungen der BAL die DMSO-Konzentration und der pH-Wert korreliert waren, wurden pH-Aktivitäts-Profile bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen aufgenommen (Abbildung 3.36). Es zeigte sich, dass die Aktivität im pH-Maximum zunächst mit der DMSO-Konzentration zunimmt. Bei etwa 25 % ist die maximale Aktivität am größten. Anschließend nimmt sie wieder ab. Außerdem wurde beobachtet, dass die pH-Aktivitäts-Profile sich systematisch zu alkalischen pH-Werten verschoben, wenn die DMSO-Konzentration erhöht wurde. Um die Säurekonstanten bei den verschiedenen DMSO-Konzentrationen zu bestimmen, wurden die pH-Aktivitäts-Profile jeweils getrennt mathematisch ausgewertet:

$$k_{cat}(pH, DMSO) = \frac{k_{\max}(DMSO)}{1 + 10^{pKs_1(DMSO) - pH} + 10^{pH - pKs_2(DMSO)}} \tag{3.54}$$

wobei $k_{cat}(pH,DMSO)$, $pKs_1(DMSO)$ und $pKs_2(DMSO)$ die analogen Definitionen zu Gleichung (3.25) annehmen. Hier wurden die Konstanten jedoch für unterschiedliche DMSO-Konzentrationen ermittelt. $k_{max}(DMSO)$ ist proportional zur Wechselzahl im pH-Optimum. Da die pH-Aktivitäts-Profile symmetrisch waren, konnte aus dem Mittelwert der beiden pKs-Werte das pH-Optimum (pH_{max}) berechnet werden.

In Tabelle 3.15 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Danach ist zu erkennen, dass k_{max} am größten bei 25 % (v/v) DMSO ist. Die Säurekonstante pKs_1 steigt mit zunehmender DMSO-

Konzentration, während pKs_2 annähernd konstant bleibt. Als Folge verschmälern sich die pH-Aktivitäts-Profile und das pH-Optimum rückt in den alkalischen Bereich.

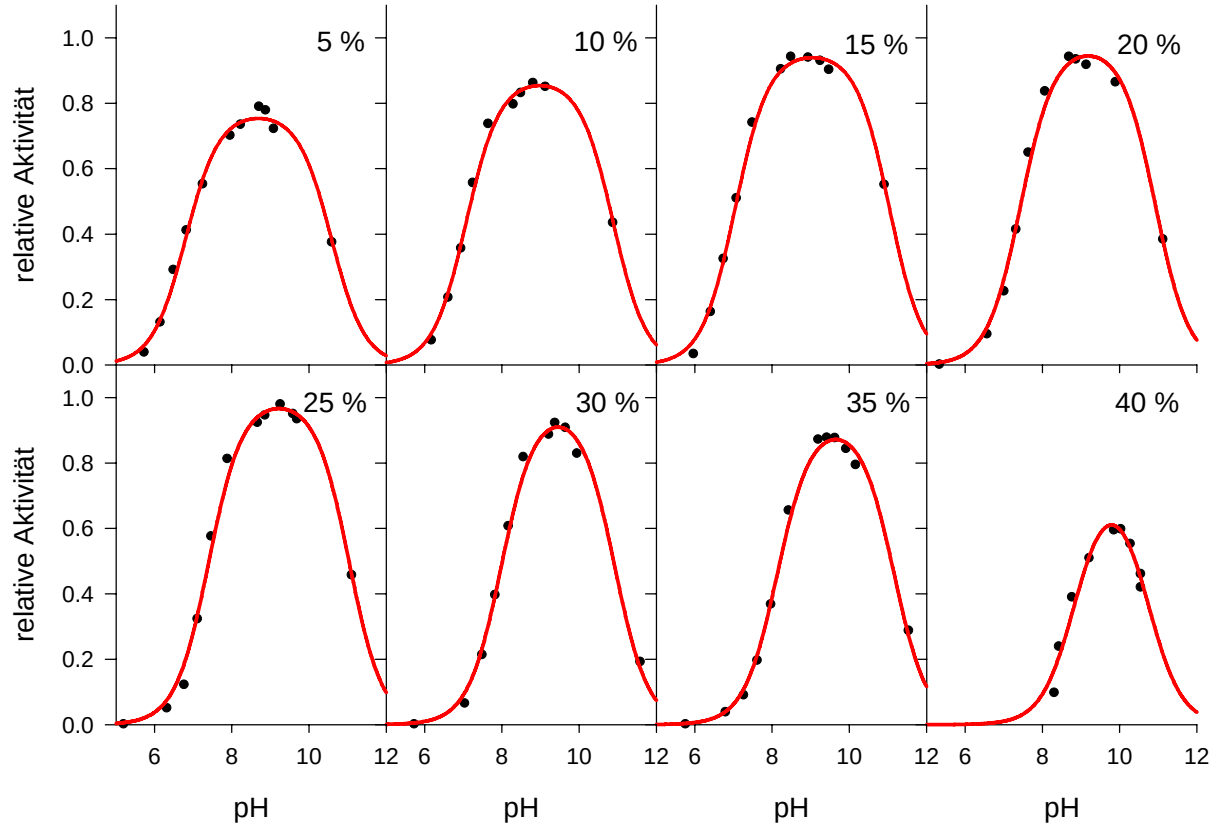


Abbildung 3.36: Einfluss der DMSO-Konzentration auf die Aktivität der BAL.

Tabelle 3.15: Einfluss von DMSO auf k_{max}, pKs_1, pKs_2 und pH_{maxt} der BAL.

[%]	k_{max}	pKs_1	pKs_2	pH_{max}
5	0,77 ± 0,01	6,81 ± 0,04	10,58 ± 0,06	8,70 ± 0,05
10	0,88 ± 0,01	7,08 ± 0,04	10,88 ± 0,05	8,98 ± 0,05
15	0,96 ± 0,01	7,04 ± 0,03	11,04 ± 0,04	9,04 ± 0,04
20	0,98 ± 0,02	7,44 ± 0,04	10,93 ± 0,06	9,19 ± 0,05
25	1,00 ± 0,02	7,40 ± 0,04	11,04 ± 0,07	9,22 ± 0,06
30	0,97 ± 0,02	7,99 ± 0,04	10,92 ± 0,09	9,46 ± 0,07
35	0,93 ± 0,02	8,14 ± 0,04	11,16 ± 0,06	9,65 ± 0,05
40	0,75 ± 0,06	8,85 ± 0,10	10,73 ± 0,13	9,79 ± 0,12

Durch die modellgestützte Auswertung von pH-Aktivitäts-Profilen bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen konnte erstmalig gezeigt werden, dass DMSO den Wert von pKs_1 verändert. Dieser Effekt kann der Ausbildung von starken Wasserstoffbindungen zwischen dem basischen Sauerstoffatom von DMSO und den sauren Protonen von Wasser zugeschrieben werden, wodurch sich die physiko-chemischen Eigenschaften von Wasser drastisch ändern können (Safford *et al.*, 1969). In der Literatur sind viele Beispiele bekannt, in denen die Dissoziationskonstanten von Säuren durch DMSO beeinflusst wurden (Bordwell, 1988). Allerdings wurde wenig über einen ähnlichen Effekt in Enzymen berichtet. Ein Beispiel findet sich allerdings in der Veröffentlichung von Kruusma *et al.* (2007).

Es wurde eingangs beschrieben, dass unterschiedliche pH-Maxima in der Literatur zu finden sind (Tabelle 3.14). Diese wurden z.T. bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen bestimmt. Eine Erklärung der Unterschiede blieb bisher aus. Zum ersten Mal konnte nun das pH-Maximum mit der DMSO-Konzentration korreliert werden und so eine rationale Erklärung für die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse gegeben werden. Da die Ionenstärke in den Versuchen nicht konstant gehalten wurde (siehe Anmerkungen in Tabelle 3.14), können die ermittelten Werte zusätzlich von Ionenstärke-Effekten überlagert sein. Dies wurde bereits an früherer Stelle beschrieben und könnte die Abweichungen von den hier ermittelten Werten in Tabelle 3.15 erklären.

Wegen des komplexen Einflusses der DMSO-Konzentration auf k_{max} und pKs_1 und der bisher ungewissen Auswirkung auf die Bindungskonstanten wurde verzichtet, den Einfluss auf den Reaktionsverlauf zu modellieren. Ferner wurde berichtet, dass die BAL stabiler in Anwesenheit von 30 % (v/v) als ohne DMSO ist (Janzen *et al.*, 2006). Vor diesem Hintergrund wären pH-Stabilitäts-Profile notwendig, um einen den gewonnenen Erkenntnissen analogen Zusammenhang zu bewerten.

3.3.6 Welche Aminosäurenseitenketten werden durch den pH-Wert beeinflusst?

Es konnten zwei pKs-Werte bestimmt werden, die das pH-Aktivitäts-Profil beeinflussen. Ob diese Werte bestimmten Aminosäureseitenketten zugewiesen werden können, wurde zuerst anhand aktueller Literatur und dann mit weiteren Experimenten beantwortet.

Es ist bekannt, dass eine hochkonservierte Wasserstoffbrücke zwischen dem N1'-Atom von ThDP und der Carboxylgruppe eines Glutamats in wahrscheinlich allen ThDP-abhängigen Enzymen vorkommt (Jordan, 2003). Diese Wasserstoffbindung ist nötig um ThDP zu binden. Da kaum Aktivität ohne diese Wasserstoffbindung nachgewiesen wurde (Schellenberg, 1998), scheint diese Bindung auch im Reaktionsmechanismus selbst eine bedeutende Rolle zu spielen. Auch das Glutamat ist hochkonserviert. Diese Aminosäure stellt die einzige

konservierte Säure-Base-Gruppe im aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme dar (Jordan, 2003). Im Falle der BAL handelt es sich um Glutamat in der Position 50 (Glu50).

Was derzeit aus dem Reaktionsmechanismus ThDP-abhängiger Enzyme bekannt ist (Nemeria *et al.*, 2007), kann auch auf die BAL übertragen werden: Bei der Reaktion protoniert zuerst Glu50 das N1'-Atom von ThDP. Je höher der pH-Wert an dieser Gruppe ist, desto leichter kann das Proton von Glu abdissoziieren. Die Deprotonierung von Glu50 geht mit dem Aktivitätsanstieg aus dem sauren Milieu einher (Nemeria *et al.*, 2007). Aus strukturellen Eigenschaften der BAL (Kneen *et al.*, 2005; Mosbacher *et al.*, 2005) und den kinetischen Daten wurde gefolgert, dass der pKs-Wert von Glu50 den sauren Anstieg des pH-Aktivitäts-Profils thermodynamisch beschreibt (Nemeria *et al.*, 2007). Diese Vermutung wurde in einer folgenden Veröffentlichung nochmals betont (Chakraborty *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde Glu50 die Dissoziationskonstante pKs_1 zugeschrieben:

$$pKs_1 = pKs_{Glu50} \tag{3.55}$$

wobei pKs_{Glu50} der pKs-Wert der χ-Carboxylgruppe von Glu50 ist.

Um diese Annahme experimentell zu bestätigen, wurde zunächst die Struktur der BAL auf weitere Säure-Base-Funktionen im aktiven Zentrum untersucht. Dann wurden Versuche durchgeführt, um auf Basis des Dissoziationszustandes zu entscheiden, welche Aminosäureseitenkette an der Ausbildung des pH-Aktivitäts-Profils beteiligt ist. Neben Glu50 ist nur noch eine weitere ionische Aminosäureseitenkette im aktiven Zentrum lokalisiert. Es handelt sch um Histidin in Position 29 (His29). His29 scheint beim Protontransfer beteiligt zu sein (Mosbacher *et al.*, 2005) und es ist wahrscheinlich, dass dessen korrekte Protonierung wichtig für die Katalyse ist.

Um zu entscheiden, ob es sich bei der entsprechenden Säure-Base-Gruppe eher um Glu50 oder um His29 handelt, wurde der Einfluss von DMSO auf den pKs-Wert der Seitenketten von *L*-Glutamat (*L*-Glu) und *L*-Histidin (*L*-His) untersucht. Dazu wurden die freien Aminosäuren potentiometrisch titriert. Die pKs-Werte der Seitengruppen ohne DMSO lagen für *L*-Glu bei 4,31 und *L*-His bei 6,14 und stimmten gut mit den Literaturdaten überein (4,3 und 6,0 nach Frey und Hegeman, 2007). Während der pKs-Wert von *L*-His nach Zugabe von 30 % (v/v) DMSO um 0,07 Einheiten sank, stieg der pKs-Wert von *L*-Glu um 0,52 Einheiten. Qualitativ konnte in der BAL ebenso eine deutliche Zunahme des pKs_1-Wertes infolge DMSO-Zugabe gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der ionisierten Seitenkette um Glu50 handelt.

Auch in der Pyruvatdecarboxylase scheint ein Zusammenhang zwischen dem hochkonservierten Glutamat und pH-Aktivitäts-Profilen zu bestehen (Jordan, 2003). Deshalb ist anzunehmen, dass auch in anderen ThDP-abhängigen Enzymen eine ähnliche Situation vorgefunden werden kann.

Da enzymgebundene Seitenketten sowohl durch das Protein selbst als auch durch Substrate und Produkte von der Umgebung abgeschirmt werden können (Marangoni, 2003), weisen jedoch gebundene Aminosäuren häufig einen deutlich anderen pKs-Wert als freie Aminosäuren auf. Deshalb wurde nur die Änderung der pKs-Werte beurteilt. Steigt der pKs-Wert einer freien Aminosäure nach DMSO-Zugabe, so wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass der pKs-Wert der gebundenen Aminosäure auch zunimmt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Reaktionstechnik ist ein Schlüsselaspekt bei der Optimierung von chemischen Reaktionen. Die Biokatalyse steht allerdings einer Reihe von Problemen gegenüber, die z.B. aus willkürlichen Modellvereinfachungen, der subjektiven Wahl optimaler Reaktionsbedingungen oder der unzureichenden Beurteilung von Reaktion und Stofftransport in Zweiphasensystemen resultieren. Ein quantitatives Verständnis der kinetischen und thermodynamischen Phänomene geht dadurch verloren und erschwert die rationale Auslegung eines Prozesses. Deshalb wurde eine systematische Methodik entwickelt, um Enzymreaktionen mit dem Ziel einer Prozessoptimierung rational auszulegen. Zwei Reaktionen wurden wegen ihrer wirtschaftlichen Bedeutung gewählt: Die Cofaktorregenerierung durch Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH) und die Carboligation von Aldehyden durch Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (BAL). Beide Reaktionen wurden durch eine modellbasierte Analyse von Reaktionsanfangsraten und Verlaufskurven untersucht und die kinetischen sowie thermodynamischen Phänomene mathematisch modelliert.

Dadurch konnte erstmalig ein mechanistisches Modell für die FDH und BAL entwickelt werden. Das neue FDH-Modell lieferte im Vergleich zu dem formalkinetischen Literaturmodell deutlich bessere Modellvorhersagen. Diese Beobachtungen stellen die Eignung des Literaturmodells für technische Synthesen in Frage. Das Modell für die BAL wurde ebenfalls auf Basis von Elementarreaktionen entwickelt und war in hervorragendem Einklang mit allen experimentellen Daten.

Anschließend wurde der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf jeden unabhängigen kinetischen Parameter ermittelt. Hauptsächlich auf Basis von thermodynamischen Annahmen wurde der Reaktionsverlauf als Funktion von Temperatur (*T*), pH-Wert (*pH*), Ionenstärke (*I*) und DMF-Konzentration (*DMF*, Lösungsvermittler) mathematisch modelliert. Diese thermodynamischen Gleichungen wurden mit dem kinetischen Modell gekoppelt und das kombinierte Modell wurde anhand von Verlaufskurven beurteilt. Dies führte letztendlich zu hervorragenden Modellvorhersagen in einem weiten Bereich (20 - 55 °C, *I* = 25 - 400 mM, *pH* 7,2 - 10,4, 5 - 45 % (v/v) *DMF*), selbst wenn mehr als ein Einflussfaktor variiert wurde.

Da wässrig-organische Zweiphasensysteme die enzymatische Umsetzung von hydrophoben Stoffen erleichtern können, wurde das Potential von Hexan und Methylisobutylketon (MIBK) untersucht. Zum ersten Mal wurde der Stofftransport und das Verteilungsgleichgewicht der BAL-Reaktanden quantifiziert und modelliert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Reaktionsbedingungen untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, dass weder *I* noch *pH* die Verteilung oder den Stofftransport beeinflussen. *T* und *DMF* hingegen erhöhen den Stofftransportkoeffizienten von Substrat und Produkt und beeinträchtigen ebenfalls das Verteilungsgleichgewicht. Die Ermittlung der intrinsischen Enzymkinetik kann im Zweiphasensystem durch den Stofftransport verfälscht werden. Um dieses Problem zu

überwinden, wurden die Reaktionsbedingungen rational optimiert, wodurch dieser Fehler erfolgreich auf unter 2,2 % gedrückt und deshalb vernachlässigt werden konnte. Reaktionsanfangsraten deuteten auf identische Modellparameter im Vergleich zum Einphasensystem hin, woraus geschlossen werden konnte, dass die Enzymkinetik im Zweiphasensystem unverändert bleibt. Diese Schlussfolgerung konnte durch die Analyse von vier Verlaufskurven und einer dimensionslosen Kennzahl (Hatta-Zahl) bestätigt werden.

Eine modellgestützte Optimierung der Reaktionsbedingungen (z.B. *T*, *pH*, Grenzfläche) wurde nachfolgend durchgeführt, um die Raum-Zeit-Ausbeute (*RZA*) zu maximieren. Es wurde dargestellt, dass die optimale *T* bzw. der optimale *pH* im Einphasensystem im Bereich 287 - 290 K bzw. pH 9,2 - 9,3 und im Zweiphasensystem im Bereich 295 - 301 K bzw. pH 7,9 - 8,4 lagen. Bemerkenswert war, dass die genauen Werte von Reaktionsdauer, Enzymkonzentration und Phasenverhältnis abhingen. Dies bedeutet, dass optimale Reaktionsbedingungen nur solange gültig sind, bis ein Prozess verändert wird. Die Beobachtung konnte als intrinsische Eigenschaft von fast allen Enzymen erklärt werden und ist deshalb auch auf andere Reaktionssysteme übertragbar. Basierend auf den *in silico*-Versuchen wurden zwei optimale Experimente in Puffer-MIBK durchgeführt. Zuerst wurde ein Reaktor mit großem Durchmesser verwendet und dann eine Emulsion erzeugt, da laut Simulationen Stofftransportlimitierungen die *RZA* reduzierte. Im Vergleich zu Literaturdaten gelang es so, die Produktivität um das 4- bzw. 11-fache zu erhöhen.

Zuletzt sind drei wichtige Ergebnisse aus biochemischer Sicht an dieser Stelle erwähnenswert: (1) Für effiziente Synthesen mit BAL sollte *I* auf den niedrigsten Wert eingestellt werden. (2) Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität ist durch *DMSO* beeinflusst. Als Konsequenz werden verschiedene pH-Maxima bei unterschiedlichem *DMSO* ermittelt. Dadurch können zum ersten Mal die anscheinend widersprüchlichen pH-Maxima (3 pH-Einheiten Unterschied) in der Literatur erklärt werden. (3) In diesem Zusammenhang konnte durch potentiometrische Tests die Behauptung gestützt werden, dass der Dissoziationszustand von Glu50 im aktiven Zentrum der BAL den Aktivitätsanstieg aus dem sauren Bereich heraus bestimmt und darüberhinaus durch *DMSO* beeinflusst wird.

Zusammenfassend wurde im Gegensatz zu vergleichbaren Arbeiten ein Modell entwickelt, das neben *T* und *pH* auch *I* und *DMF* berücksichtigt und erwiesenermaßen auch in Puffer-Hexan und Puffer-MIBK gültig ist. Durch den modularen Aufbau der einzelnen Gleichungen kann diese Vorgehensweise auch auf andere Enzymsysteme übertragen werden und stellt eine systematische und leistungsfähige Methode dar, Enzymreaktionen für technische Anwendungen rational zu optimieren. Ein weiterer Vorteil der hier präsentierten Methode könnte in zukünftigen Arbeiten durch Integration eines Kostenmodells gezeigt werden. Unter diesen Umständen könnten Synthesen auch unter Berücksichtigung der Kosten optimiert werden.

5 Literatur

Alivisatos SG, Ungar F, Abraham G. 1964. Non-enzymatic interactions of reduced coenzyme I with inorganic phosphate and certain other anions. Nature 203:973-975.

Arrhenius S. 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z Phys Chem 4:226-248.

Baldascini H, Janssen DB. 2005. Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system. Enzyme Microb Technol 36:285-293.

Balkenhohl F, Ditrich K, Hauer B, Ladner W. 1997. Optisch aktive Amine durch Lipase-katalysierte Methoxyacetylierung. J Prakt Chem 339:381-384.

Bardow A, Marquardt W. 2004a. Identification of diffusive transport by means of an incremental approach. Comput Chem Eng 28:585-595.

Bardow A, Marquardt W. 2004b. Incremental and simultaneous identification of reaction kinetics: Methods and comparison. Chem Eng Sci 59:2673-2684.

Biselli M, Kragl U, Wandrey C. 2002. Reaction Engineering for Enzyme-Catalyzed Biotransformations. In: Drauz K, Waldmann H, editors. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH.

Bisswanger H. 2008. Enzyme Kinetics - Principles and Methods. Weinheim: Wiley-VCH.

Blanchard JS, Cleland WW. 1980. Kinetic and chemical mechanisms of yeast formate dehydrogenase. Biochemistry 19:3543-50.

Blaser H-U. 2003. Enantioselective catalysis in fine chemical production. Chem Commun:293-296.

Blaser HU, Spindler F, Studer M. 2001. Enantioselective catalysis in fine chemicals production. Appl Catal, A 221:119-143.

Bommarius A, Drauz K, Gröger U, Wandrey C. 1992. Membrane bioreactors for the production of enantiomerically pure α-amino acids. In: Collins A, Sheldrake G, Grosby J, editors. Chirality in Industry. New York: John Wiley. p 372-397.

Bommarius A, Riebel B. 2004. Biocatalysis: Fundamentals and Applications. Bommarius A, Riebel B, editors. Weinheim: Wiley-VCH.

Bommarius AS, Karau A. 2005. Deactivation of formate dehydrogenase (FDH) in solution and at gas-liquid interfaces. Biotechnol Prog 21:1663-72.

Bommarius AS, Schwarm M, Drauz K. 1998. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals - examples and perspectives. J Mol Catal B: Enzym 5:1-11.

Bordwell F. 1988. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. Acc Chem Res 21:456-463.

Box GEP, Wilson KB. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. J Roy Statistical Soc, B 13:1-45.

Brass JM, Hoeks FWJMM, Rohner M. 1997. Application of modelling techniques for the improvement of industrial bioprocesses. J Biotechnol 59:63-72.

Brendel M, Bonvin D, Marquardt W. 2006. Incremental identification of kinetic models for homogeneous reaction systems. Chem Eng Sci 61:5404-5420.

Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Kesseler M, Sturmer R, Zelinski T. 2004. Industrial methods for the production of optically active intermediates. Angew Chem Int Ed Engl 43:788-824.

Briggs GE, Haldane JBS. 1925. A note on the kinetics of enzyme action. Biochem J 19:339-339.

Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer U. 2005. Biocatalysts and Enzyme Technology. Weinheim: VCH-Wiley.

Buckland B, Dunnill P, Lilly M. 1975. The enzymatic transformation of water-insoluble reactants in nonaqueous solvents. Conversion of cholesterol to cholest-4-ene-3-one by a *Nocardia* sp. Biotechnol Bioeng 17:815-826.

Ceylan H, Kubilay S, Aktas N, Sahiner N. 2008. An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed bio-transformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM). Bioresour Technol 99:2025-2031.

Cha S. 1968. A simple method for derivation of rate equations for enzyme-catalyzed reactions under the rapid equilibrium assumption or combined assumptions of equilibrium and steady state. J Biol Chem 243:820-825.

Chakraborty S, Nemeria N, Yep A, McLeish MJ, Kenyon GL, Jordan F. 2008. Mechanism of Benzaldehyde Lyase Studied via Thiamin Diphosphate-Bound Intermediates and Kinetic Isotope Effects. Biochemistry 47:3800-3809.

Chenault HK, Whitesides GM. 1987. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. Appl Biochem Biotechnol 14:147-97.

Cleland WW. 1963. Kinetics of enzyme-catalyzed reactions with 2 or more substrates or products. 1. Nomenclature and rate equations. Biochim Biophys Acta 67:104-137.

Dale BE, White DH. 1983. Ionic strength: A neglected variable in enzyme technology. Enzyme Microb Technol 5:227-229.

Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R. 2001. The temperature optima of enzymes: a new perspective on an old phenomenon. Trends Biochem Sci 26:223-225.

Demir AS, Hamamci H, Sesenoglu Ö, Aydogan F, Capanoglu D, Neslihanoglu R. 2001a. Simple chemoenzymatic access to enantiopure pharmacologically interesting (*R*)-2-hydroxypropiophenones. Tetrahedron: Asymmetry 12:1953-1956.

Demir AS, Pohl M, Janzen E, Müller M. 2001b. Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C–C bond cleavage. J Chem Soc, Perkin Trans 1:633-635.

Demir AS, Sesenoglu Ö, Dunkelmann P, Muller M. 2003. Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carboligation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde. Org Lett 5:2047-50.

Demir AS, Sesenoglu Ö, Eren E, Hosrik B, Pohl M, Janzen E, Kolter D, Feldmann R, Dünkelmann P, Müller M. 2002. Enantioselective synthesis of alpha-hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction. Adv Synth Catal 344:96-103.

Domínguez de María P, Stillger T, Pohl M, Wallert S, Drauz K, Gröger H, Trauthwein H, Liese A. 2006. Preparative enantioselective synthesis of benzoins and (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase. J Mol Catal B: Enzym 38:43-47.

Doswald S, Estermann H, Kupfer E, Stadler H, Walther W, Weisbrod T, Wirz B, Wostl W. 1994. Large scale preparation of chiral building blocks for the P3 site of renin inhibitors. Bioorg Med Chem 2:403-410.

Drayer DE. 1986. Pharmacodynamic and pharmacokinetic differences between drug enantiomers in humans: an overview. Clin Pharmacol Ther 40:125-133.

Duggleby RG. 2001. Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions. Methods 24:168-174.

Dünkelmann P, Kolter-Jung D, Nitsche A, Demir AS, Siegert P, Lingen B, Baumann M, Pohl M, Muller M. 2002. Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: the first asymmetric cross-benzoin condensation. J Am Chem Soc 124:12084-5.

Eckstein MF. 2004. Alcohol dehydrogenase catalysed reductions in non-conventional media. PhD Thesis. Universität Rostock.

Eisenthal R, Peterson ME, Daniel RM, Danson MJ. 2006. The thermal behaviour of enzyme activity: Implications for biotechnology. Trends Biotechnol 24:289-292.

Ermakov SA, Ermakov AA, Chupakhin ON, Vaissov DV. 2001. Mass transfer with chemical reaction in conditions of spontaneous interfacial convection in processes of liquid extraction. Chem Eng J 84:321-324.

Faber K, Kroutil W. 2005. New enzymes for biotransformations. Curr Opin Chem Biol 9:181-7.

Felber S. 2001. Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. PhD Thesis. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Guisán J. 1991. Enzyme reaction engineering: Synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. Enzyme Microb Technol 13:898-905.

Fernandez P, Cabral J. 2008. Biocatalysis in Biphasic Systems:General. In: Carrea G, Riva S, editors. Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media. Weinheim: Wiley-VCH. p 191-210.

Findrik Z, Vasic-Racki D. 2007. Biotransformation of *D*-methionine into *L*-methionine in the cascade of four enzymes. Biotechnol Bioeng 98:956-967.

Flaschel E. 2006. Reactor performance in the presence of catalyst deactivation. Eng Life Sci 6:131-138.

Frey PA, Hegeman AD. 2007. Enzymatic Reaction Mechanisms. New York: Oxford University Press.

Gadamasetti K. 2008. An Overview. In: Gadamasetti K, Braish T, editors. Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry, Challenges in an Ever Changing Climate. Boca Raton: CRC Press. p 1-11.

Gonzalez B, Vicuna R. 1989. Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PPi-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. J Bacteriol 171:2401-5.

Gu C-H, Grant DJ. 2004. Effects of Crystal Structure and Physical Properties on the Release of Chiral Drugs. In: Reddy IK, Mehvar R, editors. Chirality in Drug Design and Development. New York: Marcel Dekker.

Halling P. 2002. Enzymic Conversions in Organic and Other Low-Water Media. In: Drauz K, Waldmann H, editors. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH.

Halling PJ. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. Enzyme Microb Technol 16:178-206.

Hann EC, Eisenberg A, Fager SK, Perkins NE, Gallagher FG, Cooper SM, Gavagan JE, Stieglitz B, Hennessey SM, DiCosimo R. 1999. 5-Cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23. Bioorg Med Chem 7:2239-2245.

Hanson RL, Howell JM, LaPorte TL, Donovan MJ, Cazzulino DL, Zannella VV, Montana MA, Nanduri VB, Schwarz SR, Eiring RF and others. 2000. Synthesis of allysine ethylene acetal using phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius*. Enzyme Microb Technol 26:348-358.

Hildebrand F, Kuhl S, Pohl M, Vasic-Racki D, Muller M, Wandrey C, Lutz S. 2007. The production of (*R*)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* in a continuously operated membrane reactor. Biotechnol Bioeng 96:835-43.

Hischer T, Gocke D, Fernández M, Hoyos P, Alcántara AR, Sinisterra JV, Hartmeier W, Ansorge-Schumacher MB. 2005. Stereoselective synthesis of novel benzoins catalysed

by benzaldehyde lyase in a gel-stabilised two-phase system. Tetrahedron 61:7378-7383.

Ho LY, Humphrey AE. 1970. Optimal control of an enzyme reaction subject to enzyme deactivation. I. Batch process. Biotechnol Bioeng 12:291-311.

Hummel W, Schütte H, Schmidt E, Wandrey C, Kula M-R. 1987. Isolation of *L*-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus sp.* M4 and its application for the production of *L*-phenylalanine. Appl Microbiol Biotechnol 26:409-416.

Iding H, Dünnwald T, Greiner L, Liese A, Müller M, Siegert P, Grötzinger J, Demir AS, Pohl M. 2000. Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. Chem Eur J 6:1483-1495.

Iding H, Siegert P, Mesch K, Pohl M. 1998. Application of α-keto acid decarboxylases in biotransformations. Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol 1385:307-322.

Illanes A, Wilson L, Tomasello G. 2000. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. Enzyme Microb Technol 27:270-278.

Islam MR, Mahdi JG, Bowen ID. 1997. Pharmacological importance of stereochemical resolution of enantiomeric drugs. Drug Saf 17:149-65.

Janzen E. 2002. Biochemische Charakterisierung und die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen. PhD Thesis. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Janzen E, Muller M, Kolter-Jung D, Kneen MM, McLeish MJ, Pohl M. 2006. Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C-C bond formation. Bioorg Chem 34:345-61.

Jensen VJ, Rugh S, Klaus M. 1987. Industrial-scale production and application of immobilized glucose isomerase. Methods Enzymol. New York: Academic Press. p 356-370.

Jordan F. 2003. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. Nat Prod Rep 2:184-201.

Jurado E, Camacho F, Luzón G, Vicaria JM. 2004. Kinetic model for lactose hidrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor. Chem Eng Sci 59:397-405.

Kadam KL, Rydholm EC, McMillan JD. 2004. Development and Validation of a Kinetic Model for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Biotechnol Prog 20:698-705.

Kato N, Sahm H, Wagner F. 1979. Steady-state kinetics of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*. Biochim Biophys Acta 566:12-20.

Kato N, Sakazawa C, Nishizawa T, Tani Y, Yamada H. 1980. Purificaton and characterization of *S*-formylglutathione hydrolase from a methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Biochim Biophys Acta 611:323-32.

Kheirolomoom A, Ardjmand M, Vossoughi M, Kazemeini M. 1998. The stability analysis and modeling of pH- and ionic strength inactivation of penicillin G acylase obtained from various species of *Escherichia coli*. Biochem Eng J 2:81-88.

King EL, Altman C. 1956. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions. J Phys Chem 60:1375-1378.

Klibanov A. 1986. Enzymes that work in organic solvents. CHEMTECH 16:54-359.

Klibanov AM. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Trends Biochem Sci 14:141-144.

Klibanov AM. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? Trends Biotechnol 15:97-101.

Klibanov AM. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature 409:241-246.

Klibanov AM. 2003. Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. Curr Opin Biotechnol 14:427-431.

Kluger R. 1987. Thiamin diphosphate: a mechanistic update on enzymic and nonenzymic catalysis of decarboxylation. Chem Rev 87:863-876.

Kneen MM, Pogozheva ID, Kenyon GL, McLeish MJ. 2005. Exploring the active site of benzaldehyde lyase by modeling and mutagenesis. Biochim Biophys Acta 1753:263-71.

Kragl U, Kruse W, Hummel W, Wandrey C. 1996a. Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example. Biotechnol Bioeng 52:309-319.

Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C. 1992. Kontinuierliche Reaktkionsführung mit löslichen Enzymen. Chem Ing Tech 6:499-509.

Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C. 1996b. Continuous production of *L-tert*-leucine in series of two enzyme membrane reactors. Bioprocess Biosyst Eng 14:291-297.

Kruusma J, Rhodes A, Bhatia R, Williams J, Benham A, Kataky R. 2007. The effect of a hydrogen bonding environment (dimethyl sulfoxide) on the ionisation and redox properties of the thiol group in cysteine and a protein disulfide isomerase mimic (vectrase). J Solution Chem 36:517-529.

Kula M-R. 2002. Introduction. In: Drauz K, Waldmann H, editors. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH.

Kula M-R, Wichmann R, Oden U, Wandrey C. 1980. Influence of substrate or product inhibition on the performance of enzyme reactors. Biochimie 62:523-536.

Kurlemann N, Liese A. 2004. Immobilization of benzaldehyde lyase and ist application as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of a chiral 2-hydroxy ketone. Tetrahedron: Asymmetry 15:2955-2958.

Kvittingen L. 1994. Some aspects of biocatalysis in organic solvents. Tetrahedron 50:8253-8274.

Labrou NE, Rigden DJ, Clonis YD. 2000. Characterization of the NAD^+ binding site of *Candida boidinii* formate dehydrogenase by affinity labelling and site-directed mutagenesis. Eur J Biochem 267:6657-64.

Laidler K, Bunting P. 1973. The Chemical Kinetics of Enzyme Action. Oxford: Clarendon Press.

Liese A. 2002. Replacing Chemical Steps by Biotransformations: Industrial Application and Processes Using Biocatalysis. In: Drauz K, Waldmann H, editors. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH. p 1419-1460.

Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 2000. Industrial Biotransformations. Weinheim: VCH-Wiley.

Liese A, Zelinski T, Kula MR, Kierkels H, Karutz M, Kragl U, Wandrey C. 1998. A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones. J Mol Catal B: Enzym 4:91-99.

Lilly MD. 1994. Advances in biotransformation processes. Chem Eng Sci 49:151-159.

Marangoni A. 2003. Enzyme Kinetics - A Modern Approach. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Marin-Sanguino A, Voit E, Gonzalez-Alcon C, Torres N. 2007. Optimization of biotechnological systems through geometric programming. Theor Biol Med Modelling 4:38.

Martinek K, Semenov AN, Berezin IV. 1981. Enzymic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift. Biochim Biophys Acta, Enzymol 658:76-89.

Michaelis L, Menten M. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem Z 49:333-369.
Michalik C, Schmidt T, Zavrel M, Ansorge-Schumacher M, Spiess A, Marquardt W. 2007. Application of the incremental identification method to the formate oxidation using formate dehydrogenase. Chem Eng Sci 62:5592-5597.
Midha KK, McKay G, Rawson MJ, Hubbard JW. 1998. The impact of stereoisomerism in bioequivalence studies. J Pharm Sci 87:797-802.
Mosbacher TG, Mueller M, Schulz GE. 2005. Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. Febs J 272:6067-76.
Mozhaev VV, Khmelnitsky YL, Sergeeva MV, Belova AB, Klyachko NL, Levashov AV, Martinek K. 1989. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. α-Chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. Eur J Biochem 184:597-602.
Mukerjee P, Ostrow JD. 1998. Effects of added dimethylsulfoxide on pKα values of uncharged organic acids and pH values of aqueous buffers. Tetrahedron Lett 39:423-426.
Muller K, Garel JR. 1984. Stepwise inactivation of *Escherichia coli* aspartokinase-homoserine dehydrogenase I. Biochemistry 23:651-654.
Mussini T, Longhi P, Marcolungo I, Mussini PR, Rondinini S. 1991. Status and problems of standardization of pH scales for controls in different media. Reference value standards in ethylene glycol/water mixed solvents. Fresenius J Anal Chem 339:608-612.
Nemeria N, Korotchkina L, McLeish MJ, Kenyon GL, Patel MS, Jordan F. 2007. Elucidation of the chemistry of enzyme-bound thiamin diphosphate prior to substrate binding: defining internal equilibria among tautomeric and ionization states. Biochemistry 46:10739 -10744.
Oliveberg M, Arcus VL, Fersht AR. 1995. pKa values of carboxyl groups in the native and denatured states of barnase: The pKa values of the denatured state are on average 0.4 units lower than those of model compounds. Biochemistry 34:9424-9433.
Orlich B, Schomaecker R. 1999. Enzymatic reduction of a less water-soluble ketone in reverse micelles with NADH regeneration. Biotechnol Bioeng 65:357-362.
Osborne SJ, Leaver J, Turner MK, Dunnill P. 1990. Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane. Enzyme Microb Technol 12:281-291.
Park J, Park H, Rho H, Ahn S, Kim D, Chang I. 2008. Statistically designed enzymatic hydrolysis for optimized production of icariside II as a novel melanogenesis inhibitor. J Microbiol Biotechnol 18:110-117.
Patel R, Hanson R, Goswami A, Nanduri V, Banerjee A, Donovan MJ, Goldberg S, Johnston R, Brzozowski D, Tully T and others. 2003. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. J Ind Microbiol Biotechnol 30:252-9.
Patel RN. 2000a. Microbial/enzymatic synthesis of chiral drug intermediates. Adv Appl Microbiol. New York: Academic Press. p 33-78.
Patel RN. 2000b. Stereosoelctive Biocatalysis for Synthesis of Some Chiral Pharmaceutical Intermediates. Stereosoelctive Biocatalysis. New York: Marcel Dekker.
Patel RN. 2001. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. Adv Synth Catal 343:527-546.
Patel RN, Saul LNaAIL. 1997. Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. Adv Appl Microbiol. New York: Academic Press. p 91-140.
Peters M, Zavrel M, Kahlen J, Schmidt T, Ansorge-Schumacher M, Leitner W, Büchs J, Greiner L, Spiess A. 2008. Systematic approach to solvent selsection for biphasic

systems with a combination of COSMO-RS and a dynamic modelling tool. Eng life sci, angenommen.

Peterson DH, Murray HC. 1952. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. J Am Chem Soc 74:1871-1872.

Peterson ME, Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R. 2007. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. Biochem J 402:331-337.

Peterson RS, Hill CG, Amundson JCH. 1989. Effects of temperature on the hydrolysis of lactose by immobilized beta-galactosidase in a capillary bed reactor. Biotechnol Bioeng 34:429-437.

Pohl M, Lingen B, Müller M. 2002. Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: New aspects of asymmetric CC bond formation. Chem Eur J 8:5289-5295.

Reynolds L, Garcia G, Kozarich J, Kenyon G. 1988. Differential reactivity in the processing of [p-(halomethyl)benzoyl] formates by benzoylformate decarboxylase, a thiamin pyrophosphate dependent enzyme. Biochemistry 27:5530-5538.

Rodrigues RC, Volpato G, Antônio M, Ayub Z, Wada K. 2008. Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology. J Chem Technol Biotechnol 83:849-854.

Rozzell JD. 1999. Commercial scale biocatalysis: Myths and realities. Bioorg Med Chem 7:2253-2261.

Safford GJ, Schaffer PC, Leung PS, Doebbler GF, George WB, Lyden EFX. 1969. Neutron inelastic scattering and x-ray studies of aqueous solutions of dimethylsulphoxide and dimethylsulphone. J Chem Phys 50:2140-2159.

Sahm H, Wagner F. 1973. Mikrobielle Verwertung von Methanol. Arch Microbiol 90:263-268.

Sarett LH. 1946. Partial synthesis of 4-pregnene-17(β),20(β),21-triol-3,11-dione and 4-pregnene-17(β),21-diol-3,11,20-trione monoacetate. J Biol Chem 162:601-631.

Schellenberg A. 1998. Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. Biochim Biophys Acta (BBA) - Protein Struct Mol Enzymol 1385:177-186.

Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. 2001a. Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature 409:258-268.

Schmid A, Vereyken I, Held M, Witholt B. 2001b. Preparative regio- and chemoselective functionalization of hydrocarbons catalyzed by cell free preparations of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. J Mol Catal B: Enzym 11:455-462.

Schmidt E, Ghisalba O, Gygax D, Sedelmeier G. 1992. Optimization of a process for the production of (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid - an intermediate for inhibitors of angiotensin converting enzyme. J Biotechnol 24:315-327.

Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. 2003. Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial synthesis. Science 299:1694-1697.

Schorken U, Sprenger GA. 1998. Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol 1385:229-243.

Schütte H, Flossdorf J, Sahm H, Kula MR. 1976. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur J Biochem 62:151-160.

Sebek OK, Perlman D. 1979. Microbial transformation of steroids and sterols. In: Peppler HJ, Perlman D, editors. Microbial Technology. 2 ed. New York: Academic Press. p 483-496.

Segel I. 1975. Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. New York: Wiley-Interscience.

Selwyn M. 1965. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. Biochim Biophys Acta 105:193-195.

Shewale JG, Sivaraman H. 1989. Penicillin acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. Process Biochem 24:146-154.

Slusarczyk H, Felber S, Kula MR, Pohl M. 2000. Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. Eur J Biochem 267:1280-9.

Splechtna B, Nguyen T-H, Zehetner R, Lettner HP, Lorenz W, Haltrich D. 2007. Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β-galactosidase from *Lactobacillus* sp. Biotechnol J 2:480-485.

Stillger T. 2004. Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen. PhD Thesis. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Stillger T, Pohl M, Wandrey C, Liese A. 2006. Reaction engineering of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* catalyzing enantioselective C-C bond formation. Org Process Res Dev 10:1172-1177.

Straathof AJJ. 2003. Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces. Biotechnol Bioeng 83:371-375.

Straathof AJJ, Heijnen JJ. 1996. New constraints between kinetic parameters explain the (un)identifiability of enzymatic rate constants. Biotechnol Bioeng 52:433-437.

Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. Curr Opin Biotechnol 13:548-556.

Sun S-D, Shan L, Liu Y-F, Jin Q-Z, Zhang L-X, Wang X-G. 2008. Solvent-free enzymatic preparation of feruloylated monoacylglycerols optimized by response surface methodology. J Agric Food Chem 56:442-447.

Taylor K. 2002. Enzyme Kinetics and Mechanisms. New York: Kluwer Academic Publishers.

Taylor MJ. 1978. The response of the glass/calomel pH-cell in aqueous solutions containing dimethylsulphoxide at 25 and -12°C. Cryobiology 15:340-344.

Tishkov VI, Popov VO. 2004. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. Biochemistry Mosc 69:1252-67.

Travascio P, Zito E, Portaccio M, Diano N, Grano V, Di Martino S, Bertolini T, Rossi S, Mita DG. 2002. Enzyme reaction engineering: Effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions. Biotechnol Prog 18:975-985.

Trusek-Holownia A. 2003. A membrane phase contactor for enzymatic synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide. Biochem Eng J 16:69-77.

Trusek-Holownia A, Noworyta A. 2000. Dipeptide Enzymatic Synthesis in a Two-Phase Membrane Reactor. Chem Papers 54:442-447.

Vasic-Racki D, Kragl U, Liese A. 2003. Benefits of enzyme kinetics modelling. Chem Biochem Eng Q 17:7-18.

Voet D, Voet J. 2004. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons.

Wainer IW. 1993. Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology: Second Edition. New York: Marcel Dekker.

Wichmann R, Vasic-Racki D. 2005. Cofactor regeneration at the lab scale. Adv Biochem Eng Biotechnol 92:225-60.

Wichmann R, Wandrey C, Bückmann AF, Kula M-r. 1981. Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. Biotechnol Bioeng 23:2789-2802.

Willeman WF, Straathof AJJ, Heijnen JJ. 2002. Reaction temperature optimization procedure for the synthesis of (*R*)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase using a process model approach. Enzyme Microb Technol 30:200-208.

Yang Z, Zacherl D, Russell AJ. 1993. pH Dependence of subtilisin dispersed in organic solvents. J Am Chem Soc 115:12251-12257.

Zaks A, Klibanov AM. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. Science 224:1249-1251.

Zavrel M, Schmidt T, Michalik C, Ansorge-Schumacher M, Marquardt W, Büchs J, Spiess AC. 2008. Mechanistic kinetic model for symmetric carboligations using benzaldehyde lyase. Biotechnol Bioeng, im Druck.

Persönliche Angaben

Name	Thomas Schmidt
Geburtsdatum	09.12.1979
Geburtsort	Amberg
Wohnort	Jakobstr. 167, 52064 Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

Sept 2005 – Sept 2008	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen mit dem Promotionsthema: Experimentelle Analyse, Modellierung und biochemische Charakterisierung von Ein- und Zweiphasenreaktionen für die technische Biokatalyse
2001 – 2005	Fachhochschule Weihenstephan: Studium der Biotechnologie
2000 – 2001	Wehrdienst in der Schweppermannkaserne Kümmersbruck
1998 – 2000	Fachoberschule Amberg

Praktische Erfahrung

Jan – Jul 2005	Diplomarbeit bei Hexal Biotech, Oberhaching zum Thema: Prozesscharakterisierung einer Fermentation zur Produktion eines therapeutischen Proteins in *Escherichia coli*
Sept 2004 – Jan 2005	Industriepraktikum bei Hexal Biotech, Oberhaching in der Abteilung für Zellkultur und Molekularbiologie
Apr – Jul 2003	Forschungsaufenthalt am Brudnick Neuropsychiatric Research Institute in Worcester/Massachusetts im Institut für Psychiatrie zum Thema: Dopamin D_2-Antagonisten induzieren posttranslationale Chromatinänderungen in striatalen Neuronen über cAMP-PKA und NMDA Rezeptoren