

Prozessentwicklung einer linearen Reaktionskaskade zur biotechnologischen Herstellung von ϵ -Caprolacton

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von
Christian Scherkus

aus
Havelberg

2018

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova
1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner
Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2018

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Scherkus, Schmidt, Bornscheuer, Gröger, Kara, Liese. 2017. Kinetic insights into ϵ -caprolactone synthesis. Improvement of an enzymatic cascade reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 114. 6:1215–1221.

Wedde, Rommelmann, Scherkus, Schmidt, Bornscheuer, Liese, Gröger. 2017. An alternative approach towards poly- ϵ -caprolactone through a chemoenzymatic synthesis. Combined hydrogenation, bio-oxidations and polymerization without the isolation of intermediates. *Green Chem* 19. 5:1286–1290.

Scherkus, Schmidt, Bornscheuer, Gröger, Kara, Liese. 2016. A Fed-Batch Synthetic Strategy for a Three-Step Enzymatic Synthesis of Poly- ϵ -caprolactone. *ChemCatChem* 8. 22:3446–3452.

Schmidt, Büchschütz, Scherkus, Liese, Gröger, Bornscheuer. 2015. Biocatalytic Access to Chiral Polyesters by an Artificial Enzyme Cascade Synthesis. *ChemCatChem* 7. 23:3951–3955.

Schmidt, Scherkus, Muschiol, Menyes, Winkler, Hummel, Gröger, Liese, Herz, Bornscheuer. 2015. An Enzyme Cascade Synthesis of ϵ -Caprolactone and its Oligomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54. 9:2784–2787.

Konferenzbeiträge

Scherkus, Gröger, Kragl, Bornscheuer, Schmid, Menyes, Liese. Biotechnological Synthesis of ϵ -Caprolactone. 2014. Posterpräsentation. Biomaterials – Made in Bioreactors. Radebeul, Deutschland

Scherkus, Gröger, Bornscheuer, Schmidt, Borchert, Menyes, Liese. Enzymatic Reaction Sequence Towards ϵ -Caprolactone Synthesis and Polymerization. 2014. Posterpräsentation. Biocat – 9th International Congress on Biocatalysis. Hamburg, Deutschland

Scherkus, Gröger, Bornscheuer, Schmidt, Borchert, Menyes, Liese. Process Development for Enzymatic Synthesis of a Biodegradable Polymer. 2014. Posterpräsentation. ProcessNet / 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen. Aachen, Deutschland

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Liese für das Vertrauen und die Bereitstellung des interessanten Themas, dessen Bearbeitung ich weitestgehend frei gestalten durfte.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Pörtner für die Übernahme des zweiten Gutachtens sowie Frau Prof. Smirnova als Vorsitzende des Prüfungsausschusses.

Ich möchte meinen Kooperationspartnern der Universitäten Bielefeld, Dortmund, Greifswald und Rostock sowie der Firma Enzymicals und der Firma Polymaterials für die Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen in den zahlreichen Projekttreffen danken.

Ich danke der DBU für die finanzielle Unterstützung dieses Kooperationsprojektes.

Des Weiteren bedanke ich mich beim gesamten Team des Instituts für Technische Biokatalyse für die Hilfsbereitschaft und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich danke den Auszubildenden und Studenten, die mir während dieser Zeit im Labor fleißig zugearbeitet haben.

Danken möchte ich außerdem Prof. Selin Kara für die Betreuung und die hilfreichen Korrekturen.

Vielen Dank an Bastian Kannengießer und Sören Baum für die unterhaltsame Zeit im gemeinsamen Büro.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Juliane für die Unterstützung und den Zuspruch, nicht zuletzt bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Grundlagen.....	1
1.1	ε-Caprolacton als industrieller Rohstoff	1
1.2	Industrielle Biotechnologie	2
1.3	Enzymkinetik.....	3
1.3.1	Michaelis-Menten-Kinetik	3
1.3.2	Enzyminhibierung.....	4
1.4	Alkohol-Dehydrogenasen.....	5
1.4.1	Eigenschaften und Funktion.....	5
1.4.2	Reaktionsmechanismus	6
1.5	Baeyer-Villiger-Monooxygenasen	7
1.5.1	Eigenschaften und Funktion.....	7
1.5.2	Reaktionsmechanismus	9
1.6	Lipasen	10
1.6.1	Eigenschaften und Funktion.....	10
1.6.2	Reaktionsmechanismus	11
1.7	Cofaktorrecycling	12
1.8	Reaktoren	14
1.9	Begasungsstrategien	16
2	Motivation und Zielsetzung.....	19
3	Festlegung der Reaktionsbedingungen.....	21
3.1	pH-Wert und Puffer	21
3.2	Temperatur	22
3.3	Löslichkeit der Reaktanten.....	23
3.4	Zusammenfassung	24
4	Enzymkinetik	25
4.1	Kinetik der Alkohol-Dehydrogenase.....	25
4.1.1	Oxidation von Cyclohexanol.....	26
4.1.2	Reduktion von Cyclohexanon.....	26
4.1.3	Feinabstimmung der Kinetik und Gleichgewichtskonstante	27
4.2	Kinetik der Cyclohexanon-Monooxygenase.....	30
4.2.1	Oxidation von Cyclohexanon.....	30
4.2.2	Inhibierungen der CHMO innerhalb der Reaktionssequenz	31
4.2.3	Sauerstoff.....	33
4.3	Zusammenfassung	34

5	Begasung und Sauerstoffeintrag	37
5.1	Blasenbegasung	37
5.2	<i>In situ</i> Begasung	38
5.3	Membranbegasung	39
5.3.1	Anfertigung eines Membranmoduls	39
5.3.2	Abschätzung des Sauerstoffeintrags	40
5.4	Zusammenfassung	43
6	Prozessentwicklung	45
6.1	Reaktionskaskade im Satzbetrieb	45
6.1.1	Berücksichtigung der Massenbilanz	45
6.1.2	Entwicklung eines kinetischen Modells zur Prozesssimulation	46
6.1.3	Enzymstabilität unter Prozessbedingungen	47
6.1.4	Anwendung des kinetischen Modells für den Satzbetrieb	48
6.2	Reaktionskaskade im Zulaufverfahren	50
6.2.1	Diskontinuierliche und automatisierte Substratzugabe	50
6.2.2	Kontinuierliche Substratzugabe und pH-Kontrolle	52
6.2.3	Kinetische Limitierung im Zulaufverfahren	54
6.3	Zusammenfassung	55
7	Strategien zur Vermeidung der Produktinhibierung	57
7.1	Isolierung von ϵ -Caprolacton	57
7.2	Lipasekatalysierte Umsetzung von ϵ -Caprolacton	57
7.2.1	Polymerisation von ϵ -Caprolacton	57
7.2.2	Hydrolyse von ϵ -Caprolacton und deren Kinetik	59
7.3	Isolierung von 6-Hydroxyhexansäure	62
7.3.1	Polymerisation von 6-Hydroxyhexansäure	63
7.4	Zusammenfassung	64
8	Zulaufverfahren mit immobilisierter Lipase	65
8.1	Erweiterung der Reaktionssequenz	65
8.2	Vermeidung der Produktinhibierung durch Hydrolyse	66
8.3	Zusammenfassung	69
9	Diskussion und Ausblick	71
9.1	Biotechnologische Synthese von ϵ -Caprolacton	71
9.2	Begasung	73
9.3	Reaktorkonzept und experimentelle Umsetzung	74
9.4	Biokatalytische Polymerisation durch Veresterung	76
9.5	Fazit	78
10	Zusammenfassung	81
11	Materialien und Methoden	83
11.1	Materialien	83

11.1.1 Chemikalien	83
11.1.2 Enzyme	84
11.1.3 Geräte	85
11.2 Methoden.....	86
11.2.1 Mikrobiologische und biochemische Methoden.....	86
11.2.2 Analytische Methoden.....	88
11.2.3 Biokatalyse.....	92
11.2.4 Chemische Polymerisation zu Poly- ϵ -Caprolacton (Polymaterials AG).....	94
MATLAB Skripte.....	95
Abkürzungen	103
Symbole und Einheiten.....	105
Abbildungsverzeichnis.....	107
Tabellenverzeichnis.....	113
Literaturverzeichnis	115

1 Einleitung und Grundlagen

1.1 ϵ -Caprolacton als industrieller Rohstoff

ϵ -Caprolacton (ECL) ist eine chemische Verbindung, die als siebengliedriger, cyclischer Ester zur Stoffgruppe der Lactone gehört. Industriell wird ECL vorwiegend als Monomer für die Polymerisation zu Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) oder für die Copolymerisation zur Bildung verschiedener funktionalisierter Ester eingesetzt (Abb. 1-1). Der dadurch gewonnene Kunststoff ist ein Polyester und damit biologisch abbaubar (Mülhaupt 2013; Reddy *et al.* 2013). Aufgrund der Biokompatibilität und der physikalischen Eigenschaften eignet sich PCL für medizinische Anwendungen im Bereich der Implantat- und Gewebekonstruktion (*tissue engineering*) mittels 3D-Druck (Zopf *et al.* 2013). Des Weiteren ist PCL mit anderen Kunststoffen und Materialien mischbar (Labet und Thielemans 2009), so dass es für verschiedene Anwendungen als Additiv oder als Verpackungsmaterial für Lebensmittel eingesetzt werden kann. Als Verbundwerkstoff mit Rußpartikeln (*carbon black*) lassen sich bspw. elektrische Leiter fertigen, die in Sensoren eingesetzt werden können (Leigh *et al.* 2012).

ECL kann durch die Reaktion mit Wasser in die offenkettige Form zu 6-Hydroxyhexansäure (6-HHA) überführt werden. Hierdurch entstehen zwei endständige funktionelle Gruppen. An einem Ende befindet sich ein Alkohol und am anderen Ende eine Carbonsäure. Dies ermöglicht wiederum die Polymerisation gleicher Moleküle zu Poly-6-Hydroxyhexansäure, welches mit der Struktur von PCL identisch ist. Weiterhin führt die Modifikation funktioneller Gruppen zur Bildung verschiedener Derivate, wie z. B. die Substitution der Alkoholfunktion zu einer Aminofunktion, wodurch 6-Amino-hexansäure (6-AHA) als Ausgangsstoff für die Herstellung eines Polyamids (PA) bereitgestellt wird. Solche Polyamide sind u. a. unter den Handelsnamen Nylon oder Perlon bekannt (Sattler *et al.* 2014) (Abb. 1-1).

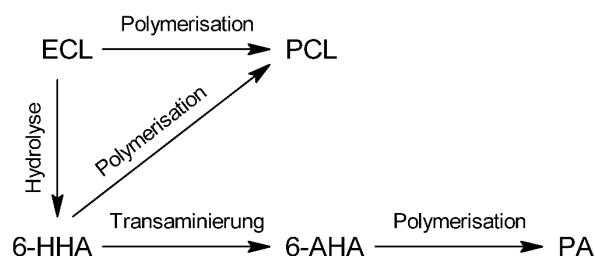


Abb. 1-1 Schematische Übersicht für weiterführende Reaktionen ausgehend von ECL.

Die industrielle Herstellung von ECL ist erdölbasiert (Reddy *et al.* 2013), dennoch gibt es Ansätze, die Ausgangsverbindungen für die Synthese von ECL aus nachwachsenden Rohstoffen zu gewin-

nen (Bu *et al.* 2011; Elder und Soltes 2007; Wedde *et al.* 2017). Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten sowie das Bestreben biologisch abbaubare Kunststoffe aus erneuerbaren Ressourcen zu erhalten und die wissenschaftlichen Fortschritte im Bereich der biotechnologischen Synthese von ECL und PCL haben dazu geführt, dass die Anzahl wissenschaftlicher Publikationen pro Jahr in den letzten 10 Jahren stetig gestiegen ist (Abb. 1-2). Dies verdeutlicht das Anwendungspotential von ECL und das Interesse seitens der Forschung und der Industrie.

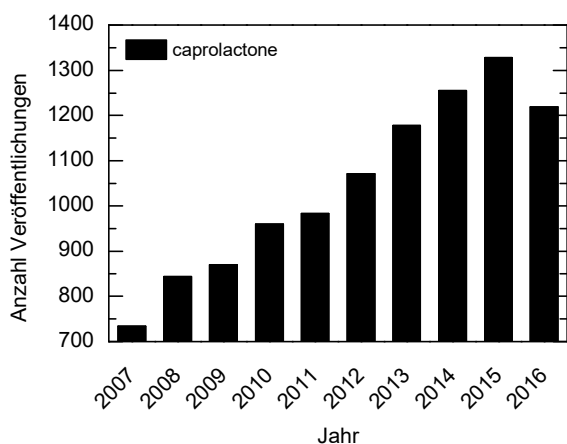


Abb. 1-2 Übersicht zu der Anzahl von Veröffentlichungen pro Jahr mit dem Wortinhalt „caprolactone“ im Zeitraum von 2007 bis 2016 (Quelle: Literaturdatenbank *Web of Science*, Stand: 01/2017).

1.2 Industrielle Biotechnologie

Die Biotechnologie ist eine Schnittstelle interdisziplinärer Verfahren aus den Bereichen der Natur- und Ingenieurwissenschaften. Durch die Anwendung verschiedener Methoden werden sich lebende Organismen (z. B. Bakterien, Pilze) oder daraus gewonnene Bestandteile (z. B. Enzyme, Metaboliten) zunutze gemacht, um neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu erzielen sowie industrielle Produkte zu entwickeln und Dienstleistungen bereitzustellen. Die industrielle Biotechnologie umfasst dabei u. a. die Herstellung von Biokatalysatoren und Verbindungen oder Wirkstoffen für die chemische Industrie und für pharmazeutische Anwendungen.

Im vergangenen Jahrzehnt hat sich die Biokatalyse als umweltbewusste und attraktive Alternative zu klassischen chemischen Verfahren etabliert (Bornscheuer *et al.* 2012; Drauz *et al.* 2012). Dies ist vor allem für die pharmazeutische Industrie und bei der Herstellung von Feinchemikalien von großer Bedeutung, da durch die Vorteile der Enzymkatalyse bestimmte Herstellungsprozesse einzelner Verbindungen optimiert und ökonomischer gestaltet werden können. Als grundlegende Vorteile von enzymatisch katalysierten Reaktionen gegenüber der chemischen Katalyse sind an dieser Stelle insbesondere die Regio- und Stereoselektivität sowie milde Reaktionsbedingungen zu nennen. Mittlerweile steht der organischen Synthese eine enorme Auswahl an Enzymen zur Verfügung, welche nach einer entsprechenden Nomenklatur in sechs Klassen und einer bestimmten EC-Nummer (engl.: *enzyme commission number*) unterteilt werden (Webb 1992) (Tab. 1-1). Die EC-Nummer besteht aus insgesamt vier durch einen Punkt getrennte Nummern, die eine individuelle Zuordnung der Enzyme zulässt. Durch die modernen Methoden der Gentechnik ist es möglich, die Enzyme gezielt zu verändern, um prozesstechnischen Anforderungen zu entsprechen.

Des Weiteren ist die Entdeckung neuer Enzyme und Mikroorganismen ein fortschreitender Prozess, so dass folglich auch die Vielfalt verfügbarer Biokatalysatoren immer größer wird. In der Bioverfahrenstechnik werden diese schließlich für den Aufbau industrieller Prozesse eingesetzt.

Tab. 1-1 Klassifizierung von Enzymen entsprechend der Reaktion, die sie katalysieren (Drauz *et al.* 2012).

EC-Nr.	Bezeichnung	Reaktionen
1	Oxidoreduktasen	Reduktion von C=O und C=C; Reduktive Aminierung von C=O; Oxidation von C-H, C=C, C-N und C-O; Reduktion und Oxidation von Cofaktoren
2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen wie Amino-, Acyl-, Phosphoryl-, Methyl-, Glykosyl-, Nitro- und schwefelenthaltende Gruppen
3	Hydrolasen	Hydrolyse von Estern, Amiden, Lactonen, Lactamen, Epoxiden, Nitrilen usw. sowie deren Bildung als Rückreaktion
4	Lyasen	Addition von kleinen Molekülen an Doppelbindungen wie C=C, C=N und C=O
5	Isomerasen	Isomerisierungen wie Racemesierung, Epimerisierung und Umlagerungen
6	Ligasen	Verknüpfung komplexer Verbindungen in Kombination mit der Umsetzung energiereicher Cofaktoren wie z. B. ATP

1.3 Enzymkinetik

1.3.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Kinetik beschreibt wie und mit welcher Geschwindigkeit eine Reaktion abläuft. In diesem Abschnitt soll eine Einführung in die Enzymkinetik erfolgen. Wird ein Substrat S durch ein Enzym E in ein Produkt P umgesetzt, erfolgt dies in mehreren Schritten. Das Substrat muss dafür zunächst in das freie Enzym diffundieren, um einen Enzym-Substrat-Komplex ES zu bilden (Gleichung (1-1)). Dieser erste Schritt ist reversibel. Im zweiten Schritt wird das Produkt irreversibel gebildet und das Enzym steht für eine neue Reaktion zur Verfügung. Die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Enzymaktivität enzymatisch katalysierter Reaktionen ist dabei abhängig von der Konzentration einzelner Stoffe bzw. der Substrate. Diese Annahme ist bekannt als Michaelis-Menten-Kinetik, welche auf den grundlegenden Untersuchungen früherer Arbeiten basiert (Cornish-Bowden 2015; Michaelis und Menten 1913).



Die zeitliche Änderung aller Komponenten sowie des Enzym-Substrat-Komplexes während einer Enzymreaktion aus Gleichung (1-1) ist in Abb. 1-3 dargestellt. Nach einer kurzen Anlaufphase

besteht ein Fließgleichgewicht (*steady-state*), bei dem die Änderung des Enzym-Substrat-Komplexes kaum noch stattfindet und dessen Konzentration daher als konstant angenommen wird (Briggs und Haldane 1925). Anhand dieser Vereinfachung kann durch die Umformung kinetischer Ausdrücke die Anfangsgeschwindigkeit v_0 einer Reaktion in Form der bekannten Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden (Gleichung (1-2)). Eine ausführliche Herleitung dieser Gleichung und Mechanismen zur Enzymreaktion mit mehreren Substraten sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen (Bisswanger 2000; Chmiel 2011).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1-2)$$

In Abb. 1-4 ist die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substratkonzentration ansteigt und sich asymptotisch einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} annähert. K_M wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet und entspricht der Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Der K_M -Wert ist eine zusammengefasste Größe, die als Maß für die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes dient und damit Rückschlüsse auf die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat zulässt. Je niedriger der K_M -Wert ist, desto größer ist die Bindungsaffinität und umgekehrt.

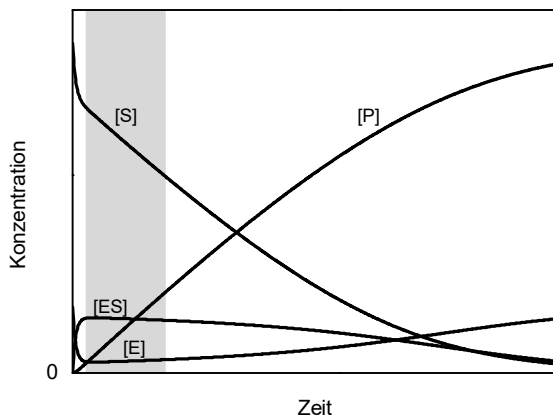


Abb. 1-3 Konzentrationsverläufe einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Der graue Bereich kennzeichnet in etwa die *steady-state*-Phase.

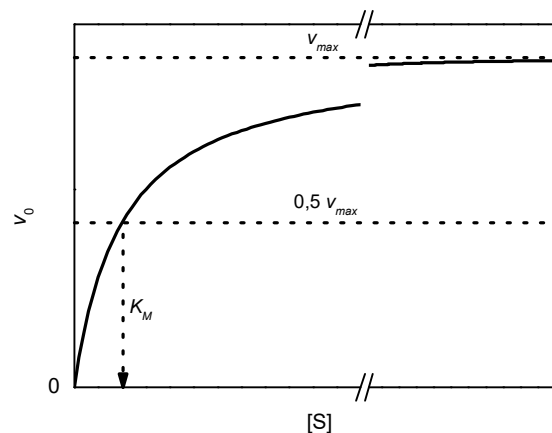
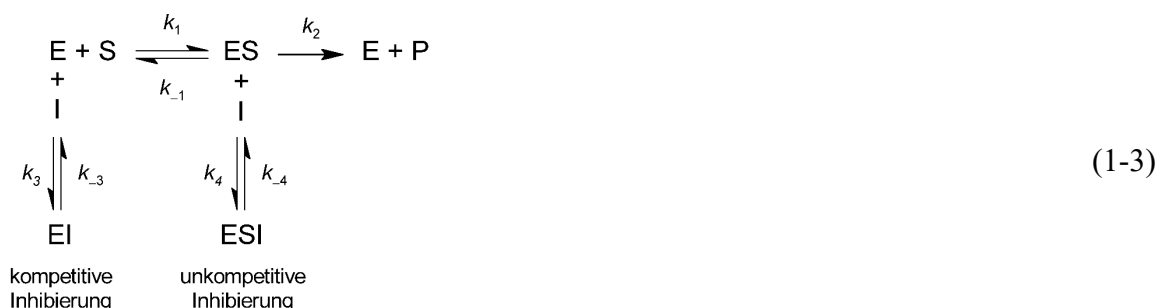


Abb. 1-4 Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_0 als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ zur grafischen Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung und den Parametern v_{max} und K_M .

1.3.2 Enzyminhibierung

Eine Enzyminhibierung bzw. Enzymhemmung tritt auf, wenn ein Inhibitor Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht oder direkt im aktiven Zentrum des Enzyms bindet und dadurch die Enzymaktivität verringert. Konkurriert ein Inhibitor I mit dem Substrat um dieselbe Bindestelle im aktiven Zentrum, handelt es sich um eine kompetitive Inhibierung. Bindet ein Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms und beeinträchtigt damit die Produktbildung, währenddessen ein Enzym-

Substrat-Komplex gebildet werden kann, wird von einer unkompetitiven Inhibierung gesprochen. Beide Modelle sind schematisch durch Gleichung (1-3) dargestellt. Auf weitere Inhibierungstypen soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden. Es wird dazu auf die o. g. Fachliteratur verwiesen. Analog zum K_M -Wert für ein Substrat existiert für einen Inhibitor eine entsprechende Inhibitor-Konstante K_I . Je nach Inhibierungstyp vergrößert sich durch die Einwirkung eines Inhibitors scheinbar der K_M -Wert bei der kompetitiven Inhibierung (Gleichung (1-4)) oder die Substratkonzentration im Nenner der Michaelis-Menten-Gleichung bei der unkompetitiven Inhibierung (Gleichung (1-5)), was durch einen entsprechenden Faktor ausgedrückt wird.



$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (1-4)$$

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (1-5)$$

1.4 Alkohol-Dehydrogenasen

1.4.1 Eigenschaften und Funktion

ADHs gehören der Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.1.1.x) an und katalysieren die Oxidation eines Alkohols zum Keton bzw. Aldehyd mit dem stöchiometrischen Umsatz von NAD(P)^+ zu NAD(P)H (Abb. 1-5). Dabei handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, so dass ebenso die Rückreaktion katalysiert wird. Diese Enzyme werden in diesem Zusammenhang auch als Kettoreduktasen bezeichnet.

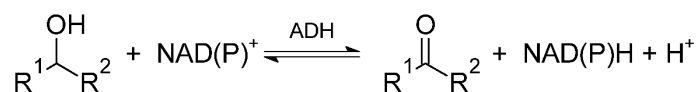


Abb. 1-5 Katalysierte Reaktion einer ADH.

ADHs repräsentieren eine große Vielfalt verschiedener Enzyme mit individuellen strukturellen und funktionalen Eigenschaften. Je nach Selektivität steht damit eine umfangreiche Auswahl geeigneter ADHs zur Verfügung. Obwohl sie nahezu überall vorzufinden sind, stammen die meisten kommerziell erhältlichen ADHs aus einer überschaubaren Auswahl verschiedener Organismen. Die bedeutendsten Vertreter der ADHs stammen damit aus Pferdeleber und verschiedenen Mikroorganismen wie *Thermoanaerobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Rhodococcus* sp., der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) u. v. a. Für eine Übersicht weiterer ADHs wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen (Drauz *et al.* 2012; Hollmann *et al.* 2011).

Die meisten ADHs sind NAD-abhängig und nur wenige NADP-abhängig. Diese Präferenz ist sehr spezifisch und lässt auf die natürliche Funktion in anabolischen oder katabolischen Stoffwechselwegen schließen. Für diese Arbeit wurde eine NADP-abhängige ADH aus *Lactobacillus kefir* eingesetzt. Sie gehört zur Familie der kurzketigen Dehydrogenasen und ist der ADH aus *L. brevis* sehr ähnlich (Hummel 1990; Niefind *et al.* 2000; Niefind *et al.* 2003). Im Jahr 2006 wurde sie erfolgreich in *E. coli* kloniert und biochemisch charakterisiert (Weckbecker und Hummel 2006). Eine Kristallstruktur dieser ADH ist in Abb. 1-6 dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass das Enzym aus einem Homotetramer mit jeweils einer Bindestelle für den Nikotinamid-Cofaktor besteht. Die einzelnen Untereinheiten sind zusätzlich mit Magnesiumionen assoziiert, welche zwar nicht direkt am katalytischen Mechanismus beteiligt sind, jedoch vermutlich eine strukturelle Bedeutung für die Konformation des aktiven Enzyms haben.

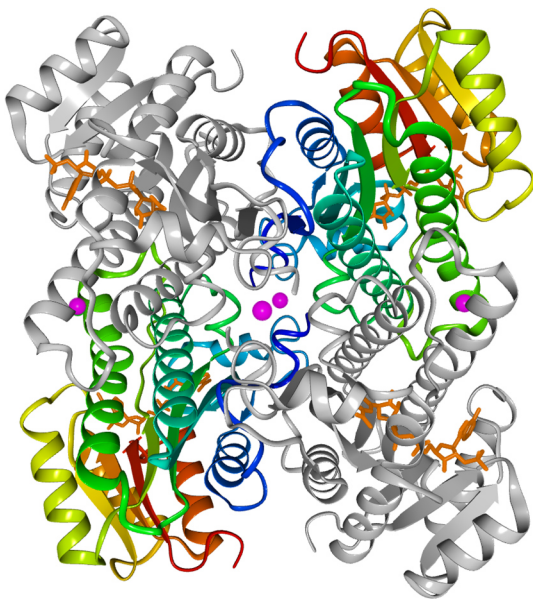


Abb. 1-6 Kristallstruktur der ADH aus *Lactobacillus kefir* als Homotetramer (26,8 kDa pro Monomer) in Cartoon-Darstellung (PDB Code: 4RF2) (Noey *et al.* 2015). Zur Unterscheidung einzelner Proteinketten sind zwei Untereinheiten in Regenbogenfarben von blau (C-Terminus) nach rot (N-Terminus), NADP⁺ in orange und Mg²⁺ in magenta hervorgehoben.

1.4.2 Reaktionsmechanismus

Der angenommene Reaktionsmechanismus für die Reduktion einer Carbonylfunktion ist in Abb. 1-7 dargestellt. Dabei ist das Zusammenspiel der sog. katalytischen Triade von Bedeutung, welche die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin beinhaltet (Ser143–Tyr156–Lys160). Des Weiteren werden Teile des Proteinrückgrats und Wasser in den Reaktionsmechanismus miteinbezogen.

Ser143 und Tyr156 dienen zunächst der Stabilisierung des Alkoholats, welches aus dem Keton durch den Übergang eines Hydrids von NADPH gebildet wurde. Durch die Übertragung eines Protons auf das Alkoholat werden der Alkohol und der Cofaktor NADP⁺ schließlich freigesetzt.

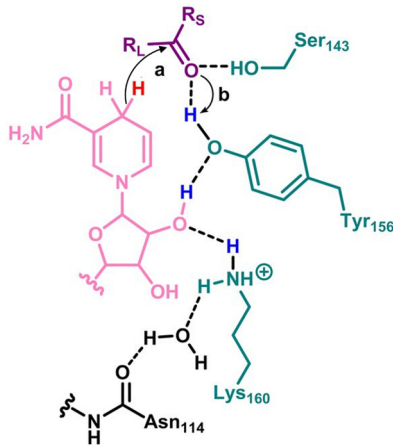


Abb. 1-7 Schematisch dargestellte Reduktion (a) und Protonierung des Alkoxids (b) in Ketoreduktasen. NADPH ist in rosa, das Substrat in violett und die katalytisch wirksamen Aminosäurereste (katalytische Triade) sind in petrol dargestellt (Noey *et al.* 2015).

1.5 Baeyer-Villiger-Monooxygenasen

1.5.1 Eigenschaften und Funktion

Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (BVMOs) gehören wie ADHs ebenfalls zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.14.13.x) und katalysieren die Baeyer-Villiger-Oxidation (BVO), die nach deren Entdeckern Adolf Baeyer und Victor Villiger benannt wurde (Baeyer und Villiger 1899). Da BVMOs Flavine enthalten, werden sie ebenfalls zur Gruppe der Flavoproteine gezählt. In der BVO wird ein Keton durch die Reaktion mit einer Peroxysäure als Oxidationsmittel zu einem Ester und einer zur Peroxysäure korrespondierenden Carbonsäure umgesetzt (Abb. 1-8). Bei der enzymatischen BVO wird statt einer Peroxysäure molekularer Sauerstoff verbraucht, von dem das eine Sauerstoffatom in das Substrat eingebracht und das andere zu Wasser umgesetzt wird. Dafür benötigen BVMOs zusätzlich einen Nikotinamid-Cofaktor wie NADH oder NADPH (Abb. 1-8).

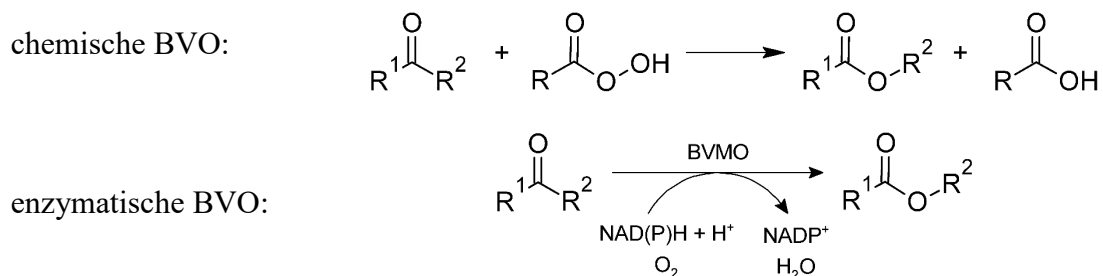


Abb. 1-8 Reaktionsgleichungen der chemisch und enzymatisch katalysierten Baeyer-Villiger-Oxidation.

Im Jahr 1976 wurde erstmals eine BVMO aus einem Bakterium der Gattung *Acinetobacter* beschrieben (Donoghue *et al.* 1976). Dabei handelte es sich um eine Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO), welche jedoch erst 1988 erfolgreich kloniert werden konnte (Chen *et al.* 1988). Die

Bezeichnung Monooxygenase kommt daher, dass nur ein Sauerstoffatom in die Ausgangsverbindung eingebracht wird. Sowohl bei der chemischen als auch bei der enzymatischen BVO erfolgt die Migration des Sauerstoffs i. d. R. durch die Umlagerung des nukleophileren bzw. des höher substituierten Kohlenstoffs und führt zur Bildung des „normalen“ Produktes. Dennoch kann die Migration durch bestimmte Liganden bei der chemischen BVO (Berezina *et al.* 2007; Romney *et al.* 2014; Watanabe *et al.* 2004) oder durch Substituenten am Substrat sowie durch Modifikationen im aktiven Zentrum des Enzyms entgegen dieser Präferenz erfolgen (Cernuchová und Mihovilovic 2007; Mihovilovic und Kapitán 2004). In diesem Fall wird das „abnormale“ Produkt gebildet. Viele BVMOs haben eine geringe Stabilität und verlieren daher relativ rasch an Aktivität. Die Phenylacetone-Monooxygenase (PAMO) aus *Thermobifida fusca* gilt als der bislang stabilste Vertreter der BVMOs und ermöglichte erstmals die Strukturaufklärung anhand einer Kristallstruktur (Malito *et al.* 2004). Kristallstrukturen weiterer BVMOs sind überschaubar und folgten erst Jahre später (Ferroni *et al.* 2016; Franceschini *et al.* 2012; Fürst *et al.* 2017; Isupov *et al.* 2015; Jensen *et al.* 2012; Mirza *et al.* 2009; Yachnin *et al.* 2012). Um die Stabilität einzelner BVMOs für den Einsatz in der organischen Synthese zu steigern, wurde eine Reihe von Varianten mittels *protein engineering* hervorgebracht (Bocola *et al.* 2005; Fraaije *et al.* 2005; Opperman und Reetz 2010; van Beek *et al.* 2012). Durch die stetig anhaltende Entdeckung neuer Enzyme aus den verschiedensten Mikroorganismen besteht außerdem die Chance, stabilere BVMOs zu erhalten. So konnte erst kürzlich eine stabile CHMO aus *Thermocrispum municipale* DSM 44069 charakterisiert und deren Struktur aufgeklärt werden (Romero *et al.* 2016).

BVMOs wurden zunächst in zwei Typen klassifiziert (Kamerbeek *et al.* 2003; Leisch *et al.* 2011; Willetts 1997). Typ I ist NADPH-abhängig und enthält ein nichtkovalent gebundenes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als prothetische Gruppe. Typ II ist hingegen NADH-abhängig und enthält ein Flavin-Mononukleotid (FMN). Später wurden weitere Flavin-Monooxygenasen identifiziert, die ebenfalls eine BVO katalysieren, jedoch kaum strukturelle Gemeinsamkeiten mit den ursprünglichen beiden Typen vorweisen (Beam *et al.* 2009). Als Biokatalysatoren für die Synthese medizinischer Wirkstoffe haben BVMOs industrielle Bedeutung bspw. für die asymmetrische Synthese von Esomeprazol (Bong, Clay, Collier, Mijts, Vogel, Zhang, Zhu, Nazor, Smith, Song, 2011; Cotton *et al.* 2000) oder die Synthese von Modafinil (Razzetti, Fassi, Allegrini, Riva, 2007) erlangt.

In dieser Arbeit wurde eine Mutante der CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 für den Umsatz von Cyclohexanon (CHN) zu ECL verwendet (Donoghue *et al.* 1976; Schmidt *et al.* 2015b). In Abb. 1-9 ist die Raumstruktur einer CHMO aus *Rhodococcus* sp. HI-31 dargestellt, die eine Sequenzhomologie von 58 % (BLAST*) bei einer ähnlichen Anzahl von Aminosäureresten mit der eingesetzten CHMO hat. Die roten Strukturbereiche kennzeichnen eine Sequenzhomologie über mindestens vier zusammenhängende Aminosäuren und formen das aktive Zentrum des Enzyms.

* Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.* 1997)



Abb. 1-9 Kristallstruktur einer CHMO aus *Rhodococcus* sp. HI-31 in Cartoon-Darstellung (PDB Code: 4RG3) (Yachnin *et al.* 2014). Rot markierte Bereiche kennzeichnen eine Sequenzhomologie mit der CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 (Chen *et al.* 1988) über mindestens vier zusammenhängende Aminosäuren, die hauptsächlich das aktive Zentrum umgeben. Die Cofaktoren NADP⁺ und FAD sind in grün und gelb hervorgehoben und gebundenes ECL in cyan.

1.5.2 Reaktionsmechanismus

Der enzymatische Reaktionsmechanismus der BVO stellt einen relativ komplexen Vorgang dar, welcher von Yachnin *et al.* in zehn Schritten postuliert wurde (Abb. 1-10). Die Komplexität des Mechanismus zeichnet sich dadurch aus, dass während der Reaktion nicht nur ein Substrat umgesetzt wird, sondern gleich drei Verbindungen (Substrat, Cofaktor und Sauerstoff) erforderlich sind, um das Zielprodukt zu erhalten. Des Weiteren wird der Umsatz nur durch die Beteiligung eines im Enzym lokalisierten FAD ermöglicht. Dieses wird zu Beginn der Reaktion mit NADPH zu FADH reduziert, wobei das entstandene NADP⁺ zur Stabilisierung im aktiven Zentrum verbleibt. Anschließend reagiert molekularer Sauerstoff mit dem reduzierten Flavin und bildet ein Intermediat in Form eines FAD-Peroxid-Anions – das enzymatische Pendant zur organischen Peroxysäure bei der chemischen BVO. Nachdem das Substrat in die enzymatische Bindungstasche diffundiert und sich durch Konformationsänderungen des aktiven Zentrums sowie des Cofaktors in eine katalytisch wirksame Position gelangt ist, erfolgt die Entstehung des Criegee-Intermediats und eigentliche Umlagerung zum Ester bzw. Lacton. Durch eine erneute Konformationsänderung des Enzyms wird das Produkt, gefolgt vom oxidierten Cofaktor, zurück ins Medium abgegeben und der Ausgangszustand ist wiederhergestellt.

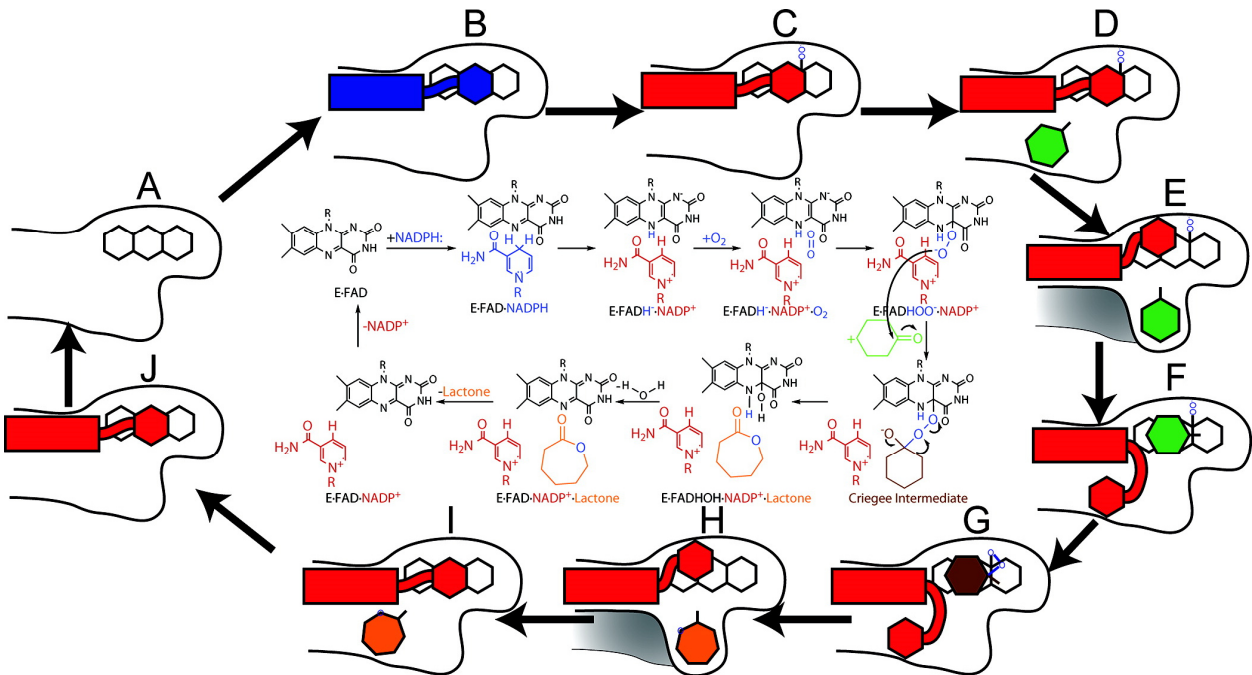


Abb. 1-10 Angenommener Reaktionsmechanismus der CHMO schematisch dargestellt (Yachnin *et al.* 2012). Einzelne Reaktionsschritte sind von A bis J gekennzeichnet. Schemata und chemische Strukturen in der Mitte sind in den gleichen Farben hervorgehoben. FAD ist mit drei verbundenen Sechsecken gekennzeichnet. Das reduzierte NADPH ist mit dem Adenin als Rechteck und dem Nikotinamid als Sechseck in blau und das oxidierte NADP⁺ ist in rot dargestellt. Das Substrat ist grün, das Lacton orange und das Criegee-Intermediat braun hervorgehoben.

1.6 Lipasen

1.6.1 Eigenschaften und Funktion

Lipasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3.1.1.x). Sie katalysieren genau wie Esterasen die Hydrolyse und die Bildung einer Esterbindung aus einer Carbonsäure und einem Alkohol (Abb. 1-11). Lipasen setzen bevorzugt Verbindungen um, die nicht in Wasser löslich sind und weisen damit verbundene strukturelle Unterschiede auf. Deshalb sind sie von Esterasen zu unterscheiden.

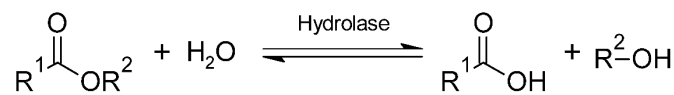


Abb. 1-11 Hydrolyse und Bildung eines Esters durch eine Hydrolase.

Die Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) ist die am besten untersuchte und kommerziell eingesetzte Lipase, wurde 1986 als eine von zwei Lipasen (A und B) aus *C. antarctica* identifiziert (Michiyo. 1986) und 1995 charakterisiert (Høegh *et al.* 1995). Erst kürzlich wurde eine aktuelle Kristallstruktur von CALB veröffentlicht (Strzelczyk *et al.* 2016), nachdem 1994 die ersten Kristallstrukturen gelöst wurden (Uppenberg *et al.* 1994b; Uppenberg *et al.* 1994a). Dadurch war es möglich, ein Strukturmotiv zu identifizieren, das aus acht parallel verlaufenden β -Faltblättern besteht, welche jeweils durch α -Helices getrennt vorliegen. Alle Lipasen und Esterasen weisen solch

ein Strukturmerkmal auf und werden damit der Familie der α/β -Hydrolasen zugeordnet (Nardini und Dijkstra 1999; Ollis *et al.* 1992; Sussman *et al.* 1991). Des Weiteren besitzt die CALB eine Glykosylierung (zwei N-Acetylglucosamine an Asp74) am Proteinrückgrat, welche in Abb. 1-12 zu erkennen ist. Im Unterschied zu anderen Lipasen findet keine Aktivierung des Enzyms an der Öl-Wasser-Grenzfläche statt und die Hydrolyse langkettiger Triglyceride verläuft eher langsam. Daher wäre die CALB eher den Esterasen als den Lipasen zuzuordnen (Martinelle *et al.* 1995). Seit der ersten Strukturaufklärung wurde lange angenommen, dass die CALB keine wie für Lipasen übliche Deckelstruktur besitzt, die den Zugang zum aktiven Zentrum reguliert (Uppenberg *et al.* 1994a). Erst 2015 konnten zwei α -Helices identifiziert werden, die eindeutig als eine Art Deckel fungieren und durch Konformationsänderung eine offene und eine geschlossene Struktur bilden (Stauch *et al.* 2015).

Aufgrund der Stabilität und der Aktivität gegenüber vielen verschiedenen Verbindungen wie Estern, Amiden und Thiolen ist die CALB vielfältig einsetzbar (Anderson *et al.* 1998). Neben der Umsetzung einfacher Ester können darüber hinaus Polymerisationen und Epoxidierungen an ungesättigten Carbonsäuren durchgeführt werden.

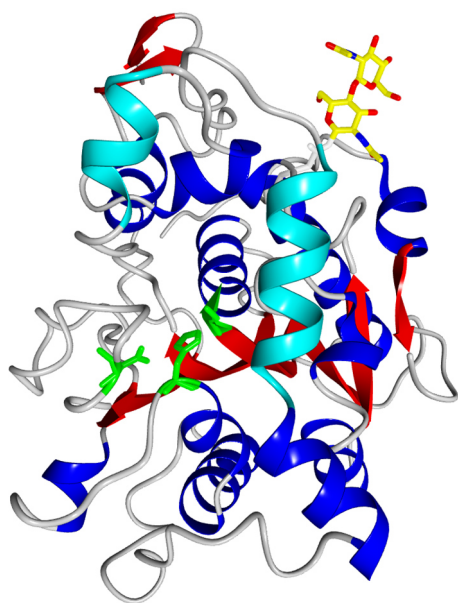


Abb. 1-12 Kristallstruktur von CALB in Cartoon-Darstellung (PDB Code: 4ZV7) (Strzelczyk *et al.* 2016). Sekundärstrukturelemente wie α -Helices und β -Faltblätter sind blau bzw. rot hervorgehoben. Die cyan-gefärbten α -Helices bilden eine flexible Region, die durch Konformationsänderung den Zugang zum aktiven Zentrum bestimmt. Zwei zusammenhängende und am Protein gebundene (Asn74) N-Acetylglucosamine sind gelb und die an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäurereste (Ser105-Asp187-His224) sind grün dargestellt.

1.6.2 Reaktionsmechanismus

Der katalytische Reaktionsmechanismus einer Lipase/Esterase wird grundlegend durch eine katalytische Triade, bestehend aus den typischen Aminosäureresten Glutaminsäure oder Asparaginsäure, Histidin und Serin ermöglicht. Der allgemeine Reaktionsmechanismus zur Hydrolyse und Bildung eines Esters ist schematisch in Abb. 1-13 gezeigt. Im Folgenden wird die Hydrolyse eines Esters anhand dieses Schemas im Uhrzeigersinn beschrieben. Die Bildung des Esters ist in umgekehrter Weise nachzuvollziehen.

Durch die Delokalisierung der Ladung entlang der katalytischen Triade wird die Deprotonierung des Serinrestes erreicht. Dies ermöglicht den nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des Esters, so dass sich ein tetraedrischer Übergangszustand einstellt. Durch das Oxyanion-Loch wird dieser Übergangszustand im aktiven Zentrum stabilisiert. Aus dieser Position heraus erfolgt dann die Eliminierung des Alkohols, wodurch der acylierte Serinrest zunächst im Oxyanion-Loch verbleibt. Durch die Einwirkung von Wasser stellt sich der tetraedrische Zustand erneut ein, wodurch anschließend die Carbonsäure gebildet und abgegeben wird. Der ursprüngliche Zustand des Enzyms ist damit wiederhergestellt.

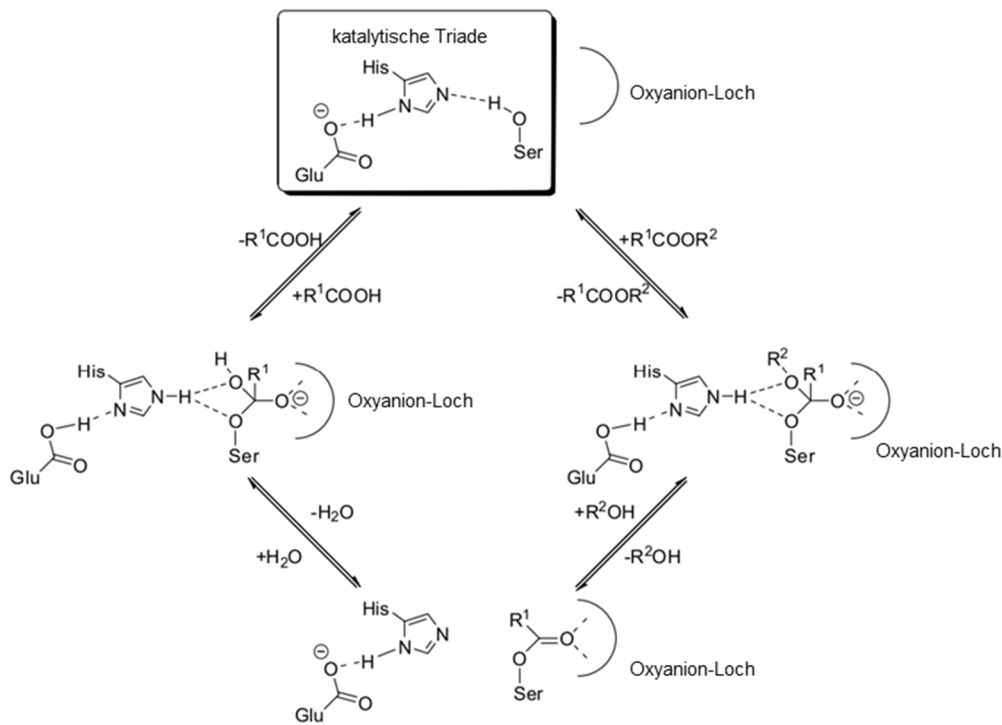


Abb. 1-13 Reaktionsmechanismus einer Esterase bzw. einer Lipase (Abb. nach (Drauz *et al.* 2012)).

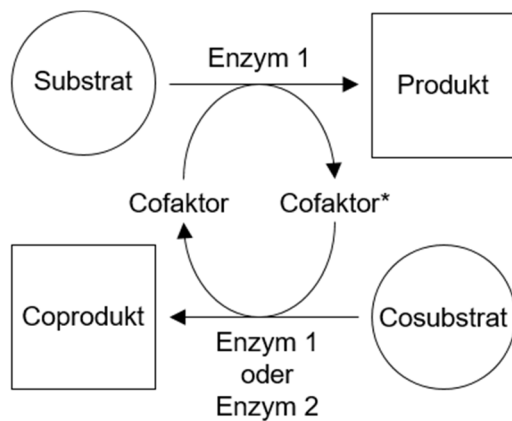
1.7 Cofaktorrecycling

Cofaktorabhängige Enzymreaktionen erfordern eine Regeneration des verbrauchten Cofaktors (Cofaktorrecycling), da die stöchiometrische Zugabe aufgrund der hohen Kosten der Cofaktoren für einen industriellen Prozess ungeeignet ist (Hummel und Gröger 2014; Kara *et al.* 2014). Für die enzymatische Reaktion von CHN zu ECL wird NADPH zu NADP⁺ umgesetzt, wodurch hier die Regeneration von NADPH im Vordergrund steht. Die Regeneration kann durch die Kopplung einer zweiten Enzymreaktion erfolgen, wie es schematisch in unterschiedlicher Art und Weise in Abb. 1-14 gezeigt ist. Durch das Cofaktorrecycling ist daher nur eine geringe Konzentration des Cofaktors erforderlich.

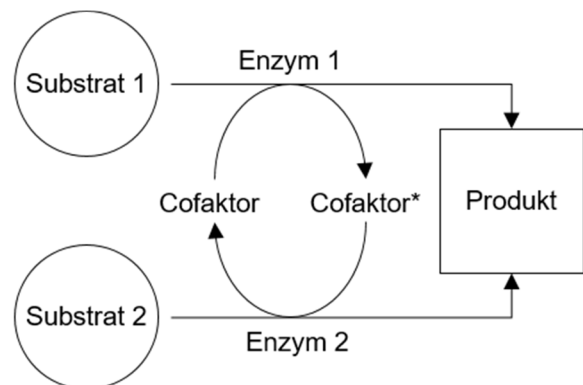
Oftmals eignet sich dafür eine zweite parallel verlaufende Reaktion, bei der durch ein weiteres Enzym ein Cosubstrat zu einem Coprodukt umgesetzt wird. Diese Reaktion kann gegebenenfalls auch durch ein und dasselbe Enzym erfolgen, was sich bspw. bei Reaktionen mit ADHs anbietet. Durch entsprechende Dehydrogenasen wird der Umsatz von Ameisensäure bzw. Formiat zu CO₂

(Seelbach *et al.* 1996), Isopropanol zu Aceton (Hummel 1990), Glukose zu Glukono-1,5-lacton (Wong *et al.* 1985), Glukose-6-phosphat zu Glukono-1,5-lacton-6-phosphat (Wong *et al.* 1981) oder Phosphat zu Phosphit (Woodyer *et al.* 2003) katalysiert, wobei NADP^+ zu NADPH reagiert. Die Bildung von CO_2 oder Aceton ist von besonderer Bedeutung, da das gebildete Gas sowie flüchtige Verbindungen der Reaktion entweichen und dadurch die Produktaufarbeitung erleichtern können. Der Einsatz von Phosphat als Cosubstrat stellt hierbei eine besonders kostengünstige Alternative dar. Idealerweise können gleich zwei industriell interessante Produkte hergestellt werden, sofern eine Kombination der Reaktionen über die Cofaktorregeneration möglich ist. Dies wurde bereits als PIKAT-Methode (engl.: *Parallel Interconnected Kinetic Asymmetric Transformations*) vorgestellt (Bisogno *et al.* 2010).

typisches Cofaktorrecycling / PIKAT:



konvergente Reaktionssequenz:



lineare Reaktionssequenz:

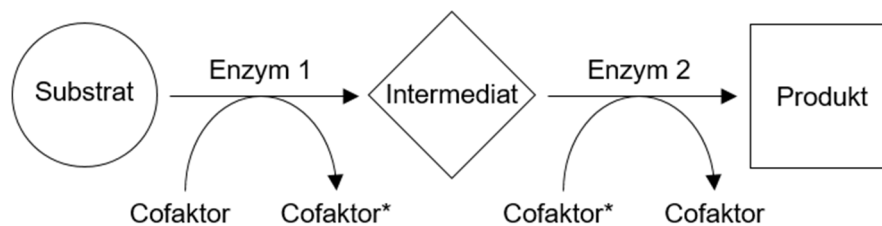


Abb. 1-14 Strategien zum Cofaktorrecycling. Cofaktor* entspricht dem entgegengesetzten Zustand des oxidierten oder reduzierten Cofaktors.

Beim konvergent verlaufenden Cofaktorrecycling werden zwei unterschiedliche Substrate eingesetzt, die durch zwei entsprechende Enzyme zu zwei Molekülen desselben Produkts umgesetzt werden. Dies konnte erfolgreich durch den Einsatz von 1,6-Hexandiol als zweites Substrat mit einer ADH für die Synthese von ECL demonstriert werden (Bornadel *et al.* 2015a). Aufgrund der individuellen Kombination der beiden Reaktionen ist diese Methode selten vorzufinden.

Als dritte Möglichkeit soll die linear verlaufende Reaktionssequenz vorgestellt werden, welche in dieser Arbeit angewendet wurde (Gagnon *et al.* 1994; Grogan *et al.* 1992). Dabei handelt es sich um zwei aufeinander folgende Reaktionsschritte, welche durch zwei Enzyme ermöglicht werden.

Für das in dieser Arbeit behandelte Reaktionssystem wird Cyclohexanol (CHL) als Substrat eingesetzt, welches im ersten Schritt zu CHN, dem Intermediat in der Sequenz, reagiert und anschließend zu ECL umgesetzt wird. Der erste Schritt wird dabei durch eine ADH und der zweite durch eine BVMO katalysiert (Mallin *et al.* 2013; Staudt *et al.* 2013). Der große Vorteil der konvergenten und der linearen Reaktionssequenz besteht darin, dass die eingesetzten Substrate ausschließlich in ein einziges Zielprodukt umgewandelt werden und am Ende der Reaktion kein Cosubstrat oder Coprodukt im Reaktionsgemisch verbleibt. Weiterhin sind chemische, elektrochemische und photobiokatalytische Methoden zur Regeneration des Cofaktors verfügbar, die an dieser Stelle lediglich erwähnt werden sollen (Hollmann *et al.* 2001; Kragl und Aivasidis 2005; Mifsud *et al.* 2014; Rauch *et al.* 2017).

1.8 Reaktoren

In Tab. 1-2 ist eine Auswahl verschiedener Reaktortypen gezeigt, die in dieser Arbeit behandelt oder diskutiert werden. Anhand der idealen zeit- und ortsabhängigen Konzentrationsverläufe können individuelle Eigenschaften und Betriebsmodi charakterisiert werden (Chmiel 2011; Doran 2013).

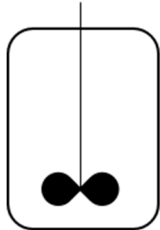
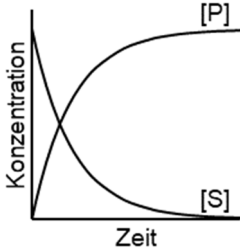
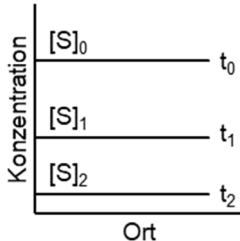
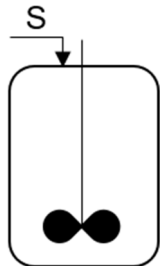
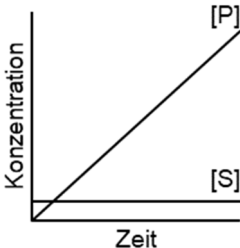
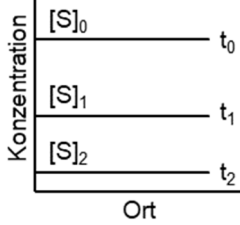

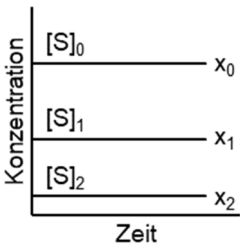
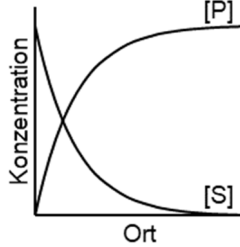
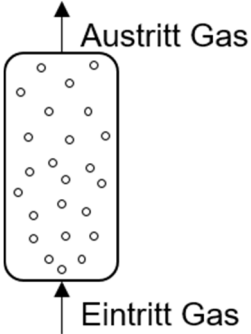
Beim Rührkessel (STR, engl.: *stirred tank reactor*) handelt es sich stark vereinfacht um einen Behälter mit einem Rührwerk für die Durchmischung. Im Satzbetrieb (engl.: *batch*) wird der Reaktor mit Substrat befüllt, das im Verlauf der Reaktion komplett zum Produkt umgesetzt wird. Die Reaktion ist damit abgeschlossen. Aufgrund der vollständigen Durchmischung ist die Konzentration an jedem Ort des Reaktors gleich groß. Im Zulaufverfahren (engl.: *fed batch*) wird das Substrat während der Reaktion solange hinzugegeben, bis die gewünschte Produktkonzentration oder ein anderer Grenzwert, wie z. B. das max. Reaktorvolumen, erreicht wurde. Die Produktkonzentration steigt dabei stetig an, wobei die Substratkonzentration niedrig bleibt. Das ist vor allem dann sinnvoll, wenn das Substrat eine toxische oder inhibierende Wirkung hat.

Das Strömungsrohr (PFR, engl.: *plug flow reactor*) oder auch der Festbettreaktor stellt einen Reaktor dar, bei dem das Substrat in Form eines Pfropfens durch einen rohrförmigen Behälter strömt, in dessen Innerem die Reaktion stattfindet. Im Festbettreaktor befindet sich die reaktive Zone, weil dort der Katalysator immobilisiert vorliegt. Der Stoffumsatz findet dabei entlang der Fließrichtung statt. Dadurch ist an einem bestimmten Ort zu jedem Zeitpunkt die Konzentration immer gleich. Dieser Reaktortyp ist u. a. für den kontinuierlichen Betrieb vorgesehen und wird teilweise in den experimentellen Aufbau in dieser Arbeit integriert, jedoch nicht als einzelner Reaktor für den kontinuierlichen Betrieb verwendet.

Die Blasensäule soll hier lediglich zum besseren Verständnis aufgeführt werden, da dieser Reaktortyp an einigen Stellen für Vergleiche herangezogen wird, allerdings in dieser Arbeit nicht eingesetzt wird. Bei diesem Reaktor befindet sich der Reaktionsansatz in einer vertikal ausgerichteten Säule, an der am Säulenboden ein Gas eingeleitet wird und am Säulenkopf wieder austritt. Die aufsteigenden Blasen gewährleisten dabei u. a. eine homogene Durchmischung. Die Blasensäule eignet sich wie der Rührkessel für den Satzbetrieb und für das Zulaufverfahren. Beide Reaktoren können aber auch durch einen zusätzlichen Produktablauf und weiteren Modifizierungen zur

Rückhaltung des Katalysators kontinuierlich betrieben werden. Der kontinuierliche Betrieb ist jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit und wird daher nicht näher erläutert.

Tab. 1-2 Schematische Übersicht idealer Reaktortypen mit den entsprechenden Konzentrationsverläufen für Substrat [S] und Produkt [P] als Funktion der Zeit und des Orts.

Rührkessel im Satzbetrieb:		
		
Rührkessel im Zulaufverfahren:		
		
Strömungsrohr:		
		
Blasensäule:		
	Satzbetrieb oder Zulaufverfahren möglich	

1.9 Begasungsstrategien

Für den erfolgreichen Verlauf einer sauerstoffabhängigen Reaktion muss eine entsprechende Sauerstoffversorgung in Form einer Begasung gewährleistet werden. Dafür steht eine Reihe verfahrenstechnischer Möglichkeiten zur Verfügung. In Abb. 1-15 ist eine Übersicht zu verschiedenen Begasungsarten gezeigt, für die sich jeweils Vor- und Nachteile ergeben, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen werden soll.

Die Blasenbegasung ist das am einfachsten und günstigsten umzusetzende Verfahren. Dies erfolgt durch einfaches Einleiten eines Gases in das Reaktionsmedium und hinreichender Rührleistung mittels eines separaten Rührers oder eines Hohlrührers. Bei einem Hohlrührer wird das Rührwerk durch das ausströmende Gas angetrieben. Eine Begasung mit gleichzeitiger Durchmischung kann ebenso durch den Einsatz einer Blasensäule erzielt werden. Dabei wird das Gas möglichst fein verteilt am Boden einer Wassersäule eingebracht, womit eine Durchmischung durch das Aufsteigen der Blasen an die Oberfläche erreicht wird. Die Blasenbegasung führt zu einer verstärkten Schaumbildung, wodurch auf molekularer Ebene hohe Scherkräfte an der Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit wirken, durch die Proteine denaturiert werden können (Caussette *et al.* 1998; Clarkson *et al.* 1999; Donaldson *et al.* 1980; Guzman *et al.* 1986).

Eine blasenfreie Begasung kann über die Oberfläche der Flüssigkeit durch Rühren erzielt werden. Dies lässt sich jedoch nur geringfügig skalieren, was auch immer eine Erhöhung der Rührleistung erfordert. Dadurch können ebenfalls hohe Scherkräfte entstehen.

Eine enzymeschonendere Art der Begasung stellt die Membranbegasung dar (Casey *et al.* 1999; Côté *et al.* 1989; Gabelman und Hwang 1999; Pankhania *et al.* 1994). Hierbei wird die Vergrößerung der Grenzfläche bei dem Einsatz poröser Membranen sowie die Durchlässigkeit von Gasen bestimmter Materialien bei der Verwendung dichter Membranen ausgenutzt. Poröse Membranen haben gegenüber dichten Membranen den Vorteil, dass der Gasaustausch direkt über die Poren an der Grenzfläche erfolgt und keine zusätzliche Diffusionsbarriere einer Membran überwunden werden muss. Allerdings kann Flüssigkeit aus den Poren austreten, wenn der flüssigkeitsseitige Druck zu hoch ist. Weiterhin ist eine Blockierung der Poren durch Unreinheiten, ausgefallene Proteine oder mikrobielles Wachstum möglich. In diesem Fall ist ein Austausch der Membran oder eine aufwendige Reinigung erforderlich. Für die Begasung mit einer dichten Membran wird bevorzugt Silikon als Material eingesetzt (Rissom *et al.* 1997). Silikon ist relativ beständig gegenüber chemischer und mechanischer Beanspruchung und leicht zu reinigen. Das Gas muss allerdings zusätzlich durch die Membran diffundieren, was einen geringeren Stoffübergang vom Gas in die Flüssigkeit bewirkt. Durch den Einsatz einer größeren Membranoberfläche oder einem höheren gaseitigen Druck kann der verringerte Stoffübergang kompensiert werden.

Alternativ kann bspw. Sauerstoff *in situ* freigesetzt werden (Schlegel 1977). Mit Hilfe des Enzyms Katalase wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das der Reaktion dann zugeführt werden muss, zu Wasser und Sauerstoff enzymatisch umgesetzt. Da H_2O_2 ein starkes Oxidationsmittel ist, sollte eine ausgewogene Dosierung zur Reaktion erfolgen, um eine Denaturierung der Enzyme zu vermeiden.

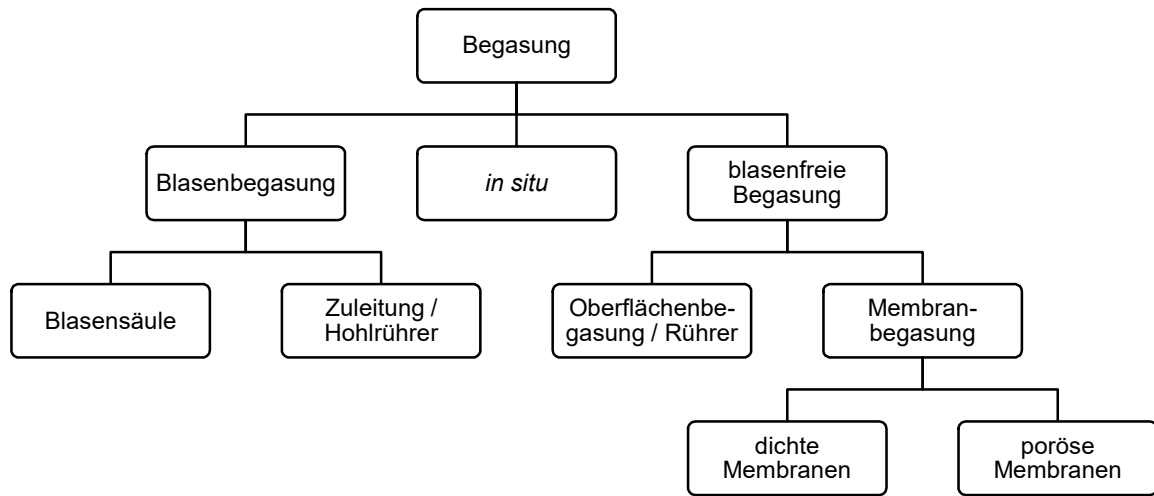


Abb. 1-15 Begasungsarten.

2 Motivation und Zielsetzung

Seit der Entdeckung der BVMOs steht auch die biokatalytische Synthese von ECL im Fokus der Wissenschaft. Lactone wie ECL sind aufgrund der Ringöffnungspolymerisation für die Herstellung von PCL interessant, da im Vergleich zu anderen Veresterungsreaktionen hierbei kein Wasser als Nebenprodukt entsteht. Die industrielle Herstellung von ECL erfolgt über die chemische BVO ausgehend von CHN. Der Einsatz von konzentrierten Peroxysäuren als Oxidationsmittel und anderen chemischen Katalysatoren stellen dabei sicherheitsrelevante Faktoren sowie gesundheitliche Risiken dar. Des Weiteren entstehen in diesem Prozess Nebenprodukte u. a. durch eine verringerte Selektivität der Reaktion bzgl. ECL. Gegenüber der konventionellen, chemischen Synthese soll im Rahmen dieser Arbeit ein biotechnologischer Ansatz näher untersucht und dargestellt werden, der aus den Ergebnissen früherer Arbeiten hervorgeht (Staudt *et al.* 2013). Im Vergleich zur chemischen Synthese besteht der Vorteil darin, dass Reaktionen mittels Biokatalyse unter milderen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden können und aufgrund der Selektivitäten der eingesetzten Biokatalysatoren keine Neben- oder Folgeprodukte entstehen. Dieser biokatalytische Ansatz ist in Abb. 2-1 gezeigt und stellt die zweistufige Synthese von ECL dar. Dabei ist der zweite Reaktionsschritt entscheidend, welcher mittels einer BVMO katalysiert wird und in dem CHN unter dem Verbrauch von molekularem Sauerstoff – als umweltfreundliches Oxidationsmittel – zu ECL umgesetzt wird. Da das Enzym für diese Reaktion den Nikotinamid-Cofaktor NADPH benötigt und verbraucht, ist eine entsprechende Regeneration von NADPH erforderlich, da dieser sehr teuer ist und der Reaktion daher nicht stöchiometrisch zugesetzt werden kann. Für die Regeneration dient daher der erste Reaktionsschritt, bei dem CHL mittels einer ADH zu CHN oxidiert und gleichzeitig der Cofaktor reduziert wird, wodurch dieser nur in der Form für den bevorstehenden zweiten Reaktionsschritt von der BVMO genutzt werden kann. Im Gegensatz zur chemischen Synthese entstehen aufgrund der hohen Selektivität der Enzyme keine Nebenprodukte. Der Verzicht von chemischen Oxidationsmitteln und der Einsatz von Wasser als Reaktionsmedium stellt daher eine biotechnologische Alternative dar.

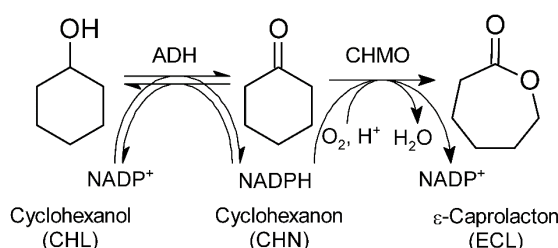


Abb. 2-1 Biokatalytische Synthese von ECL über eine zweistufige Reaktion ausgehend von CHL, das im ersten Oxidationsschritt mittels einer ADH zu CHN umgesetzt wird. Der zweite Oxidationsschritt wird mittels einer BVMO katalysiert, wobei molekularer Sauerstoff als umweltfreundliches Oxidationsmittel eingesetzt wird. Innerhalb der Reaktionssequenz wird der verbrauchte Nikotinamid-Cofaktor regeneriert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Prozessentwicklung für diesen biotechnologischen Ansatz mit freien Enzymen durchgeführt werden. Hierfür sollen zunächst die optimalen Reaktionsbedingungen wie pH und Temperatur unter der Berücksichtigung von Stabilität und Aktivität von ADH und CHMO festgelegt werden. Anschließend werden die Katalysatoren hinsichtlich deren Kinetik genauer untersucht, um kinetische Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik zu ermitteln. Diese sollen dann zur Erstellung eines kinetischen Modells eingesetzt werden, die wiederum die Charakterisierung und Optimierung des Reaktionssystems in unterschiedlichen Reaktorkonzepten ermöglichen. Hierfür sind Reaktionen im Satzbetrieb und im Zulaufverfahren anzuwenden, um bereits bekannte Inhibierungen durch CHL und CHN zu überwinden und beide Reaktorkonzepte gegenüberzustellen. Neben CHL wird molekularer Sauerstoff während der Reaktion umgesetzt. Hierfür ist die Entwicklung eines Membranmoduls zur Begasung des Reaktionsmediums sowie die Quantifizierung des Sauerstoffeintrags erforderlich und in den experimentellen Aufbau zu integrieren. Des Weiteren sollen Strategien zur Vermeidung einer Produktinhibierung durch ECL erarbeitet werden. Hierfür kann das katalytische Potential einer Lipase ausgenutzt werden, die ECL sowohl zu PCL polymerisieren als auch zur korrespondierenden Hydroxysäure hydrolysieren kann. Abschließend soll die biokatalytische Polymerisation von ECL bzw. 6-HHA durchgeführt werden, um einen Vergleich mit einem chemisch hergestellten Pendant anzustellen.

3 Festlegung der Reaktionsbedingungen

3.1 pH-Wert und Puffer

Die Enzymaktivität wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Ein wichtiger Parameter ist der pH-Wert. Über den pH-Wert wird die Protonierung einiger Aminosäurereste eines Proteins sowie von chemischen Verbindungen mit entsprechenden funktionellen Gruppen bestimmt. Dadurch ändern sich die Ladung und ionische Wechselwirkungen innerhalb eines Moleküls und zwischen verschiedenen Molekülen, was wiederum die Löslichkeit in einem umgebenden Medium bestimmt. Naturgemäß ist dieses Medium Wasser. Bei Proteinen führt daher die Änderung des pH-Werts zur Änderung der Raumstruktur, was den Zugang eines Substrats in das aktive Zentrum beeinflussen kann. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass das Substrat durch die Änderung des pH-Werts strukturell wie auch funktionell so beeinträchtigt wird, dass kein Zugang zum aktiven Zentrum oder keine Katalyse mehr möglich ist. Enzyme weisen daher in einem bestimmten pH-Bereich eine maximale Aktivität auf. Dieser pH-Bereich ist jedoch nicht für jedes Enzym gleich und variiert durch die unterschiedliche Beschaffenheit der verschiedenen Enzyme.

Für die zweistufige Synthese von ECL wurden die Enzyme ADH und CHMO hinsichtlich ihrer pH-Präferenzen untersucht. Um Schwankungen des pH-Werts zu vermeiden, fanden Lagerung und Reaktionen in gepufferten Lösungen statt. Dabei kann die Puffersubstanz ebenfalls die Aktivität und Stabilität eines Enzyms beeinflussen. Zur Bestimmung des pH-Werts für die maximale Enzymaktivität innerhalb der gesamten Reaktionssequenz wurden daher die Aktivitäten beider Enzyme bezüglich ihrer Substrate in verschiedenen Puffern von pH 6,5 bis 9 untersucht (Abb. 3-1).

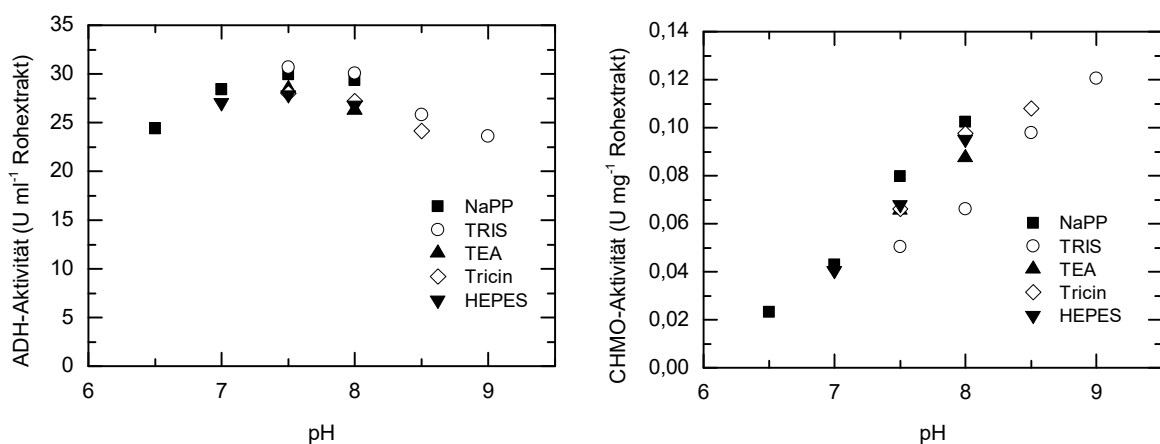


Abb. 3-1 Enzymaktivitäten von ADH und CHMO in Abhängigkeit vom pH und Puffersubstanz (50 mM). Die Enzymaktivität entspricht der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit unter den jeweiligen Bedingungen bei Raumtemperatur (23±2 °C) und wurde doppelt bestimmt. Reaktionsbedingungen ADH-Aktivität: 1 mM CHL, 0,2 mM NADP⁺. Reaktionsbedingungen CHMO-Aktivität: 1 mM CHN, 0,2 mM NADPH.

Die Enzyme wurden hierfür in Form eines bakteriellen, zellfreien Rohextraktes in Natriumphosphatpuffer (NaPP) (ADH) oder in NaPP gelöstes Lyophilisat (CHMO) als Stammlösungen eingesetzt und in den verschiedenen Pufferlösungen verdünnt. Für die ADH ist die Oxidation von CHL zu CHN und für die CHMO die Oxidation von CHN zu ECL untersucht worden.

Bei der ADH nahm die Aktivität zwischen pH 6,5 und 7,5 mit steigendem Wert zu und sank zwischen pH 8 und 9 wieder ab. Damit konnte ein pH für die Reaktion mit der maximalen Enzymaktivität bei pH 7,5–8 für die Puffer NaPP und TRIS ermittelt werden. Die Aktivitäten bei pH 6,5 und 9 waren, verglichen mit dem Maximalwert für TRIS bei pH 7,5, um 20 bzw. 23 % niedriger. Insgesamt zeigte die ADH ähnliche Aktivitäten in den verschiedenen Puffersubstanzen bei gleichem pH-Wert auf. Daraus war zu schließen, dass der Einfluss der getesteten Puffersalze kaum einen Effekt auf die Aktivität der ADH hatte.

Für die CHMO war mit steigendem pH und zunehmender Aktivität ein klarer Trend in Richtung höherer pH-Werte zu erkennen. Die niedrigste Aktivität wurde in NaPP bei pH 6,5 und die höchste in TRIS bei pH 9 gemessen. Beide Puffersubstanzen decken im Vergleich zu den übrigen Puffern einen breiteren pH-Bereich ab und ließen damit eine bessere Einschätzung über die pH-Abhängigkeit der CHMO-Aktivität zu. In NaPP sowie in TRIS nahm die Aktivität mit steigendem pH signifikant zu. Im pH-Bereich 7,5–8 überlappen die beiden Pufferbereiche, wodurch ein direkter Vergleich zwischen den Aktivitäten in NaPP und TRIS möglich war. Die Aktivitäten in TRIS bei pH 7,5 und 8 entsprachen dabei nur 63 bzw. 65 % der Aktivität, die bei gleichem pH in NaPP ermittelt wurden und damit auch den niedrigsten Aktivitäten im Vergleich zu den übrigen Puffern. Daher schien TRIS einen aktivitätsmindernden Effekt auf die CHMO zu haben, obwohl bei höheren pH-Werten eine Zunahme der Enzymaktivität in TRIS festgestellt werden konnte. Als optimaler pH-Wert für weitere Untersuchungen wurde unter der Berücksichtigung der pH-Präferenz beider Enzyme pH 8 und als Puffersubstanz NaPP festgelegt.

3.2 Temperatur

Die Temperatur stellt einen weiteren Faktor für die enzymatische Katalyse dar, welcher nicht nur die Aktivität eines Enzyms beeinflusst, sondern insbesondere dessen Stabilität. Bekanntlich nimmt mit steigender Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit zu, was mit der Arrhenius-Gleichung ausgedrückt wird. Die Proteinstruktur ist durch die Zusammenstellung einzelner Aminosäureseitenketten bestimmt. Diese Seitenketten haben eine unterschiedliche Hydrophobizität. Hydrophobe Aminosäurereste sind vorwiegend im Inneren eines Proteins lokalisiert. Die weniger hydrophoben Aminosäurereste zeigen sich eher dem wässrigen Lösungsmittel zugewandt. Durch interne Wasserstoff-Brückenbindungen werden die regulären Sekundärstrukturen wie α -Helix und β -Faltblatt gebildet und stabilisiert. Bei einer Erhöhung der Temperatur brechen diese Wasserstoff-Brückenbindungen auf, wodurch Sekundärstrukturen aufgelöst werden und sich das Protein auffaltet. Hydrophobe Bereiche treten mit der wässrigen Umgebung in Kontakt und führen dazu, dass das Protein nicht mehr in Lösung gehalten werden kann und damit ausfällt. Das Protein ist damit irreversibel denaturiert. Die meisten Proteine denaturieren bei Temperaturen über 40 °C. In besonderen Fällen, wie bei extremophilen Mikroorganismen, sind Enzyme auch bei höheren Temperaturen bis

zu 100 °C noch aktiv (Demirjian *et al.* 2001). Die Stabilität einzelner Enzyme gegenüber der Temperatur variiert und wurde daher für ADH und CHMO untersucht. Dadurch sollte die für beide Enzyme optimale Reaktionstemperatur bestimmt werden. Hierfür wurden Verdünnungen der beiden Enzyme bei 25–40 °C für 30 min inkubiert und anschließend die Enzymaktivität gemessen (Abb. 3-2). Die Ergebnisse zeigen für beide Enzyme eine Verringerung der Aktivität mit zunehmender Temperatur, bei der inkubiert wurde. Die ADH hatte im Vergleich zur CHMO eine etwas höhere Stabilität, da nach der Inkubation bei 30, 35 und 40 °C eine höhere Restaktivität gemessen werden konnte. Für die CHMO konnte bei 40 °C kaum noch eine Restaktivität bestimmt werden. Da für beide Enzyme bei 25 °C kaum ein Aktivitätsverlust zu verzeichnen war, wurde diese Temperatur als optimale Reaktionstemperatur festgelegt.

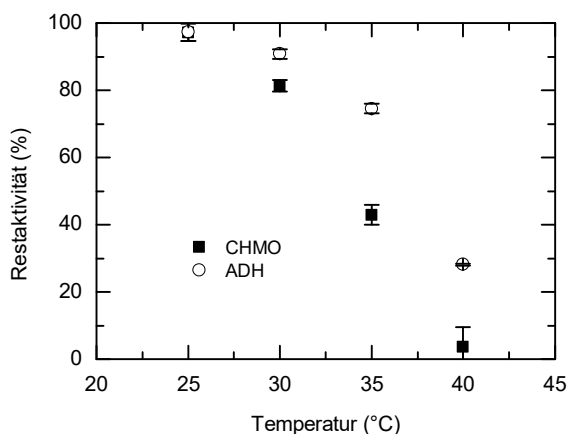


Abb. 3-2 Enzymaktivität von ADH und CHMO nach 30 min Inkubation bei unterschiedlicher Temperatur. Reaktionsbedingungen: 0,27 mM NADPH und 0,01 % (v/v) (97 mM) CHN zur Bestimmung der CHMO-Aktivität, 0,39 mM NADP⁺ und 0,01 % (v/v) (96 mM) CHL zur Bestimmung der ADH-Aktivität, NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.

3.3 Löslichkeit der Reaktanten

Für den zu untersuchenden Prozess sollten die Enzyme gelöst in einem wässrigen Reaktionsmedium eingesetzt werden. Für das zweistufige Reaktionssystem waren neben dem Cofaktor die Komponenten CHL als einzusetzendes Substrat, CHN als Intermediat und gleichzeitig Substrat im zweiten Oxidationsschritt sowie ECL als Produkt zu berücksichtigen. Das Prozessdesign richtet sich u. a. nach der Löslichkeit der Substrate und Produkte einer Reaktion. Dabei ist zu entscheiden, ob im Falle einer niedrigen Wasserlöslichkeit des Substrates die Löslichkeit durch den Einsatz von Detergenzien erhöht werden kann oder ob eher ein zweiphasiges System berücksichtigt werden sollte. Zeigt das Produkt hingegen eine niedrige Wasserlöslichkeit, kann dies von Vorteil sein, da hier eine Isolierung durch Filtration erleichtert wird. Andererseits können sich ausgefallene, unlösliche Komponenten auch negativ auswirken, wenn bspw. ein Reaktionsansatz durch eine Pumpe gefördert werden soll. Dafür wären dann verschiedene verfahrenstechnische Lösungsansätze erforderlich. Zur Beurteilung der Wasserlöslichkeit der einzelnen Komponenten wurden Literaturwerte herangezogen.

Für CHL liegt die Wasserlöslichkeit bei $36^* - 40^\dagger \text{ g l}^{-1}$ (20 °C) und für CHN bei $90^* - 103^\dagger \text{ g l}^{-1}$ (20 bzw. 25 °C). Die Löslichkeit für CHN spielt für das bestehende Reaktionssystem eine untergeordnete Rolle, da CHN als Intermediat nur in sehr niedriger Konzentration um etwa 1 mM vorliegen sollte. Die begrenzte Löslichkeit von CHL hat zur Folge, dass Reaktionen maximal mit einer gelösten Konzentration von ca. 400 mM durchgeführt werden können. Wird der Wert überschritten, liegt ein zweiphasiges System vor. Zu der relativ niedrigen Löslichkeit von CHL in Wasser ist weiterhin eine gründliche Durchmischung erforderlich, um CHL in Wasser zu lösen. Das heißt, dass CHL als Substrat in Form einer in Wasser vorbereiteten Lösung zu dem Reaktionsansatz gegeben werden sollte. Für ein zweiphasiges System müsste entsprechend gerührt werden. ECL ist hingegen mit Wasser vollständig mischbar.

3.4 Zusammenfassung

Für die enzymatischen Reaktionen wurden zunächst die optimalen Reaktionsbedingungen unter Berücksichtigung der jeweiligen Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom pH und von der Temperaturstabilität von ADH und CHMO bestimmt. Des Weiteren wurde die Löslichkeit von CHL und ECL in Wasser berücksichtigt, um mögliche Limitierungen bei der Prozessentwicklung abschätzen zu können.

- Der optimale pH-Wert wurde auf pH 8 festgelegt und als Puffersubstanz ist NaPP gewählt worden.
- ADH und CHMO hatten nach der Inkubation bei Temperaturen über 25 °C eine verringerte Restaktivität. Somit wurde eine optimale Reaktionstemperatur von 25 °C bestimmt.
- Die maximale Löslichkeit von CHL in Wasser liegt bei 40 g l^{-1} ($\sim 400 \text{ mM}$) und limitiert höhere Substratkonzentrationen in einem einphasigen Reaktionssystem. Durch die mäßige Löslichkeit ist eine gründliche Durchmischung erforderlich, um CHL in Wasser vollständig zu lösen. Um die Enzyme durch auftretende Scherkräfte nicht zu schädigen, sollte CHL separat in Wasser vorgelöst werden.
- CHN sollte als Intermediat nur in geringer Konzentration um ca. 1 mM vorliegen. Die Löslichkeit für CHN ist damit zu vernachlässigen.
- ECL ist mit Wasser vollständig mischbar.

* GESTIS-Stoffdatenbank, Gefahrenstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung

† (Musser 2000)

4 Enzymkinetik*

In diesem Kapitel soll die Kinetik der beiden Enzyme ADH und CHMO untersucht werden. Als Katalysatoren für das zweistufige Reaktionssystem bilden sie die Grundlage für die Prozessentwicklung und müssen aufeinander abgestimmt werden. Für die kinetischen Untersuchungen wurden beide Enzyme frei in Form eines bakteriellen, zellfreien Rohextrakts eingesetzt. Das heißt, sie sind nicht gereinigt worden, sondern wurden nach dem Zellaufschluss von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Obwohl die rekombinant hergestellten Zielproteine in *E. coli* überexprimiert wurden, sind endogene Enzyme und Metaboliten im Rohextrakt enthalten. Dies hat zur Folge, dass die Aktivität nur auf das eingesetzte Volumen des Rohextrakts bezogen werden konnte und nicht auf die spezifische Enzymkonzentration, da diese nicht getrennt von der gesamten Proteinkonzentration zu ermitteln war. Die zugrunde gelegte Michaelis-Menten-Kinetik beinhaltet die Kenntnis über spezifische Konstanten wie v_{max} und K_M . v_{max} gibt die maximale Enzymaktivität an und wird i. d. R. als spezifische Enzymaktivität auf die exakte Menge des Enzyms bezogen. Da die spezifische Enzymaktivität sowie die eingesetzte Konzentration des Enzyms nicht bekannt waren, wurden beide Werte als volumenbezogene Konstante a_{max} in Gleichung (4-1) zusammengefasst.

$$a_{max} = v_{max} \cdot [E] \quad (4-1)$$

4.1 Kinetik der Alkohol-Dehydrogenase

Der erste Oxidationsschritt des Reaktionssystems besteht darin, die Umsetzung von CHL zu CHN mittels der ADH zu katalysieren. Dabei handelt es sich um ein Redoxsystem, bei dem CHL zu CHN oxidiert und NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert wird (Abb. 4-1). Diese Reaktion ist reversibel und danach bestrebt, ein thermodynamisches Gleichgewicht zu erreichen. Zur Beschreibung der ADH-Kinetik wurden sowohl die Oxidation von CHL als auch die Reduktion von CHN untersucht.

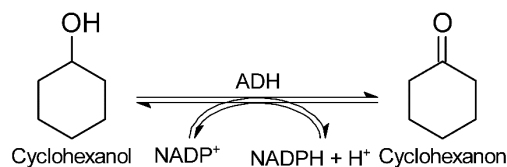


Abb. 4-1 Gleichgewichtsreaktion zwischen CHL und CHN sowie den Cofaktoren NADP^+ und NADPH mit der ADH als Katalysator.

* Ergebnisse in diesem Kapitel sind Bestandteil einer Veröffentlichung (Scherkus *et al.* 2017).

4.1.1 Oxidation von Cyclohexanol

Da ein Redoxsystem immer zwei korrespondierende Redoxpaare erfordert, muss für die ADH eine Kinetik für zwei Substrate ermittelt werden. Das bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms nicht nur von der Konzentration eines Substrates abhängt, sondern zusätzlich von der Konzentration des Cofaktors als zweites Substrat. Für jedes Substrat wird daher auch ein K_M -Wert bestimmt. Die Michaelis-Menten-Gleichung für zwei Substrate drückt die Gleichung (4-2) aus.

$$v_{ADH}^{ox} = a_{max}^{ox} \cdot \frac{[CHL]}{K_M^{CHL} + [CHL]} \cdot \frac{[NADP^+]}{K_M^{NADP^+} + [NADP^+]} \quad (4-2)$$

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber den Konzentrationen von CHL und $NADP^+$ ist in Abb. 4-2 dargestellt. Dabei wurde während der kinetischen Untersuchung des einen Substrates die Konzentration des zweiten Substrates konstant gehalten und umgekehrt. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Konzentration der beiden Komponenten jeweils eine Zunahme der Enzymaktivität besteht. Aus den einzelnen Messwerten eines Verlaufes wurde durch eine nicht-lineare Regression der jeweilige Verlauf an die Kinetik für ein Substrat angepasst. Dadurch konnten K_M -Werte von $10,1 \pm 0,9$ mM für CHL und 51 ± 3 μ M für $NADP^+$ bestimmt werden. Anschließend sind die Verläufe durch Einsetzen der jeweils konstant gehaltenen Konzentration und der ermittelten K_M -Werte erneut an Gleichung (4-2) angepasst worden, um a_{max} zu erhalten. Der aus beiden Verläufen gemittelte Wert für a_{max}^{ox} betrug $251,9 \pm 3,9$ U ml⁻¹.

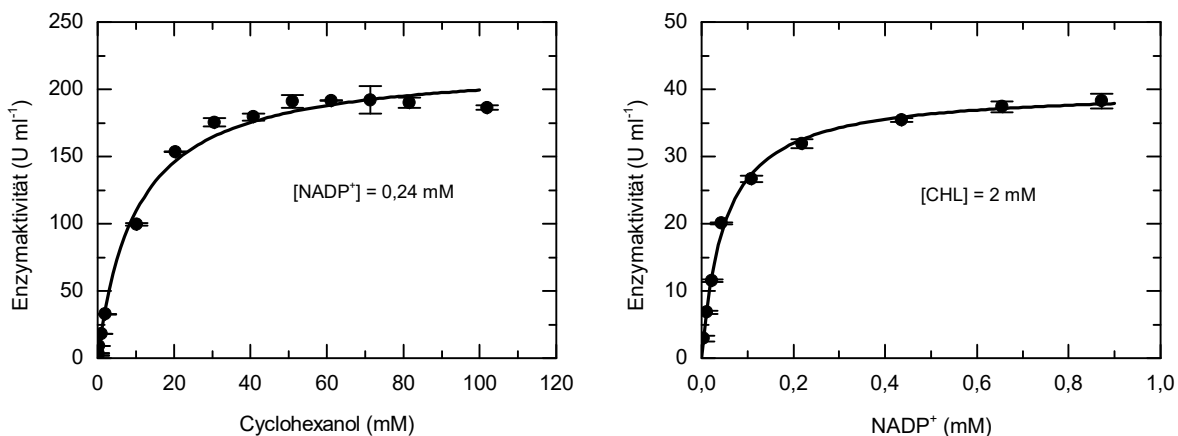


Abb. 4-2 Michaelis-Menten-Kinetik der ADH für den Umsatz von CHL und $NADP^+$ bei 25 °C in NaPP (100 mM, pH 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

4.1.2 Reduktion von Cyclohexanon

In gleicher Weise wurde für die Rückreaktion verfahren und die experimentellen Daten entsprechend an Gleichung (4-3) angepasst (Abb. 4-3).

$$v_{ADH}^{red} = a_{max}^{red} \cdot \frac{[CHN]}{K_M^{CHN} + [CHN]} \cdot \frac{[NADPH]}{K_M^{NADPH} + [NADPH]} \quad (4-3)$$

Für die Reduktion von CHN wurden schließlich K_M -Werte von $3,6 \pm 0,4$ mM für CHN und 92 ± 11 μ M für NADPH sowie ein Wert von 1781 ± 54 U ml⁻¹ für a_{max}^{red} bestimmt.

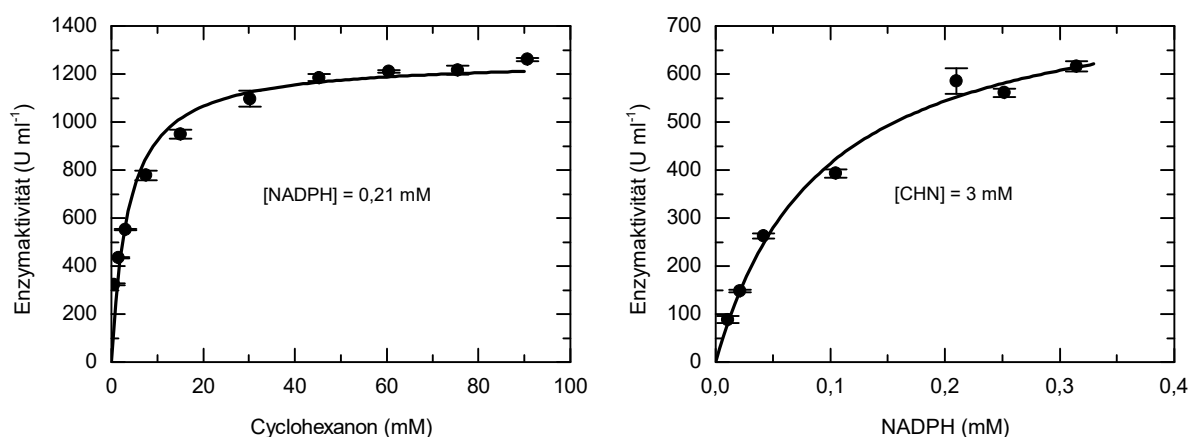


Abb. 4-3 Michaelis-Menten-Kinetik der ADH für den Umsatz von CHN und NADPH bei 25 °C in NaPP (100 mM, pH 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

Beim Vergleich der beiden ermittelten a_{max} -Werte für die Oxidation und die Reduktion fällt auf, dass sich diese stark unterscheiden und die Enzymaktivität bei der Reduktion viel höher ist als bei der Oxidation. Die kinetischen Untersuchungen für Hin- und Rückreaktion wurden unmittelbar nacheinander mit derselben Stammlösung eines Rohextraktes durchgeführt, wodurch eine konstante Konzentration an aktivem Enzym anzunehmen war. Die jeweiligen Werte für a_{max} konnten daher ins Verhältnis gesetzt werden, um einen Relationsfaktor F_{vmax} für die maximalen Enzymaktivitäten zu erhalten (Gleichung (4-4)). Für F_{vmax} konnte damit ein Wert von 7,07 ermittelt werden.

$$\frac{a_{max}^{red}}{a_{max}^{ox}} = F_{vmax} \quad (4-4)$$

4.1.3 Feinabstimmung der Kinetik und Gleichgewichtskonstante

Die Aktivität einer flüssigen Enzymlösung ist abhängig von der Stabilität des Enzyms. Während der Lagerung der Rohextrakte wurde bei der Wiederverwendung mit der Zeit eine Abnahme der Aktivität beobachtet, wodurch die zuvor bestimmten a_{max} -Werte korrigiert werden mussten. Dazu ist vor jedem Einsatz des Enzyms eine Referenzaktivität a_{ref} bestimmt worden. Für die Bestimmung der Referenzaktivität wurden folgende Reaktionsbedingungen festgelegt:

0,6 mM NADP⁺, 0,01 % (v/v) (95 mM) CHL, 50 μ l verdünnter Rohextrakt in 1 ml NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C

Diese Referenzaktivität ist bereits bei der kinetischen Untersuchung bestimmt worden und konnte daher direkt mit der ermittelten maximalen Enzymaktivität für die Oxidation, wie in Gleichung (4-5), ins Verhältnis gesetzt werden. Es wurde eine Referenzaktivität von $18,44 \text{ U ml}^{-1}$ gemessen, womit ein Korrelationsfaktor F_{ref} von 13,66 ermittelt werden konnte. Die Referenzaktivität wurde weiterhin als Grundlage zur Angabe der eingesetzten Enzymaktivität für weitere Versuche und Reaktionen herangezogen.

$$\frac{a_{max}}{a_{ref}} = F_{ref} \quad (4-5)$$

Hin- und Rückreaktion bestimmen das chemische Gleichgewicht einer Reaktion. Da die Kinetik beider Reaktionswege getrennt voneinander bestimmt wurden, sollten die experimentell ermittelten Parameter mittels einer Simulation mit einigen experimentellen Umsätzen von CHL zu CHN verglichen und ggf. angepasst werden. Dazu wurden drei Versuche mit unterschiedlichen Startkonzentrationen von CHL und NADP^+ experimentell im 1 ml-Maßstab durchgeführt und mit der Simulation verglichen. Die Reaktionsverläufe in Abb. 4-4 zeigen die Bildung von NADPH, das photometrisch während der Reaktion verfolgt werden konnte. Mit den bereits bestimmten kinetischen Parametern wurde eine initiale Simulation der Versuche durchgeführt. Im Vergleich der experimentellen Daten mit der initialen Simulation ist zu erkennen, dass Abweichungen im Anstieg des Verlaufs und bei der Gleichgewichtskonzentration am Ende der Reaktion vorliegen. Der geringere Anstieg bei der initialen Simulation ist damit zu begründen, dass die in der Simulation angegebene Enzymaktivität a_{max}^{ox} zu niedrig war. Die Gleichgewichtskonzentration wird durch das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten von Hin- und Rückreaktion F_{vmax} bestimmt. Daher wurden die Werte a_{max}^{ox} und F_{vmax} für die Simulationen manuell so angepasst, dass die experimentellen Daten mit der Simulation übereinstimmten (in Abb. 4-4 als Fit bezeichnet). Die Startkonzentrationen und die angepassten Werte für a_{max}^{ox} und F_{vmax} sind in Tab. 4-1 zusammengefasst. Aus den angepassten Werten wurde dann der Mittelwert gebildet, sodass sich a_{max}^{ox} von ursprünglich $0,497 \text{ U ml}^{-1}$ auf $0,687 \text{ U ml}^{-1}$ und F_{vmax} von 7,07 auf 8,16 erhöhte. Die angepassten Werte wurden schließlich in einer finalen Simulation angewendet und mit den experimentellen Daten verglichen. Insgesamt sind die experimentellen Daten durch die Simulationen mit den angepassten Werten besser wiedergegeben worden im Vergleich zur initialen Simulation. Dies wird vor allem durch die Steigung zu Beginn der Reaktion verdeutlicht. Die Gleichgewichtskonzentration weicht hingegen bei den Verläufen B und C etwas ab, dennoch wurden die angepassten Werte für weitere Simulationen verwendet. Durch die Anpassung von a_{max}^{ox} änderte sich ebenfalls das Verhältnis zur Referenzaktivität a_{ref} , wodurch F_{ref} von 13,66 auf 18,85 korrigiert wurde.

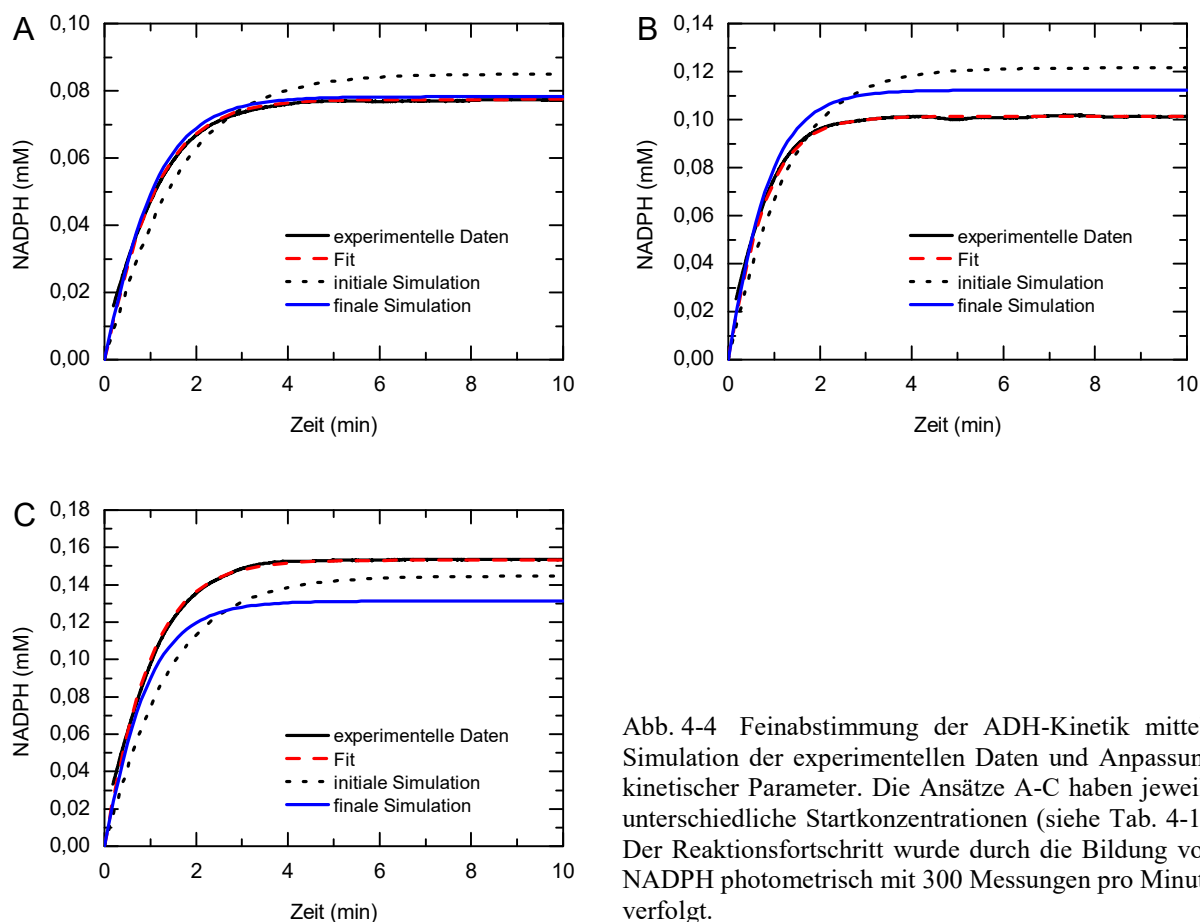


Abb. 4-4 Feinabstimmung der ADH-Kinetik mittels Simulation der experimentellen Daten und Anpassung kinetischer Parameter. Die Ansätze A-C haben jeweils unterschiedliche Startkonzentrationen (siehe Tab. 4-1). Der Reaktionsfortschritt wurde durch die Bildung von NADPH photometrisch mit 300 Messungen pro Minute verfolgt.

Tab. 4-1 Übersicht der Start- und Gleichgewichtskonzentrationen zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante und Anpassung der Werte für a_{max}^{ox} ($0,497 \text{ U ml}^{-1}$) und F_{vmax} ($7,07$).

Ansatz		NADP ⁺	CHL	NADPH	CHN	K_{eq}	a_{max}^{ox} (U ml^{-1})	F_{vmax}
A	c_0 (mM)	0,22	1,28	-	-			
	c_{eq} (mM)	0,14	1,20	0,08	0,08	0,04	0,65	8,31
B	c_0 (mM)	0,22	2,56	-	-			
	c_{eq} (mM)	0,12	2,46	0,10	0,10	0,03	0,67	9,70
C	c_0 (mM)	0,45	2,56	-	-			
	c_{eq} (mM)	0,30	2,41	0,15	0,15	0,03	0,74	6,46

c_0 : Startkonzentration; c_{eq} : Gleichgewichtskonzentration

Mit den bekannten Gleichgewichtskonzentrationen von NADPH aus den experimentellen Verläufen A–C (Abb. 4-4) und den bekannten Startkonzentrationen konnten die Gleichgewichtskonzentrationen der übrigen Reaktanten ermittelt werden (Tab. 4-1). Dadurch ließ sich nach Gleichung (4-6) eine Gleichgewichtskonstante K_{eq} von 0,03 bestimmen.

$$K_{eq} = \frac{[NADPH]_{eq} \cdot [CHN]_{eq}}{[NADP^+]_{eq} \cdot [CHL]_{eq}} \quad (4-6)$$

Wie sich bereits in den kinetischen Untersuchungen der ADH durch die unterschiedlichen Aktivitäten der Oxidation und der Reduktion eine unvollständige Reaktion von CHL zu CHN andeutete, wurde dies nun auch durch die Gleichgewichtskonstante verdeutlicht. Anhand dieser Konstante kann die Lage des Gleichgewichtes einer Reaktion beurteilt werden, wonach sich das Gleichgewicht unter den gegebenen Reaktionsbedingungen auf der Seite der Edukte befand.

Da diese Reaktion den ersten Schritt einer Reaktionskaskade darstellt und CHN sowie NADPH als Intermediate direkt durch einen folgenden Reaktionsschritt weiter umgesetzt werden, kommt es zu einer Verschiebung der Gleichgewichtslage in Richtung der Produkte. Dadurch sollte ein vollständiger Umsatz von CHL ermöglicht werden.

4.2 Kinetik der Cyclohexanon-Monooxygenase

Der zweite Reaktionsschritt der Reaktionssequenz wurde durch die CHMO katalysiert. Dabei ist das im ersten Schritt gebildete CHN zu ECL umgesetzt worden. Für diese enzymatische Umsetzung sind NADPH als Cofaktor und molekularer Sauerstoff als weitere Substrate erforderlich (Abb. 4-5). Im Gegensatz zum ersten Oxidationsschritt der ADH ist diese Reaktion nicht reversibel und läuft vollständig ab. Mit der Migration des Sauerstoffs und der Bildung des Lactons ist diese Reaktion nicht mehr umkehrbar, da sich einerseits durch die chemische Umlagerung ein energetisch günstigerer Zustand im Vergleich zum Criegee-Intermediat einstellt. Andererseits ist aus thermodynamischer Sicht die Bildung von O₂ aus dem Criegee-Intermediat heraus nicht möglich.

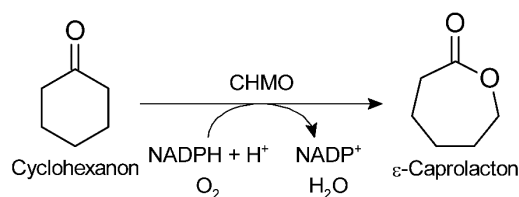


Abb. 4-5 Baeyer-Villiger-Oxidation von CHN zu ECL unter dem Verbrauch von NADP⁺ und Sauerstoff mit der CHMO als Katalysator.

4.2.1 Oxidation von Cyclohexanon

Zunächst wurde die Kinetik bzgl. CHN und NADPH untersucht. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Sauerstoffkonzentration ist an dieser Stelle vernachlässigt worden. Für die CHMO konnte demnach eine Michaelis-Menten-Gleichung für zwei Substrate gebildet werden. In Abb. 4-6 sind die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der CHMO in Abhängigkeit von der Substrat- und Cofaktorkonzentration dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass die Enzymaktivität bereits bei Werten ab ca. 1 mM mit steigender CHN-Konzentration abnimmt. Dieses Verhalten wird als Substratüberschuss-Inhibierung bezeichnet und als unkompetitiver Inhibierungstyp angenommen. Die

höchste Aktivität wurde zwischen 0,01 und 1 mM gemessen. In diesem Bereich und bei niedrigeren Konzentrationen schwankten die Werte stärker im Vergleich zu Werten höherer Konzentrationen. Das lag daran, dass bei so niedrigen Substratkonzentrationen eine entsprechend niedrige Enzymaktivität eingesetzt werden musste, um überhaupt Aktivität messen zu können. Andererseits wäre bei einer zu hohen Enzymaktivität die Reaktion bereits abgelaufen, bevor die Messung hätte gestartet werden können. Für NADPH wurde in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine Inhibierung festgestellt.

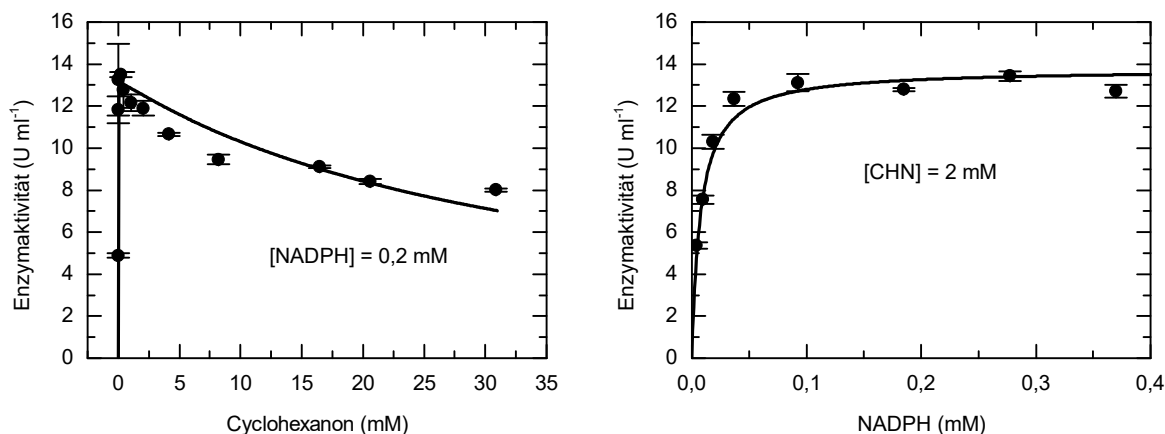


Abb. 4-6 Michaelis-Menten-Kinetik der CHMO für den Umsatz von CHN und NADPH bei 25 °C in NaPP (100 mM, pH 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

Die Michaelis-Menten-Gleichung für die CHMO wurde unter Berücksichtigung der Substratüberschuss-Inhibierung durch CHN, ausgedrückt als unkompetitive Inhibierung durch Gleichung (1-5), und der einfachen Kinetik für NADPH in Gleichung (4-7) zusammengefasst. Durch die Anpassung der Kinetik an die Verläufe in Abb. 4-6 konnten für CHN ein K_M -Wert von $3 \pm 1 \mu\text{M}$ und für NADPH ein K_M -Wert von $6 \pm 1 \mu\text{M}$ sowie eine Inhibierungskonstante K_I für CHN von $34,8 \pm 7,9 \text{ mM}$ ermittelt werden.

$$v_{CHMO} = a_{max}^{CHMO} \cdot \frac{[CHN]}{K_M^{CHN} + [CHN] \cdot \left(1 + \frac{[CHN]}{K_I^{CHN}}\right)} \cdot \frac{[NADPH]}{K_M^{NADPH} + [NADPH]} \quad (4-7)$$

4.2.2 Inhibierungen der CHMO innerhalb der Reaktionssequenz

Durch die in Abb. 4-7 dargestellte Kombination der Reaktionsschritte von ADH und CHMO waren nicht nur die einzelnen Reaktionen separat zu betrachten, sondern es galt ebenso zu prüfen wie stark sich die Inhibierungen von CHL und ECL, die bereits in anderen Studien beobachtet wurden (Mallin *et al.* 2013; Staudt *et al.* 2013), auf die CHMO-Aktivität auswirken.

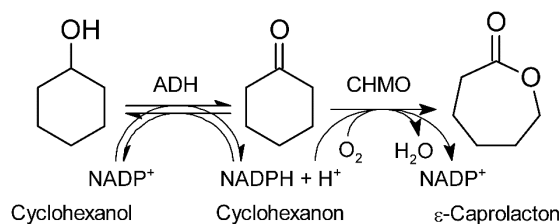


Abb. 4-7 Lineare und enzymatisch katalysierte Reaktionskaskade.

Der Einfluss von CHL und ECL auf die CHMO-Aktivität ist in Abb. 4-8 dargestellt und zeigt, dass mit steigender Konzentration der beiden Verbindungen die Enzymaktivität der CHMO abnimmt.

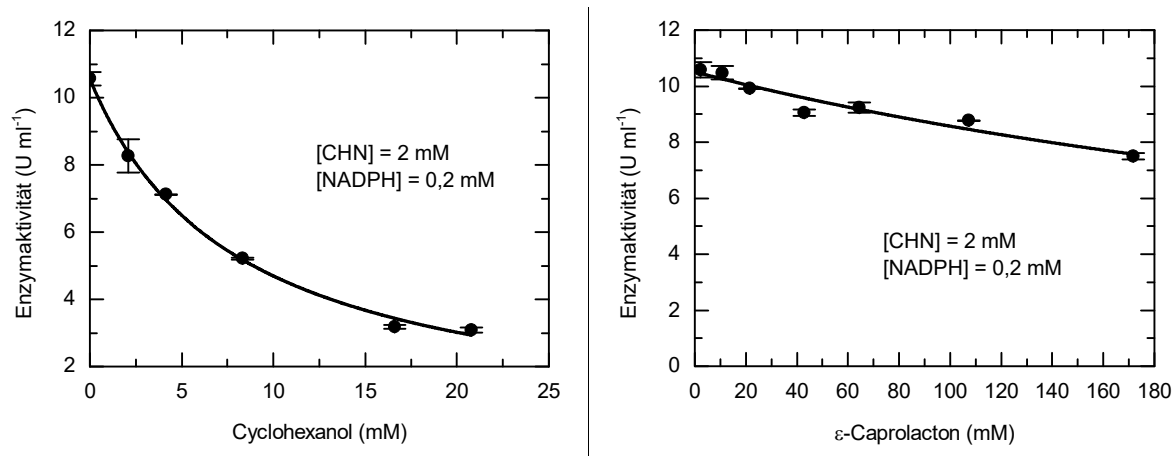


Abb. 4-8 Inhibierung der CHMO-Aktivität durch CHL und ECL. Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Reaktionsbedingungen: 2 mM CHN, 0,2 mM NADPH, NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.

Dabei wirkte sich die Inhibierung durch CHL stärker aus im Vergleich zu ECL. Um die Inhibierungen quantifizieren zu können, sollten für CHL und ECL Inhibierungskonstanten bestimmt werden. Diese werden i. d. R. aus mehreren Versuchsreihen ermittelt, bei denen die Kinetik eines Enzyms für das Substrat bei einer konstanten Inhibitorkonzentration zu untersuchen sind. Das ist anschließend für verschiedene Inhibitorkonzentrationen zu wiederholen. Des Weiteren gibt die aus den Versuchsreihen erhaltene Schar an Messwerten Aufschluss über den Inhibierungstyp. Dafür ist allerdings entscheidend, dass die Messungen innerhalb des K_M -Bereichs durchgeführt werden können und keine Inhibierung seitens des Substrates besteht. Da für die CHMO sowohl eine Substratüberschuss-Inhibierung vorlag als auch kaum Messwerte im K_M -Bereich ermittelt werden konnten, war solch eine Inhibierungsstudie nicht durchzuführen. Daher wurden für CHL und ECL jeweils eine kompetitive und eine unkompetitive Inhibierung angenommen, welche durch die Gleichungen (4-8) und (4-9) als Erweiterung von Gleichung (4-7) ausgedrückt sind.

- CHMO-Kinetik zur kompetitiven Inhibierung durch CHL und ECL:

$$v_{CHMO} = a_{max}^{CHMO} \cdot \frac{[CHN]}{K_M^{CHN} \cdot \left(1 + \frac{[CHL]}{K_I^{CHL}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[ECL]}{K_I^{ECL}}\right) + [CHN] \cdot \left(1 + \frac{[CHN]}{K_I^{CHN}}\right)} \cdot \frac{[NADPH]}{K_M^{NADPH} + [NADPH]} \quad (4-8)$$

- CHMO-Kinetik zur unkompetitiven Inhibierung durch CHL und ECL:

$$v_{CHMO} = a_{max}^{CHMO} \cdot \frac{[CHN]}{K_M^{CHN} + [CHN] \cdot \left(1 + \frac{[CHN]}{K_I^{CHN}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[CHL]}{K_I^{CHL}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[ECL]}{K_I^{ECL}}\right)} \cdot \frac{[NADPH]}{K_M^{NADPH} + [NADPH]} \quad (4-9)$$

Beide Gleichungen wurden mit den bekannten Parametern an die experimentellen Verläufe in Abb. 4-8 angepasst, wodurch für CHL und ECL jeweils zwei verschiedene Inhibierungskonstanten ermittelt werden konnten. Demnach sind für die kompetitive Inhibierung K_I -Werte von $12 \pm 1 \mu\text{M}$ und $0,68 \pm 0,08 \text{ mM}$ für CHL bzw. ECL bestimmt worden. Für die unkompetitive Inhibierung wurden entsprechende K_I -Werte von $8 \pm 0,4$ und $442 \pm 49 \text{ mM}$ für CHL bzw. ECL ermittelt. Die Inhibierung durch CHL war damit im Vergleich zu ECL etwa 55-mal stärker. Welcher Typ der Inhibierung die CHMO-Kinetik eher beschreibt, sollte später im Verlauf der Prozessentwicklung festgestellt werden.

4.2.3 Sauerstoff

Sauerstoff ist neben CHN und NADPH ein weiteres Substrat, das für die enzymatische BVO essentiell ist. Auch hierfür existiert eine entsprechende Kinetik, die jedoch aus technischer Sicht nicht so einfach ermittelt werden kann, weil dazu die Reaktion mit jeder beliebigen gelösten Sauerstoffkonzentration durchzuführen wäre. Aus diesem Grund ist in der Literatur für sauerstoffabhängige Enzyme keine detaillierte Kinetik gegenüber Sauerstoff bekannt. Zwar kann für einen sauerstoffabhängigen Prozess der Sauerstoffeintrag so eingestellt werden, dass zu jeder Zeit die maximale gelöste Sauerstoffsättigung besteht, allerdings wäre dies nicht notwendig, wenn eine minimale Sauerstoffkonzentration bekannt wäre, um den Prozess ökonomischer zu gestalten. Damit dennoch eine Einschätzung vorgenommen werden konnte, sollte eine experimentelle Näherung durchgeführt werden. Dazu sind Reaktionsverläufe miteinander verglichen worden, bei denen das Reaktionsmedium einmal mit Luft und einmal mit reinem Sauerstoff begast wurde. Durch die Begasung mit Sauerstoff, statt mit Luft, wird aufgrund des erhöhten Partialdrucks von Sauerstoff nach dem Henry'schen Gesetz eine höhere Sauerstoffkonzentration in Wasser erreicht. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 4-9 dargestellt und zeigen die Reaktionsverläufe für den Umsatz von CHN zu ECL bei 0,19 und 0,4 mM NADPH in Luft- und Sauerstoff-gesättigten Medium.

Durch die Begasung mit Luft lösen sich maximal $8,26 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $0,26 \text{ mM}$ Sauerstoff in Wasser bei 1013 hPa und $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Aufgrund der Thermodynamik löst sich durch die Begasung mit reinem

Sauerstoff 4,76-mal mehr Sauerstoff in Wasser. Die Umsätze mit 0,19 mM NADPH zeigen identische Verläufe für die Begasung mit Luft und mit Sauerstoff. Das bedeutet, dass eine höhere Konzentration an Sauerstoff keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Allerdings bestand keine Gewissheit darüber, ob der Umsatz durch das verbrauchte NADPH oder den verbrauchten Sauerstoff limitiert war. Daher wurden die Versuche mit 0,4 mM NADPH wiederholt. Es ist zu erkennen, dass bis ca. 0,15 mM NADPH die Verläufe von Luft- und Sauerstoffbegasung identisch sind. Bis dahin wurden ca. 0,25 mM NADPH sowie auch Sauerstoff stöchiometrisch umgesetzt. Ein weiterer Umsatz war dann bei dem mit Luft begasten Ansatz kaum noch zu verzeichnen, wohingegen NADPH bei dem mit Sauerstoff begasten Ansatz komplett umgesetzt wurde. Es ist davon auszugehen, dass in dem mit Luft begasten Ansatz der Sauerstoff komplett verbraucht wurde und dadurch die Reaktion limitiert war. Der Umsatz von ca. 0,25 mM entsprach damit der maximalen Löslichkeit von Sauerstoff bei der Begasung mit Luft. Ein K_M -Wert für Sauerstoff ist damit unter 0,01 mM grob einzugrenzen. Das bedeutet für den Prozess, dass eine geringe Konzentration an Sauerstoff genügt, um die CHMO-Reaktion mit maximaler Enzymaktivität zu ermöglichen.

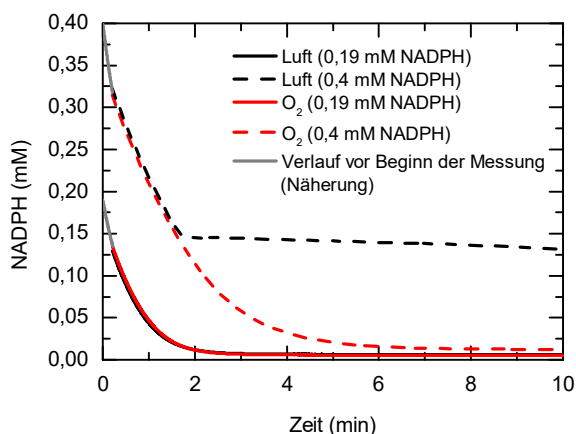


Abb. 4-9 Abhängigkeit der CHMO-Aktivität von der im Medium gelösten O_2 -Konzentration während der Oxidation von CHN zu ECL mit Luft gesättigtem und O_2 angereichertem Medium. Reaktionsbedingungen: 0,01 % (v/v) (97 mM) CHN, NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.

4.3 Zusammenfassung

Durch die kinetischen Untersuchungen für ADH und CHMO konnten die einzelnen Reaktionsschritte charakterisiert werden. Dabei ist für beide Enzyme eine Michaelis-Menten-Gleichung für zwei Substrate angenommen und die kinetischen Konstanten a_{max} und K_M bestimmt worden.

- Für die ADH wurde die Oxidation von CHL sowie die Reduktion von CHN als Rückreaktion untersucht. Dadurch konnten die folgenden kinetischen Konstanten bestimmt werden:

Tab. 4-2 Konstanten zur Michaelis-Menten-Kinetik der ADH.

Konstante	Oxidation	Reduktion
a_{max} (U ml ⁻¹)	251,9 ± 3,9	2054,7 ± 54,1
K_M^{CHL} (mM)	10,1 ± 0,9	-
$K_M^{NADP^+}$ (μM)	51 ± 3	-
K_M^{CHN} (mM)	-	3,6 ± 0,4
K_M^{NADPH} (μM)	-	92 ± 11

- Bei der CHMO wurden für den Umsatz von CHN zu ECL eine Substratüberschuss-Inhibierung und eine Inhibierung durch CHL und ECL festgestellt. Da kein konkreter Inhibierungstyp identifiziert werden konnte, wurde eine kompetitive und eine unkompetitive Inhibierung durch CHL und ECL mit den folgenden kinetischen Konstanten angenommen:

Tab. 4-3 Konstanten zur Michaelis-Menten-Kinetik der CHMO.

Konstante	Wert	
a_{max} (U ml ⁻¹)	14,0 ± 0,4	
K_M^{NADPH} (μM)	6 ± 1	
K_M^{CHN} (μM)	3 ± 1	
K_I^{CHN} (mM)	kompetitiv	34,8 ± 7,9
	unkompetitiv	
K_I^{CHL} (mM)	0,012 ± 0,001	8,0 ± 0,4
K_I^{ECL} (mM)	0,68 ± 0,08	442 ± 49

- Für Sauerstoff war keine Bestimmung der Kinetik möglich. Durch eine Näherung konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Sauerstoff Konzentration durch die Begasung mit reinem Sauerstoff keine Zunahme der CHMO-Aktivität erbrachte und dass eine Sauerstoffkonzentration von ca. 0,01 mM ausreicht, um die maximale Enzymaktivität zu erreichen.

5 Begasung und Sauerstoffeintrag

5.1 Blasenbegasung

Durch das Einleiten von Luft bzw. Sauerstoff in ein Reaktionsgemisch kann der Eintrag von Sauerstoff sehr leicht gewährleistet werden. Der Stoffübergang findet dabei direkt an der Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit statt. Für einen effizienten Eintrag ist es förderlich, wenn die erzeugten Blasen möglichst klein sind. Damit vergrößert sich das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen der Blase, wodurch insgesamt eine größere Oberfläche für den Gasaustausch in das Reaktionsmedium ermöglicht wird. Gleichzeitig verbleiben kleinere Blasen durch einen geringeren Auftrieb länger im Medium. Durch einen höheren Volumenstrom des Gases kann eine bessere Durchmischung ermöglicht und eine Limitierung von Sauerstoff vermieden werden. Des Weiteren ändert sich nach dem Henry'schen Gesetz die Konzentration eines Gases in Lösung proportional zum Partialdruck, so dass höhere Konzentrationen in Lösung durch die Erhöhung des Partialdrucks erreicht werden. All die Vorzüge der Blasenbegasung gehen jedoch mit einer vermehrten Schaumbildung einher. Die Schaumbildung stellt einen erheblichen Nachteil dar, da dies zu einer Deaktivierung der Enzyme an der Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit führen kann. Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde, haben BVMOs i. d. R. eine geringe oxidative Stabilität und sind labil gegenüber Scherkräften an der Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit (Mihovilovic 2012). Eine rasche Abnahme der CHMO-Aktivität sowie eine starke Schaumbildung wurden demnach beim Einleiten von Luft in einen verdünnten Rohextrakt beobachtet (Abb. 5-1). Ebenso führte die Begasung eines Reaktionsansatzes mit ADH und CHMO in der Blasensäule zu einer starken Schaumbildung, wodurch der Schaum aus der Blasensäule austrat. Einerseits kann die Schaumbildung zu einer Deaktivierung der Enzyme führen, andererseits neigen Proteine zu einer Akkumulation im Schaum, wodurch diese ausgetragen werden (Lockwood *et al.* 1997). Eine Blasenbegasung war daher nicht zielführend und wurde nicht weiterverfolgt.

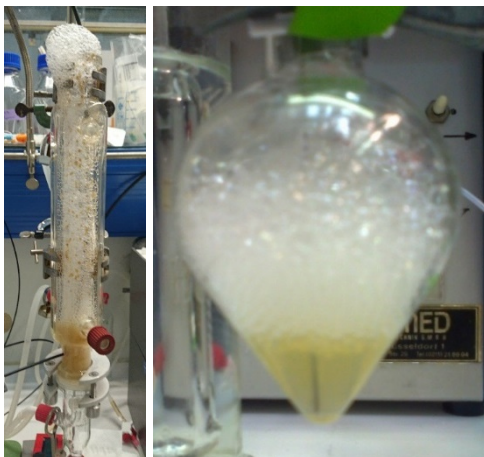


Abb. 5-1 Reaktionsansatz mit Rohextrakten von ADH und CHMO in der Blasensäule (links). Einleiten von Luft in einen verdünnten CHMO-Rohextrakt (rechts).

5.2 *In situ* Begasung

Der Blasenbegasung steht die blasenfreie Begasung gegenüber und damit die Möglichkeit der *in situ* Begasung. Das bedeutet, dass der benötigte Sauerstoff zunächst gebildet und anschließend wieder verbraucht wird. Ermöglicht wird dies durch die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff durch das Enzym Katalase (Abb. 5-2).

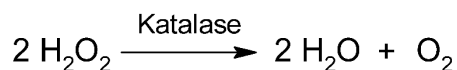


Abb. 5-2 Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff mittels Katalase.

Die Katalase ist dann innerhalb der Synthese von ECL gemeinsam mit der ADH und der CHMO einzusetzen mit der Dosierung von Wasserstoffperoxid. Anhand der Konzentration der Wasserstoffperoxid-Lösung und der zugeführten Menge ist dann der Sauerstoffbedarf entsprechend der CHMO-Aktivität anzupassen. Durch die Dosierung darf es jedoch zu keiner Akkumulation von Wasserstoffperoxid kommen, weil dadurch die übrigen Enzyme deaktiviert werden könnten. Bevor die *in situ* Begasung zum Einsatz kommen sollte, wurden die Aktivitäten von ADH und CHMO in Abhängigkeit der Konzentration von Wasserstoffperoxid und Katalase überprüft. Dazu wurden die Aktivitäten jeweils in Gegenwart von 0,01 % (v/v) (ca. 11 mM) Wasserstoffperoxid und ohne Katalase untersucht. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen in Tab. 5-1 zeigen, dass sich die Aktivitäten von ADH und CHMO in 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxid nicht änderten. Mit dem Einsatz der Katalase ($0,25 \text{ g l}^{-1}$) sind hingegen unterschiedliche Änderungen der Aktivitäten beobachtet worden. Für die CHMO konnte eine Restaktivität von 80 % ermittelt werden, wohingegen für die ADH eine Steigerung der Aktivität auf 116 % festgestellt wurde.

Tab. 5-1 Beeinflussung der Enzymaktivitäten von ADH und CHMO in 0,01 % (v/v) (11 mM) H_2O_2 und mit Katalase ($0,25 \text{ g l}^{-1}$). Reaktionsbedingungen: 0,01 % (v/v) (97 mM) CHN bzw. 0,01 % (v/v) (96 mM) CHL, 0,2 mM NADPH bzw. NADP^+ , 50 μl verdünnter Rohextrakt von CHMO bzw. ADH in 1 ml NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.

	ADH-Aktivität	CHMO-Aktivität
mit 0,01 % (v/v) H_2O_2	$102 \pm 2 \%$	$98 \pm 2 \%$
mit Katalase	$110 \pm 2 \%$	$95 \pm 2 \%$
mit 0,01 % (v/v) H_2O_2 und Katalase	$116 \pm 1 \%$	$80 \pm 1 \%$

Die Ursache für die unterschiedliche Beeinflussung der Aktivitäten könnte der Änderung der NADPH-Konzentration geschuldet sein, die durch die Katalase hervorgerufen wurde. Das liegt daran, dass die Katalase NAD(P)^+ und bevorzugt NAD(P)H bindet, obwohl es nicht am Reaktionsmechanismus der Katalase beteiligt ist (Calderon *et al.* 2006; Fita und Rossmann 1985; Gouet *et al.* 1995; Kirkman und Gaetani 1984; Putnam *et al.* 2000). Die niedrigere CHMO-Aktivität resultiert demnach daher, dass durch die Verringerung der NADPH-Konzentration im K_M -Bereich, entsprechend der Kinetik, die Aktivität sinkt. Eine Steigerung der ADH-Aktivität lässt sich damit

erklären, dass während der Aktivitätsmessung einer reversiblen Reaktion immer Hin- und Rückreaktion stattfinden. Die zu Beginn schnellere Hinreaktion wird dadurch systematisch unterschätzt und die Aktivität wäre im Grunde höher, wenn eine gleichzeitig ablaufende Rückreaktion unterbunden werden könnte. Womöglich ist dies durch die Katalase realisiert worden sein, die mit der Bindung von NADPH die Rückreaktion verminderte, wodurch eine schnellere Hinreaktion gemessen werden konnte.

Aufgrund dieser Beobachtungen und dem womöglich daraus resultierenden höheren Verbrauch des hochpreisigen Cofaktors wurde eine katalasevermittelte *in situ* Begasung nicht weiter angewendet. Des Weiteren führt die Zuleitung einer verdünnten H₂O₂-Lösung auch immer zu einer Verdünnung des Reaktionsansatzes und der Enzymkonzentration.

5.3 Membranbegasung

5.3.1 Anfertigung eines Membranmoduls

Eine blasenfreie Begasung kann auch über einen Membrankontaktor erfolgen, in dem eine poröse Membran in Form von Hohlfasern den Stoffaustausch zwischen einem Gas und einer Flüssigkeit oder zwischen zwei Flüssigkeiten ermöglicht ohne beide Phasen miteinander zu vermischen bis hin zu einem Durchbruch der Phase mit dem höheren Druck bei zu hoher Druckdifferenz (Gabelman und Hwang 1999). Bei der Verwendung poröser Materialien besteht jedoch die Gefahr der Verblockung durch kleinere Partikel. Mit dem Einsatz bakterieller Rohextrakte und einer relativ hohen Proteinkonzentration, da die eingesetzten Enzyme nicht gereinigt vorliegen, können Proteine im Verlauf der Reaktion ausfallen und dadurch die Poren blockieren. Weiterhin werden die Versuche nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt, so dass auch ein Mikrobenwachstum nicht ausgeschlossen werden kann. Dies erschwert zusätzlich die Reinigung solcher Membrankontaktoren und führt zu einer geringeren Standzeit des Reaktors.

Alternativ zu den Hohlfasern aus porösen Membranen werden Silikonschläuche als dichte Membranen verwendet und eignen sich besonders für die Begasung von Biofilmen oder bei der Fermentation empfindlicher Zellen (Casey *et al.* 1999; Frahm *et al.* 2007; Hirasa *et al.* 1991; Moenne *et al.* 2013). Auch bei dem Einsatz von BVMOs konnte eine solche Membranbegasung zur Sauerstoffversorgung in der Biokatalyse erfolgreich eingesetzt werden (Bučko *et al.* 2011; Rissom *et al.* 1997). Daher sollte für die folgenden Versuche die Begasung über einen Silikonschlauch stattfinden, durch den der Reaktionsansatz in einem Begasungskreislauf mittels einer Pumpe gefördert wird. Hierzu wurde ein Silikonschlauch mit der Bezeichnung RCT-SIT-60 (2 mm Innendurchmesser, 0,5 mm Wanddicke) von der Firma Reichelt Chemie Technik GmbH + Co (Heidelberg, Deutschland), ausgewiesen mit der höchsten Gasdurchlässigkeit, verwendet. Von diesem Schlauch wurden 5 m, wie in Abb. 5-3 gezeigt, in eine 500 ml Laborglasflasche eingebracht und diese mit einem Deckel verschlossen, wobei entsprechende Anschlüsse für Ein- und Ausgang des Reaktionsvolumens im Deckel mit den Schlauchenden verbunden wurden. Zusätzlich waren an der Flasche Anschlussmöglichkeiten für eine Begasung angebracht. Dadurch wurde die Flasche mit Luft oder reinem Sauerstoff durchströmt, wobei der Druck in der Flasche erhöht werden konnte, um einen höheren Stoffeintrag durch den Schlauch in das Reaktionsmedium zu erreichen.

Entsprechende Laborglasflaschen haben eine vom Hersteller (z. B. DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland) garantierte Vakuum- bzw. Druckfestigkeit von -1 und 1,5 bar.

Für einen effektiven Stoffeintrag sollte der Schlauch möglichst dünnwandig sein, um den Diffusionswiderstand zu verringern. Des Weiteren erweist sich ein geringer Innendurchmesser des Schlauches als vorteilhaft, um über die Länge des Schlauches eine große Oberfläche im Verhältnis zum inneren Schlauchvolumen zu erzielen. Technisch sind diesen Voraussetzungen jedoch Grenzen gesetzt, da bei einem zu geringen Innendurchmesser der Schlauch leichter durch Partikel, wie ausgefallene Proteine, verstopfen kann. Bei einer zu geringen Wanddicke des Schlauches wird dieser instabil und kann leichter knicken oder bei höherem Druckverlust sogar platzen. Somit musste mit dem eingesetzten Material ein Kompromiss eingegangen werden, der eine einfache Montage im Labormaßstab ermöglichte.

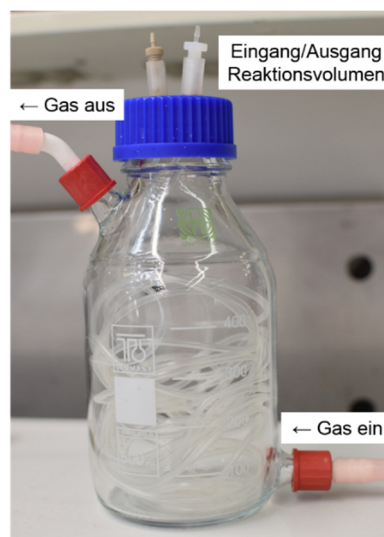


Abb. 5-3 Einheit zur Membranbegasung über einen Silikonschlauch.

5.3.2 Abschätzung des Sauerstoffeintrags

Um den Sauerstoffeintrag der Begasungseinheit abzuschätzen, wurde für ein kleineres Begasungssystem der k_{La} -Wert experimentell bestimmt, welcher dann proportional für andere Systeme skaliert werden kann. Für die Bestimmung des Stoffübergangs eines Gases in eine Flüssigkeit ist der k_{La} -Wert aus dem Stoffübergangskoeffizienten k_L und der auf das Volumen bezogenen Phasengrenzfläche a zusammensetzt. Für die experimentelle Bestimmung wurden 30 ml Wasser in ein Glasgefäß gegeben und verschlossen. Mittels einer Pumpe ist das Wasser durch einen 50 cm langen Schlauchabschnitt im Kreis gefördert worden, von dem ca. 48 cm von innen mit Wasser benetzt waren. Das Volumen im Vorratsbehälter wurde mit einem Magnetrührer durchmischt sowie die darin gelöste Sauerstoffkonzentration mittels einer Sauerstoffsonde gemessen. Durch das Einleiten von Stickstoff wurde der Sauerstoff aus dem zirkulierenden Volumen verdrängt. Nachdem die Sauerstoffsättigung unter 10 % lag, wurde die Begasung mit Stickstoff unterbrochen, so dass eine Anreicherung des Volumens mit Sauerstoff aus der Luft über die Membranoberfläche erfolgte. Die Zunahme der gelösten Sauerstoffkonzentration wurde im Vorratsgefäß gemessen. Dabei ist die Änderung der Sauerstoffkonzentration über die Zeit durch Gleichung (5-1) beschrieben.

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (5-1)$$

Nach der Durchführung der Integration ergibt sich Gleichung (5-2).

$$\ln\left(\frac{c_{O_2}^*}{c_{O_2}^* - c_{O_2}}\right) = k_L a \cdot t \quad (5-2)$$

Mit der entsprechenden Auftragung der Messwerte konnte der $k_L a$ -Wert schließlich aus der Steigung der Linearfunktion ermittelt werden (Abb. 5-4). Die Anreicherung des Gesamtvolumens mit Sauerstoff ist abhängig von der Flussrate, mit der das Volumen durch den gasdurchlässigen Schlauch gefördert wird. Um den maximalen $k_L a$ -Wert für das Modellsystem zu ermitteln, wurden $k_L a$ -Werte für verschiedene Flussraten bestimmt (Abb. 5-5). Dabei nähert sich der $k_L a$ -Wert mit steigender Flussrate einem Maximum, bei dem der Stofftransport über die gesamte innere Membranoberfläche ermittelt werden kann. Eine weitere Steigerung der Flussrate hat dann keinen höheren $k_L a$ -Wert zur Folge. Demnach wurde durch die Anpassung einer Exponentialfunktion an die experimentellen $k_L a$ -Werte ein Maximum von $0,046 \text{ min}^{-1}$ für den Silikonschlauch in dem Modellsystem bestimmt.

Da der Vorlagebehälter nicht komplett verschlossen wurde und durch eine kleine Kanüle, durch die der eingeleitete Stickstoff entweichen konnte, ein geringer Gasaustausch mit der Atmosphäre über die Wasseroberfläche möglich war, wurde auch bei einer Flussrate von 0 ml min^{-1} ein $k_L a$ -Wert von $0,004 \text{ min}^{-1}$ bestimmt.

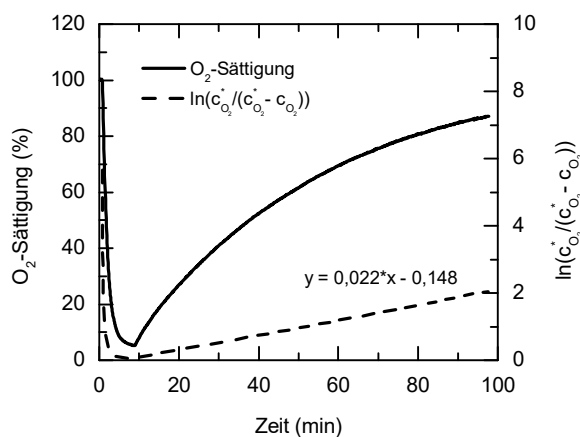


Abb. 5-4 Bestimmung des $k_L a$ -Werts für die Begasung von 30 ml Wasser mit einem Silikonschlauch (48 cm) bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Das Volumen wurde über eine zwei-kanalige Schlauchpumpe mit einem Volumenstrom von 2 ml min^{-1} durch den Silikonschlauch gefördert.

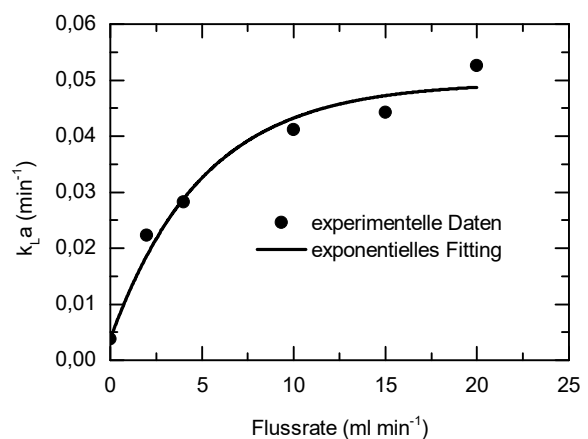


Abb. 5-5 Abhängigkeit des Sauerstoffeintrags von der Flussrate der Pumpe.

Bei der Blasenbegasung ist es aufgrund der Unkenntnis über die genaue Größe der Phasengrenzfläche üblich, lediglich den $k_L a$ -Wert anzugeben. Bei der Membranbegasung hingegen ist die innere Membranoberfläche (A_{SM}) oftmals bekannt, so dass hier eine separate Betrachtung erfolgen

und die spezifische Phasengrenzfläche als $a = A_{SM} \cdot V^{-1}$ definiert werden kann. Es ist jedoch anzumerken, dass der k_L -Wert eine stoffspezifische Konstante aus der Annahme der *Zweifilmtheorie* ist (Whitman 1962). Diese dient als Modell für den Stofftransport an der Grenzschicht zwischen zwei Phasen. Für weiterführende Erklärungen wird auf die Fachliteratur verwiesen (Chmiel 2011; Doran 2013). Bei der Membranbegasung über einen Silikonschlauch verläuft der Stofftransport zusätzlich durch die Membran (0,5 mm). Insofern ist die Voraussetzung für die *Zweifilmtheorie* nicht erfüllt. Für eine detaillierte Studie müsste der Stofftransport in allen Phasen sowie der Stoffübergang separat untersucht werden. Dies wären ausgehend von der Gasphase der Übergang in die Silikonmembran, die Diffusion durch die Membran und der Übergang von der Membran in das Reaktionsmedium. Eine Untersuchung der einzelnen Transportvorgänge ist jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit. Der aus den experimentell ermittelten $k_L a$ -Werten resultierende k_L -Wert ist daher vereinfacht als Summenparameter zu betrachten und wird fortan als $k_{L,app}$ bezeichnet.

Aus dem ermittelten $k_L a$ -Wert von $0,046 \text{ min}^{-1}$ konnte damit unter Berücksichtigung der inneren Membranoberfläche und dem Gesamtvolumen ein $k_{L,app}$ von $0,046 \text{ cm min}^{-1}$ berechnet werden (Tab. 5-2). Dadurch war für die nachfolgenden Reaktionen der Sauerstoffeintrag bzw. die Sauerstofftransferrate (OTR, engl.: *oxygen transfer rate*) für andere Schlauchlängen abzuschätzen. Die OTR ist nach Gleichung (5-1) am größten, wenn die gelöste Sauerstoffkonzentration gegen null geht. Die OTR limitiert die max. Sauerstoffaufnahme (OUR, engl.: *oxygen uptake rate*), welche folglich der eingesetzten Enzymaktivität der CHMO entspricht. Eine Abschätzung der max. OTR und die Skalierung der experimentell ermittelten Daten auf die Begasungseinheit ist in Tab. 5-2 aufgestellt. Für die Annahme, dass ein Reaktionsvolumen von 60 ml mit einem 5 m langen Silikonschlauch begast werden soll und die maximale Löslichkeit von Sauerstoff $0,26 \text{ mM}$ beträgt, wäre bei einer Begasung mit Luft lediglich eine OTR von maximal $0,063 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ bzw. $3,76 \mu\text{mol min}^{-1}$ zu erwarten. Vorausgesetzt, das Reaktionsvolumen wird mit der entsprechenden Flussrate durch die Begasungseinheit gefördert. Um die OTR zu erhöhen, ohne die Membranoberfläche zu vergrößern, kann Sauerstoff statt Luft zur Begasung eingesetzt werden. Dadurch wird das Konzentrationsgefälle aufgrund der erhöhten Sauerstoffkonzentration vergrößert, wodurch die Triebkraft entlang des Gradienten erhöht wird. Weiterhin ist es möglich, eine Steigerung der OTR zu erzielen, wenn der Druck in der Begasungseinheit erhöht wird. Mit der Erhöhung des Drucks geht proportional eine Erhöhung der Sauerstofflöslichkeit einher, so dass mit einer Steigerung um 1 bar die OTR etwa verdoppelt werden kann.

Tab. 5-2 Skalierung der Membranbegasung vom Modellsystem zur Begasungseinheit mit einer größeren Membranoberfläche und Abschätzung der max. OTR für die Begasung mit Luft oder Sauerstoff.

	Modellsystem	Begasungseinheit
Länge Silikonschlauch	48 cm	500 cm
innere Membranoberfläche	30,16 cm ²	314,16 cm ²
Volumen	30 ml	60 ml
$k_L a^a$	0,046 min ⁻¹	0,241 min ⁻¹
max. OTR mit Luft ^b	0,36 μmol min ⁻¹	3,76 μmol min ⁻¹
max. OTR mit O ₂ ^c	1,7 μmol min ⁻¹	17,9 μmol min ⁻¹

^a $k_{L,app} = 0,046 \text{ cm min}^{-1}$, $k_L a = k_{L,app} \cdot a$

^b bei maximaler Sauerstofflöslichkeit von 0,26 mM (1013 hPa, 25 °C) und einer gelösten Sauerstoffkonzentration von null

^c bei maximaler Sauerstofflöslichkeit von 1,24 mM (1013 hPa, 25 °C) und einer gelösten Sauerstoffkonzentration von null

5.4 Zusammenfassung

Für den Eintrag von Sauerstoff in das wässrige Reaktionsmedium wurden die Blasenbegasung, die *in situ* Begasung und die Membranbegasung untersucht. Durch die Anwendung der verschiedenen Begasungsmöglichkeiten konnten Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren aufgezeigt werden:

- Eine Blasenbegasung eignet sich aufgrund der intensiven Schaumbildung und der damit verbundenen Abnahme der Enzymaktivität nicht.
- Die katalasevermittelte *in situ* Begasung durch die Spaltung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff wurde nicht weiterverfolgt, da die Katalase den Cofaktor bindet. Damit wäre ein höherer Verbrauch des hochpreisigen Cofaktors verbunden. Des Weiteren ist eine Zuleitung einer verdünnten Wasserstoffperoxid-Lösung erforderlich, wodurch eine stetige Verdünnung des Reaktionsansatzes und der Enzymaktivität erfolgt.
- Die Membranbegasung konnte erfolgreich über einen Silikonschlauch erfolgen. Im Vergleich zur Begasung mittels eines Membrankontaktors mit einer porösen Membran ist damit keine Verblockung der Poren und eine leichtere Reinigung möglich.
- Eine Umsetzung der Membranbegasung erfolgt in Form einer Begasungseinheit, die mittels einer Pumpe in den experimentellen Aufbau integriert werden soll.
- Für die Membranbegasung konnte der Stoffeintrag durch die Bestimmung von $k_L a$ -Werten quantifiziert werden. Zusätzlich wurde für den eingesetzten Silikonschlauch ein Stoffübergangskoeffizient ($k_{L,app} = 0,046 \text{ cm min}^{-1}$) als Summenparameter bestimmt, wodurch der Stoffeintrag für verschiedene Schlauchlängen abgeschätzt werden konnte.
- Eine Steigerung des Stoffeintrags wurde durch die Begasung mit Sauerstoff erzielt.

6 Prozessentwicklung*

6.1 Reaktionskaskade im Satzbetrieb

Der am einfachsten umzusetzende Reaktortyp ist der Rührkessel im Satzbetrieb. Dieser sollte zunächst als Grundlage für weitere Reaktortypen eingesetzt werden. Durch einen Begasungskreislauf wurde der Sauerstoffeintrag sichergestellt. Abb. 6-1 zeigt den Umsatz von 20 mM CHL zu ECL, welcher mittels ADH und CHMO ermöglicht wurde. Nach ca. 80 min wurde ein vollständiger Umsatz von 20 mM CHL beobachtet, wobei mit 17,6 mM ECL eine analytische Ausbeute von nur 88 % ermittelt werden konnte. Damit war die Massenbilanz nicht geschlossen. Nach weiteren 50 min blieb die ECL-Konzentration allerdings konstant, so dass eher ein Verlust an CHL zu vermuten war. Der experimentelle Aufbau zu diesem Versuch ist Abb. 6-11 und Abb. 6-12 zu entnehmen.

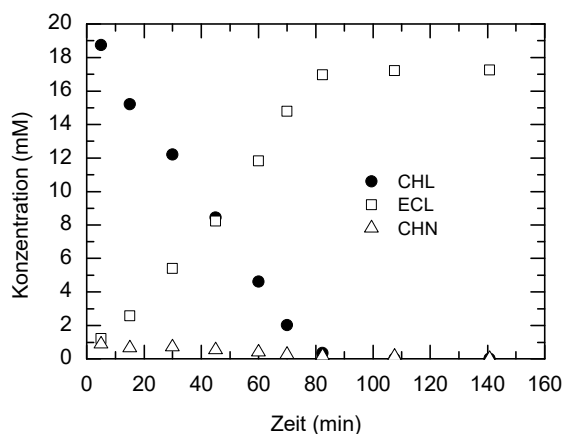


Abb. 6-1 Zweistufige Synthese von ECL im Satzbetrieb ausgehend von CHL mittels ADH und CHMO. Reaktionsbedingungen: 50 ml NaPP (100 mM, pH 8), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM NADP⁺, 0,5 U ml⁻¹ CHMO, 0,55 U ml⁻¹ ADH, pH mit NaOH (1 N) mittels Autotitration kontrolliert, 25 °C, Magnetrührer, Begasung mit O₂ unter Normaldruck, 30 ml min⁻¹ Pumprate für Begasung.

6.1.1 Berücksichtigung der Massenbilanz

Es gibt verschiedene Ursachen für die verringerte Ausbeute und den Verlust des Substrats. Einerseits kann eine verringerte Reaktionsselektivität zu Nebenreaktionen führen, andererseits besteht die Möglichkeit, dass CHL während der Reaktion verdampft ist. Letzteres war zu vermuten, da während der Reaktion keine Bildung von Nebenprodukten beobachtet wurde. Das Reaktionsgefäß ist zwar mit einem Deckel verschlossen worden, es waren aber in dem Verschluss Öffnungen für einen Rührer und Leitungen für die Pumpe vorhanden, die einen Gasaustausch mit der Umgebung zuließen. Daher wurde die Änderung der CHL-Konzentration einer wässrigen Lösung unter gleichen Prozessbedingungen, aber ohne Katalysatoren verfolgt. Der Verlauf ist in Abb. 6-2 gezeigt.

* Ergebnisse in diesem Kapitel sind anteilig veröffentlicht worden (Scherkus *et al.* 2016, 2017).

Nach 156 min war im Vergleich zur Konzentration nach 5 min ein Verlust von ca. 18 % zu verzeichnen. Durch die Anpassung einer Kinetik erster Ordnung an die experimentellen Daten wurde für die Abnahme von CHL eine Geschwindigkeitskonstante (k_d^{CHL}) von $0,002 \text{ min}^{-1}$ bestimmt.

Eine unkatalysierte Hydrolyse von ECL zum Ende des Umsatzes im Satzbetrieb war zunächst nicht zu beobachten. Dennoch wurde auch die Stabilität von ECL in Wasser unter Prozessbedingungen untersucht. Hierzu ist eine wässrige ECL-Lösung mit NaOH titriert und der Titrationsverlauf als Folge der Hydrolyse des Lactons zu 6-Hydroxyhexansäure (6-HHA) aufgezeichnet worden (Abb. 6-3). Auch hier wurde zur Quantifizierung eine Kinetik erster Ordnung an den Verlauf angepasst, wodurch eine Geschwindigkeitskonstante (k_d^{ECL}) von $9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ für die nicht katalysierte Hydrolyse von ECL bestimmt werden konnte.

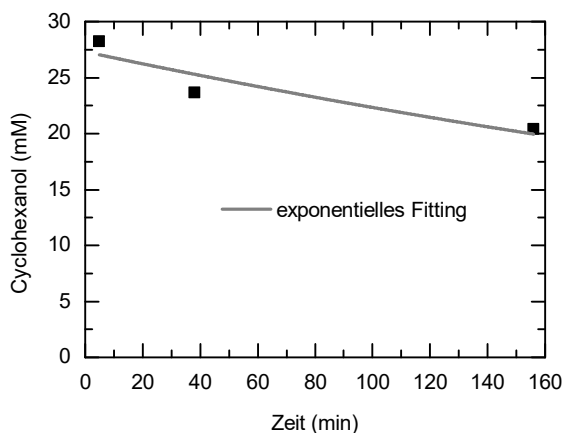


Abb. 6-2 Verlust von Cyclohexanol aus dem Reaktor. 60 ml einer gepufferten CHL-Lösung (NaPP, 100 mM, pH 8) wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 30 ml min^{-1} durch die Be-
gasungseinheit gepumpt.

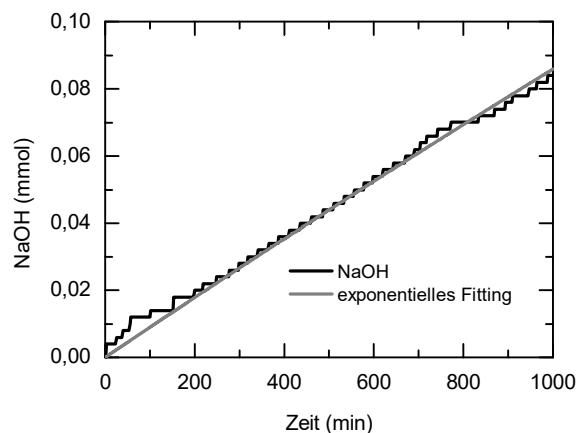


Abb. 6-3 Autohydrolyse von ECL (100 μl , 0,95 mmol, 23,6 mM) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ in 40 ml NaPP (10 mM, pH 8), Titrations-
titration mit 1 N NaOH.

6.1.2 Entwicklung eines kinetischen Modells zur Prozesssimulation

Die in Kapitel 4 ermittelten kinetischen Daten erlauben die Erstellung eines kinetischen Modells zur Beschreibung bzw. Simulation des Reaktionssystems. Das ermöglicht die Validierung experimentell bestimmter Parameter sowie eine Optimierung des Systems durch die Anpassung des Modells an verschiedene Reaktionsbedingungen. Die Simulation basiert auf der näherungsweise, numerischen Integration von Differentialgleichungen und wurde mit der Software *Matlab* (Version R2015a, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) vorgenommen. Zunächst ist ein kinetisches Modell für die Reaktionskaskade, ausgehend von CHL bis ECL und gemäß Abb. 4-7, erstellt und für die einzelnen Verbindungen die entsprechenden Differentialgleichungen (6-1) bis (6-4) aufgestellt worden. Dabei wurde die Änderung der Konzentration der jeweiligen Verbindung betrachtet und als Stoffmengenbilanz formuliert. Zusätzlich drückt Gleichung (6-5) die Bildung von 6-HHA aus. Da nicht nur Versuche im Satzbetrieb durchgeführt werden sollten, sondern auch das Zulaufverfahren anzuwenden war, wurde mit v_{feed} die Zugabe von CHL als Stoffmenge berücksichtigt. Mit der Substratzugabe und der Titration musste folglich auch die Änderung des Volumens durch Gleichung (6-6) einbezogen werden. Dabei wurde mit k_{feed} ein konstant zugeführtes

Substratvolumen als Geschwindigkeitskonstante und das zugeführte Titrationsvolumen mit der Hydrolyse von ECL in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Base (NaOH) definiert. Zur Ermittlung der Enzymaktivitäten (v_{ADH} und v_{CHMO}) sind die entsprechenden Stoffmengen der einzelnen Komponenten innerhalb der Berechnung mit dem jeweiligen Reaktionsvolumen verrechnet worden, um Konzentrationswerte für die Michaelis-Menten-Gleichung zu erhalten.

$$\frac{dn(CHL)}{dt} = v_{feed} + (v_{ADH}^{red} - v_{ADH}^{ox}) \cdot V_0 - k_d^{CHL} \cdot n(CHL) \quad (6-1)^*$$

$$\frac{dn(NADP^+)}{dt} = (v_{CHMO} + v_{ADH}^{red} - v_{ADH}^{ox}) \cdot V_0 \quad (6-2)^*$$

$$\frac{dn(CHN)}{dt} = \frac{dn(NADPH)}{dt} = (v_{ADH}^{ox} - v_{ADH}^{red} - v_{CHMO}) \cdot V_0 \quad (6-3)^*$$

$$\frac{dn(ECL)}{dt} = v_{CHMO} \cdot V_0 - k_d^{ECL} \cdot n(ECL) \quad (6-4)^*$$

$$\frac{dn(6-HHA)}{dt} = k_d^{ECL} \cdot n(ECL) \quad (6-5)^*$$

$$\frac{dV}{dt} = k_{feed} + \frac{k_d^{ECL}}{[NaOH]} \cdot n(ECL) \quad (6-6)^*$$

6.1.3 Enzymstabilität unter Prozessbedingungen

In Kapitel 3.2 sind bereits die Stabilitäten von ADH und CHMO in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht worden. Nachdem alle wichtigen Reaktionsbedingungen und die experimentelle Umsetzung festgelegt wurden, war die Untersuchung der Enzymstabilität gegenüber der mechanischen Beanspruchung durch Rühren und Pumpen im Reaktionssystem erforderlich. Dazu wurden ADH und CHMO separat in einem Reaktionsansatz ohne Substrat unter Prozessbedingungen durch das Begasungsmodul im Kreis gepumpt. Als Referenz ist ein Aliquot in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei gleicher Temperatur inkubiert worden. Abb. 6-4 zeigt die Änderungen der Enzymaktivitäten von ADH und CHMO unter Prozessbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zu den jeweiligen Referenzen. Für beide Enzyme ist eine Abnahme der Aktivität zu erkennen. Aus der Abnahme der Aktivitäten konnten vergleichbare Halbwertszeiten (HWZ , $\tau_{1/2}$) von 32 und 29 h für ADH bzw. CHMO bestimmt werden. Die HWZ der CHMO bezieht sich dabei

* $n(X)$: Stoffmenge der Komponente X (mmol); v_{CHMO} , v_{ADH} : Enzymaktivität ($\text{mmol min}^{-1} \text{ l}^{-1}$); V_0 : Startvolumen (l^{-1}); v_{feed} : Substratzufuhr (mmol min^{-1}); k_d^{CHL} : Verlust von CHL (min^{-1}); k_d^{ECL} : Autohydrolyse von ECL (min^{-1}); k_{feed} : Zufuhr Substratvolumen (l min^{-1}); $[NaOH]$: Konzentration der von NaOH (mmol l^{-1})

allerdings auf die Werte innerhalb von 6,7 h, da nach 23 h keine Aktivität mehr festgestellt werden konnte. Weil in der Zwischenzeit keine Aktivitätsbestimmungen vorgenommen wurden, konnte für die CHMO keine exakte *HWZ* über einen größeren Zeitraum ermittelt werden. Die Änderung der Aktivität der Referenz war für beide Enzyme geringer, womit die Abnahme der Enzymaktivität vorwiegend durch die mechanische Beanspruchung durch Rührer und Pumpe zu begründen ist. Bei der Referenz der ADH blieb die Aktivität sogar über den gesamten Zeitraum erhalten. Innerhalb der ersten 5 h war die Änderung der Enzymaktivität unter Prozessbedingungen für beide Enzyme um etwa 10–14 %, so dass die Reaktionszeiten für weitere Untersuchungen in diesem Zeitrahmen durchgeführt werden sollten, um den Einfluss der Enzymstabilität auf die Reaktion ohne die erneute Zugabe von Enzym zu tolerieren.

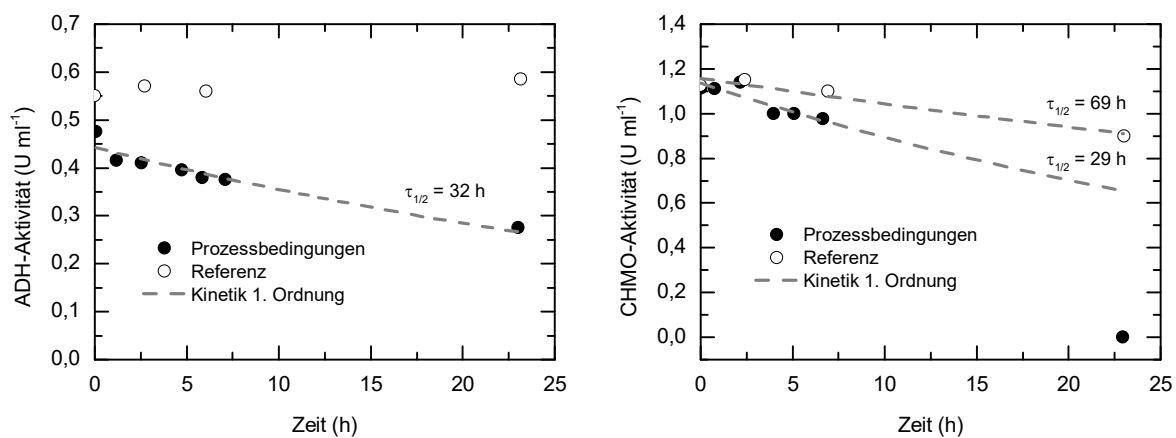


Abb. 6-4 Änderung der ADH-Aktivität (links) und der CHMO-Aktivität (rechts) unter Prozessbedingungen im Vergleich zur Inkubation im geschlossenen Reaktionsgefäß ohne Pumpen (Referenz). Verdünnter Rohextrakt in 40 ml NaPP (100 mM, pH 8), 2 mM MgCl₂, 25 °C, 30 ml min⁻¹ Pumprate durch Begasungseinheit, Magnetrührer.

6.1.4 Anwendung des kinetischen Modells für den Satzbetrieb

Abb. 6-5 zeigt die berechneten Konzentrationsverläufe im Satzbetrieb für CHL und ECL im Vergleich zu den experimentellen Daten. Die berechneten Verläufe der übrigen Verbindungen wie Cofaktor, CHN und 6-HHA sind aufgrund der niedrigen Konzentrationswerte und zur klareren Übersicht nicht dargestellt. Für die CHMO wurden zuvor zwei kinetische Modelle angenommen (siehe Kapitel 4.2.2), für die jeweils eine Berechnung erfolgte. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Berechnung mit dem unkompetitiven Inhibierungstyp die experimentellen Verläufe übereinstimmend wiedergegeben werden konnten im Gegensatz zur Berechnung mit dem kompetitiven Inhibierungstyp (Abb. 6-5). Letzteres wurde daher für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt. Für das kinetische Modell mit dem unkompetitiven Inhibierungstyp konnte eine Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den berechneten Daten von 93 % für CHL und 97 % für ECL ermittelt werden.

Die Konzentrationsänderungen von CHL und ECL gleichen bis zum vollständigen Umsatz augenscheinlich eher einer Reaktion pseudo-0. Ordnung, statt dem typischen Verlauf einer kinetisch kontrollierten, zweistufigen Reaktion. Das liegt daran, dass die aufeinanderfolgenden Reaktionen

an die Regeneration des Cofaktors gekoppelt sind und damit die Konzentration von CHN als Intermediat sowie die Enzymaktivitäten von ADH und CHMO limitiert sind. Die Aktivität jedes einzelnen Enzyms ist durch die Änderungen der einzelnen Verbindungen beeinflusst. In Abb. 6-6 sind die Reaktionsgeschwindigkeiten von ADH und CHMO während des Umsatzes von 20 mM CHL aufgetragen. Da der erste Oxidationsschritt von CHL zu CHN reversibel ist, wurden für die ADH beide Reaktionsgeschwindigkeiten berücksichtigt. Es ist zu erkennen, dass die ADH-Aktivität zum Ende absinkt, da immer weniger CHL vorhanden ist und damit entsprechend der Kinetik die Enzymaktivität abnimmt. Für die CHMO ist hingegen im Verlauf des Versuchs eine Steigerung der Aktivität zu verzeichnen. Das ist eine Folge der Kinetik der CHMO bzgl. CHL, das die CHMO-Aktivität inhibiert. Da sich die Konzentration von CHL aber im Verlauf der Reaktion verringert, steigt die CHMO-Aktivität bis wiederum die Konzentration von CHN so gering ist, dass auch die CHMO-Aktivität entsprechend der Kinetik wieder abnimmt. In Summe wird die Abnahme der ADH-Aktivität durch die Zunahme der CHMO-Aktivität bis zum vollständigen Umsatz teilweise kompensiert, womit die Konzentrationsverläufe von CHL und ECL in Abb. 6-5 zu erklären sind.

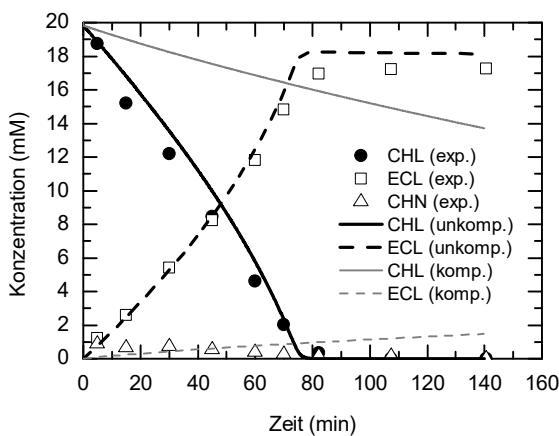


Abb. 6-5 Experimentelle und berechnete Konzentrationsverläufe für den Umsatz von 20 mM CHL im Satzbetrieb. Simulationenwerte: $V = 50$ ml, $a_{tot}^{CHMO} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,ox} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,red} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{CHL} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{ECL} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{feed} = 0$, $k_{feed} = 0$, $k_{base} = 0$.

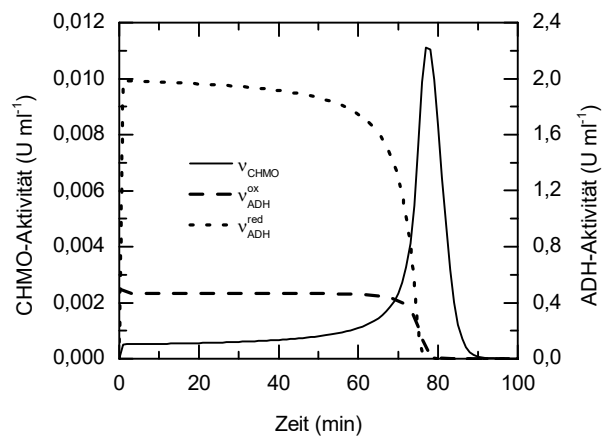


Abb. 6-6 Enzymaktivitäten von ADH und CHMO während des Umsatzes von 20 mM CHL zu ECL.

Aufgrund der Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den berechneten Verläufen konnte das zweistufige Reaktionssystem hinreichend beschrieben werden, um als Grundlage für weitere Simulationen zu dienen. Im Satzbetrieb ist die Reaktion bzgl. der CHMO-Aktivität stark limitiert und begünstigt den Verlust des Substrats CHL. Aus ökonomischer Sicht ist das System in dieser Art und Weise daher unwirtschaftlich. Um wirtschaftliche Produktkonzentrationen zu erreichen, müssen hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden. Durch den Einsatz höherer Ausgangskonzentrationen verlängern sich auch die Reaktionszeiten. Je länger eine Reaktion anhält und je höher die Substratkonzentration ist, desto größer ist auch der Verlust von CHL. Dies wird in Abb. 6-7 verdeutlicht. Hier wurden im Vergleich zum Umsatz von 20 mM CHL mit der gleichen En-

zymaktivität weitere Simulationen im Satzbetrieb mit 50 und 100 mM CHL als Ausgangskonzentrationen durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass die analytische Ausbeute nach komplettem Umsatz für 20, 50 und 100 mM jeweils auf 91 %, 72 % und 49 % sinkt. Aufgrund dieser Beobachtung ist das Reaktionssystem nicht für den Satzbetrieb geeignet.

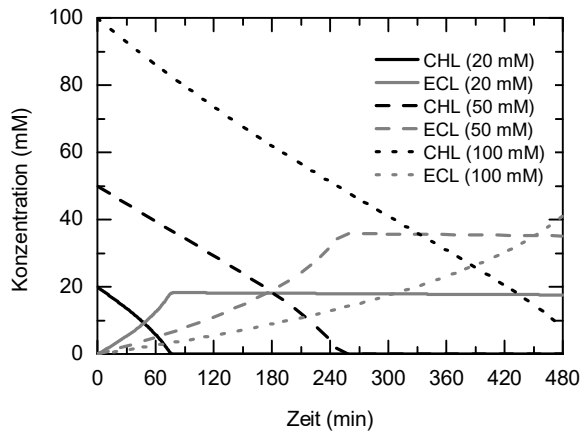


Abb. 6-7 Simulationen zur enzymatischen Synthese von ECL mittels ADH und CHMO ausgehend von 20, 50 und 100 mM CHL im Satzbetrieb. Simulationswerte: $V = 50 \text{ ml}$, $a_{\text{tot}}^{\text{CHMO}} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{\text{tot}}^{\text{ADH,ox}} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{\text{tot}}^{\text{ADH,red}} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{\text{CHL}} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{\text{ECL}} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{\text{feed}} = 0$, $k_{\text{feed}} = 0$, $k_{\text{base}} = 0$.

6.2 Reaktionskaskade im Zulaufverfahren

6.2.1 Diskontinuierliche und automatisierte Substratzugabe

Der verfahrenstechnische Lösungsansatz zur Substratinhibierung besteht darin, dass das Substrat dem Reaktionsgemisch in niedriger Konzentration zugeführt wird und eine hohe Substratkonzentration bspw. durch eine zu hohe Dosierung vermieden werden sollte. Dieses Verfahren wurde zu Beginn als Zulaufverfahren bezeichnet.

Für die Synthese von ECL ist daher das Substrat in kleinen Mengen und in bestimmten Zeitabständen zugegeben worden. Dazu sollte nach der Substratzugabe eine Konzentration von ca. 2 mM CHL erreicht bzw. gehalten werden. Idealerweise wird damit so viel Substrat zugegeben, dass es dem Verbrauch entspricht. Dies kann allerdings nur dann erfolgen, wenn die Konzentrationen einzelner Komponenten während der Reaktion bestimmt werden können, um den Umsatz zu ermitteln. Eine Echtzeitanalytik war allerdings nur für Sauerstoff möglich. Die Konzentrationen von CHL oder ECL wurden über eine herkömmliche Analytik mittels GC bestimmt. Um eine kontrollierte Substratzugabe einzurichten war daher nur eine Orientierung am Sauerstoffverbrauch möglich, welcher der Reaktion stetig über die Membranbegasung zugeführt wurde. Die experimentelle Umsetzung dazu ist in Abb. 6-8 dargestellt. Die Reaktion wurde mit der ersten Zugabe von CHL gestartet, was anhand der sofortigen Abnahme der Sauerstoffkonzentration zum Zeitpunkt null zu erkennen ist. Nachdem CHL komplett umgesetzt war und damit auch kein Sauerstoff mehr verbraucht wurde, stieg die Sauerstoffkonzentration wieder an. Dieser Anstieg wurde als Auslöser für eine erneute Substratzugabe genutzt, womit die Sauerstoffkonzentration wieder sank. Da bei diesem Versuch der Verbrauch durch die eingesetzte Enzymaktivität innerhalb der ersten 50 min höher war als der Sauerstoffeintrag, sank die Sauerstoffkonzentration auf null und limitierte dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit.

Zur Automatisierung der Substratzugabe ist mit der Software *Matlab* ein Skript erarbeitet worden, das mit der ersten Substratzugabe gestartet wurde. Während des Versuchs wurden nach einem bestimmten Zeitabstand die bis dahin aufgezeichneten Werte für die Sauerstoffkonzentration ausgelesen. Aus einigen der letzten Werte wurde dann die Steigung berechnet. Nachdem eine positive Steigung sowie das Überschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts ermittelt wurden, ist die Zugabe einer definierten Menge an Substrat über eine Schlauchpumpe ausgelöst worden. In dem Skript wurden zu Beginn die dafür erforderlichen Parameter wie das Startvolumen und die Konzentration der Substratlösung vorgegeben. Daraus wurde innerhalb des Programms die Menge an Substratvolumen errechnet, die zugegeben werden musste, um eine vorgegebene Endkonzentration (z. B. 2 mM) im Reaktor zu erzielen. Das zugeführte Substratvolumen wurde wiederum von der Pumpe aufgezeichnet und vor der erneuten Zugabe automatisch abgefragt. Dadurch wurden stets das Gesamtvolumen und das Volumen des zuzuführenden Substrats angepasst. In Abb. 6-9 sind die Ergebnisse eines Versuchs dargestellt, in dem erfolgreich die automatisierte Substratzugabe umgesetzt werden konnte. Bei einigen Zeitpunkten ist zu erkennen, dass mehr als einmal Substrat zur selben Zeit hinzugegeben wurde. Das lag daran, dass der zeitliche Abstand zur Ermittlung der erneuten Zugabe zu gering war, um eine daraus resultierende Abnahme der Sauerstoffkonzentration feststellen zu können. Während des Versuchs erfolgte keine Probeentnahme und keine Konzentrationsbestimmung mittels GC, da in dem Skript keine Verringerung des Volumens berücksichtigt wurde. Am Ende des Versuchs nach 120 min wurde eine Endpunktbestimmung durchgeführt, bei der 0,42 mmol ECL (15,5 mM) bei komplettem Umsatz von CHL ermittelt werden konnte, obwohl 0,5 mmol CHL (20 mM) insgesamt hinzugegeben wurde. Das entspricht einer Ausbeute von 78 %. Diese hohe Abweichung ist damit zu begründen, dass die Substratzugabe von ca. 200 μl CHL-Lösung (ca. 250 mM) mit der Schlauchpumpe nicht präzise genug zugegeben werden konnte.

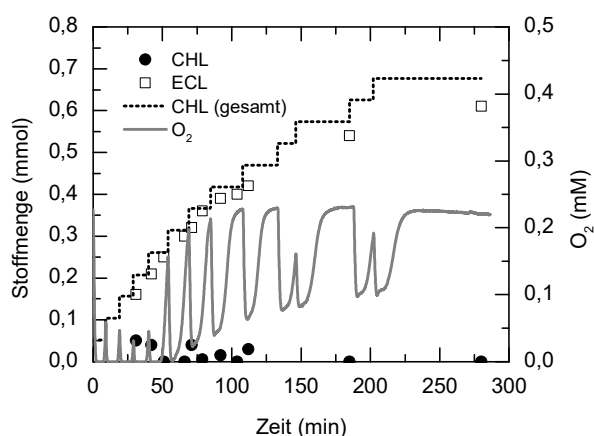


Abb. 6-8 Reaktion im Zulaufverfahren mit manueller, diskontinuierlicher Substratzugabe in Abhängigkeit vom O_2 -Verbrauch. Reaktionsbedingungen: 25 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 mM MgCl_2 , 0,4 mM NADP^+ , 0,7 U ml^{-1} CHMO, 1 U ml^{-1} ADH, 254 mM CHL Stammlösung, 25 °C, Begasung mit Luft.

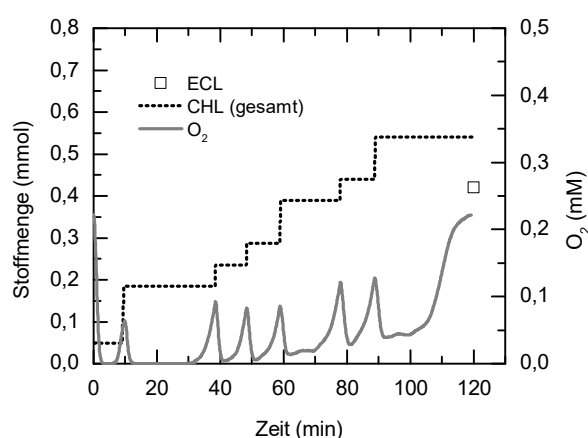


Abb. 6-9 Reaktion im Zulaufverfahren mit automatisierter Substratzugabe in Abhängigkeit vom O_2 -Verbrauch. Reaktionsbedingungen: 25 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 mM MgCl_2 , 0,4 mM NADP^+ , 0,7 U ml^{-1} CHMO, 1 U ml^{-1} ADH, 242 mM CHL Stammlösung, 25 °C, Begasung mit Luft.

Durch die diskontinuierliche Substratzugabe konnte eine Substratinhibierung vermieden und erfolgreich automatisiert werden. Dennoch führte dies im Vergleich zu einem Versuch im Satzbetrieb (Abb. 6-10) insgesamt nicht zu einem höheren Umsatz in einem vergleichbaren Zeitraum. Nach ca. 180 min Reaktionszeit ist bei der Reaktion im Satzbetrieb etwa die gleiche Menge CHL (ca. 0,5 mmol) umgesetzt worden wie im Zulaufverfahren mit diskontinuierlicher Substratzugabe (Abb. 6-8). Der Grund dafür ist, dass in der Zeit zwischen dem vollständigen Umsatz der zugeführten Menge des Substrats und der erneuten Substratzugabe kein Umsatz stattfand. Dies führte dazu, dass bei beiden Reaktortypen etwa die gleiche Menge in der gleichen Zeit umgesetzt werden konnte.

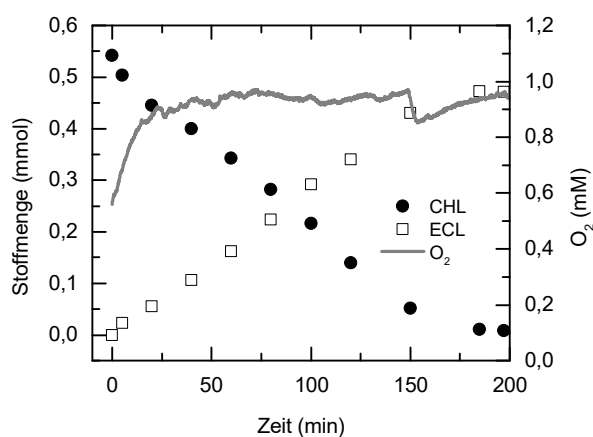


Abb. 6-10 Reaktion im Satzbetrieb. Reaktionsbedingungen: 25 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 mM MgCl₂, 0,5 mmol (20 mM) CHL, 0,4 mM NADP⁺, 0,5 U ml⁻¹ CHMO, 1 U ml⁻¹ ADH, 25 °C, Begasung mit O₂.

6.2.2 Kontinuierliche Substratzugabe und pH-Kontrolle

Für eine effektivere Substratzugabe musste die diskontinuierliche Zugabe verfeinert werden, um die Zeit zwischen zwei Substratzugaben, in der kein Umsatz stattfindet, zu verringern. Als optimal erwies sich daher eine kontinuierliche Substratzufuhr, die der Enzymaktivität angepasst werden konnte. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen wurde das Substrat der Reaktion für die kontinuierliche Substratzugabe nun unverdünnt hinzugegeben. Dies hatte den Vorteil, dass die Verdünnung der Enzymaktivität im Reaktor, die durch das Zuführen einer verdünnten Substratlösung verursacht wurde, auf ein Minimum reduziert werden konnte. Die Umsetzung erfolgte mittels einer Spritzenpumpe und einer damit verbundenen, sehr feinen Kapillare. Da der Schmelzpunkt von CHL im Bereich der Raumtemperatur liegt, musste die Spritze und die in den Reaktor hineinragende Kapillare beheizt werden, um die Viskosität herabzusetzen. Dadurch konnte CHL leichter in den Reaktor gefördert werden. Zusätzlich wurde eine pH-Kontrolle mittels Autotitration in den experimentellen Aufbau integriert, um einer Änderung des pH-Wertes durch die Bildung von 6-HHA entgegenzuwirken. Der experimentelle Aufbau dazu ist in Abb. 6-11 und Abb. 6-12 dargestellt.

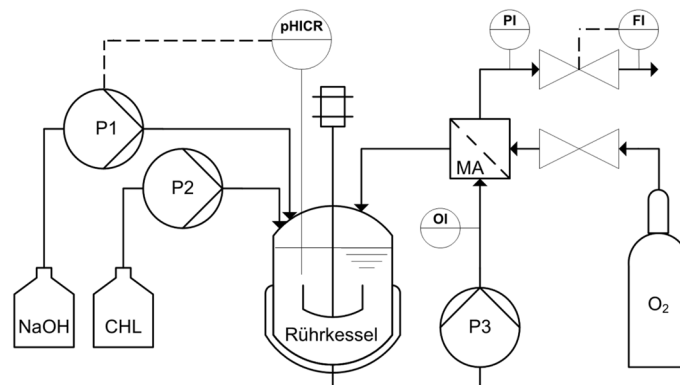


Abb. 6-11 Fließbild zum experimentellen Aufbau des Zulaufverfahrens. FI: Schwebekörper-Durchflussmesser, MA: Membranbegasung, OI: O₂-Sonde, PI: Manometer, pHICR/P1: Pumpe mit pH-Sonde und Regelung (Autotitration), P2: Spritzenpumpe, P3: Mehrkanal-Schlauchpumpe.

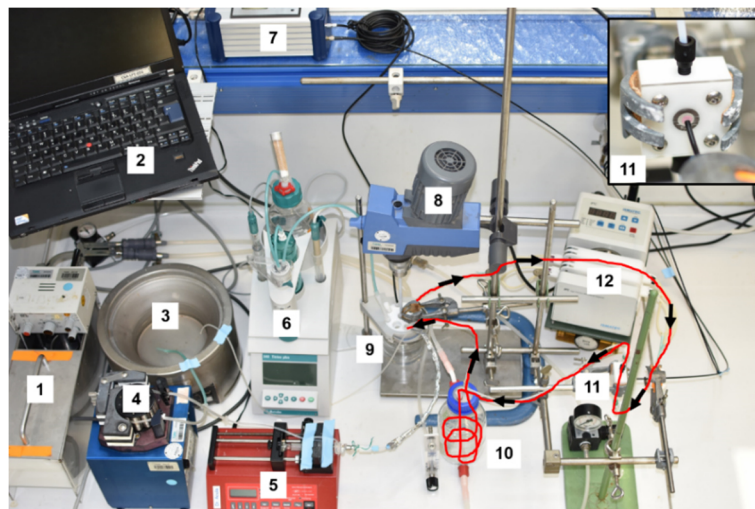


Abb. 6-12 Experimenteller Aufbau des Zulaufverfahrens. 1: Wasserbad zur Temperierung des Rührkessels, 2: PC zur Datenaufnahme und Pumpensteuerung, 3+4: Wasserbad und Schlauchpumpe zur Temperierung der Spritzenpumpe, 5: Spritzenpumpe mit CHL, 6: pH-Kontrolle und Autotitration (ca. 10^{-3} – 1 ml min^{-1}), 7: Sauerstoffsonde, 8: Rührer, 9: Rührkessel (75 ml), 10: Membranbegasung (max. 0,5 bar Überdruck), 11: Messzelle zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration, 12: mehrkanalige Schlauchpumpe. Die rote Linie kennzeichnet mit Pfeilen den Umlauf des Reaktionsmediums.

In Abb. 6-13 sind die Ergebnisse eines Versuches gezeigt, bei dem CHL kontinuierlich und unverdünnt zugegeben wurde. Es ist zu erkennen, dass damit die Menge an CHL währenddessen stets niedrig gehalten werden konnte und zu ECL als Produkt umgesetzt wurde. Dabei korrelierte die ermittelte Menge an ECL mit der Zugabe von CHL bis etwa 2 h. Nach 111 min wurde die Rate der Substratzugabe um 50 % erhöht, um eine höhere Produktbildungsrate zu erzielen. Ab dem Zeitpunkt wich die zugeführte Substratmenge von der ermittelten Produktmenge ab. Einerseits wurde ECL teilweise zu 6-HHA hydrolysiert, was anhand der zugegebenen Menge an NaOH nachvollzogen werden konnte. Eine verzögerte Substratzugabe wäre andererseits ein Grund für die Mengenabweichung. Für diesen Versuch wurde CHL in einer Spritze aus Kunststoff aufgenommen und in die Spritzenpumpe eingespannt. Durch die Viskosität von CHL und der dünnen Kapillare war ein entsprechender Druckverlust anzunehmen. Durch den Druck der Pumpe, der auf die Spritze wirkte, war zu beobachten, dass sich der Kolben der Spritze leicht verformte. Dadurch

resultierte eine höhere Rate der Substratzufuhr im Reaktor erst zu einem späteren Zeitpunkt, als bei der Pumpe eingestellt wurde. Um diesen Umstand zu umgehen, wurde später eine Spritze aus stabilem Glas eingesetzt.

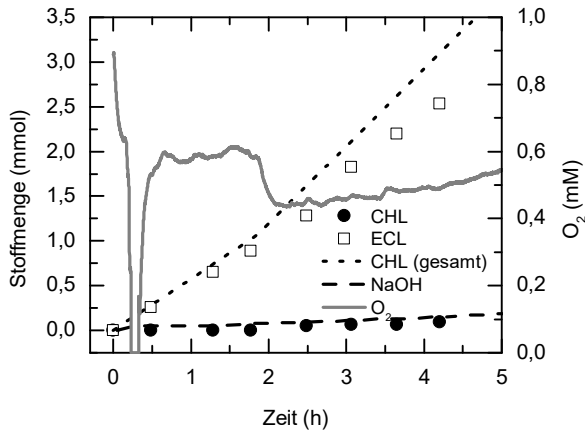


Abb. 6-13 Reaktion im Zulaufverfahren mittels kontinuierlicher Substratzugabe (unverdünntes CHL) und integrierter pH-Kontrolle. Reaktionsbedingungen: 50 ml NaPP (100 mM, pH 8), 5 mM MgCl₂, 0,4 mM NADP⁺, 1 U ml⁻¹ CHMO, 1,2 U ml⁻¹ ADH, 25 °C, 9,6–14,4 μmol min⁻¹ (1–1,5 μl min⁻¹) Zulauf CHL, Begasung mit O₂, Titration mit 1 N NaOH.

6.2.3 Kinetische Limitierung im Zulaufverfahren

Durch die kontinuierliche Zugabe von CHL und der Umsetzung zu ECL erfolgt im Idealfall nur ein Anstieg der ECL-Konzentration. Bei einer Konzentration von 100 mM ECL hat die CHMO eine Restaktivität von ca. 90 % (siehe Kapitel 4.2.2). Ein Aktivitätsverlust führt dazu, dass weniger Substrat umgesetzt wird, wodurch eine Akkumulation von CHL im Zulaufverfahren eintritt. Die Erhöhung der CHL-Konzentration während der Reaktion führt damit zu einer stärkeren Inhibition, wodurch der Prozess nach kurzer Zeit zum Erliegen kommt. Anhand von simulierten Reaktionsverläufen mit unterschiedlichen Raten der Substratzugabe wird dies in Abb. 6-14 verdeutlicht.

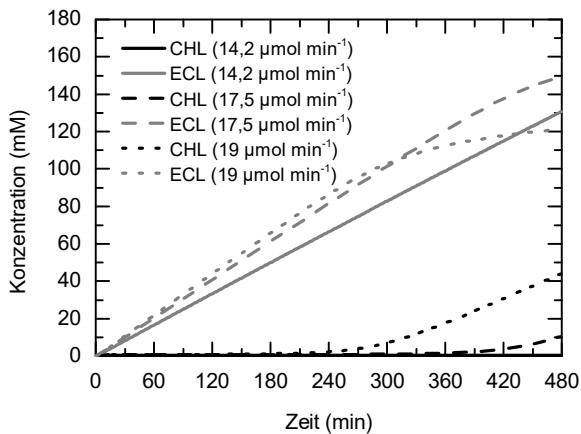


Abb. 6-14 Simulierte Reaktionsverläufe mit kontinuierlicher Zugabe von CHL. Simulationswerte: $V = 50$ ml, $a_{tot}^{CHMO} = 28,5$ μmol min⁻¹, $a_{tot}^{ADH,ox} = 518,5$ μmol min⁻¹, $a_{tot}^{ADH,red} = 4229,4$ μmol min⁻¹, $k_d^{CHL} = 0,002$ min⁻¹, $k_d^{ECL} = 9,3 \cdot 10^{-5}$ min⁻¹, $v_{feed} = 14,2/17,5/19$ μmol min⁻¹, $k_{feed} = 1,5 \cdot 10^{-6}/1,85 \cdot 10^{-6}/2 \cdot 10^{-6}$ l min⁻¹, $k_{base} = 8 \cdot 10^{-6}$ l mmol⁻¹ min⁻¹.

Mit einer Rate von 14,2 μmol min⁻¹ konnte innerhalb einer Reaktionszeit von 480 min eine konstante Zunahme der ECL-Konzentration ohne Akkumulation von CHL festgestellt werden. Durch die Erhöhung der Substratzugabe um 23 % auf 17,5 μmol min⁻¹ setzt eine Akkumulation von CHL und einer Abnahme der Produktbildungsrate ab ca. 390 min ein. Bei einer weiteren Steigerung der Substratzugabe um 30 % auf 19 μmol min⁻¹ tritt dieser Effekt bereits nach ca. 240 min ein. Da

anhand des kinetischen Modells das katalytische Potential der Reaktionssequenz verdeutlicht werden sollte, blieb die Enzymstabilität hierbei sowie für weitere Simulationen unberücksichtigt.

Experimentell wurde der Einfluss der Inhibierung der CHMO durch ECL untersucht, indem ein Versuch im Zulaufverfahren durchgeführt wurde, bei dem bereits von Beginn an eine erhöhte ECL-Konzentration (200 mM) vorlag. Die Ergebnisse zu diesem Versuch sind in Abb. 6-15 gezeigt. Darin ist zu erkennen, dass innerhalb der Reaktionszeit von 279 min bei einer konstanten Zugabe von $14,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ CHL die Konzentration von ECL lediglich um ca. 28 mM gesteigert werden konnte und CHL bis auf 29 mM anstieg. Im Vergleich zur Simulation (Abb. 6-14), bei der zu Beginn noch kein ECL zugegeben wurde, war die Konzentration von ECL innerhalb von 180 min bereits bei ca. 60 mM ECL. Unter der Berücksichtigung, dass der Versuch mit einem Volumen von 60 ml und die Simulation mit 50 ml durchgeführt wurde, wäre bei dem Versuch nach 180 min eine Konzentration von zusätzlich 50 mM zu erwarten gewesen.

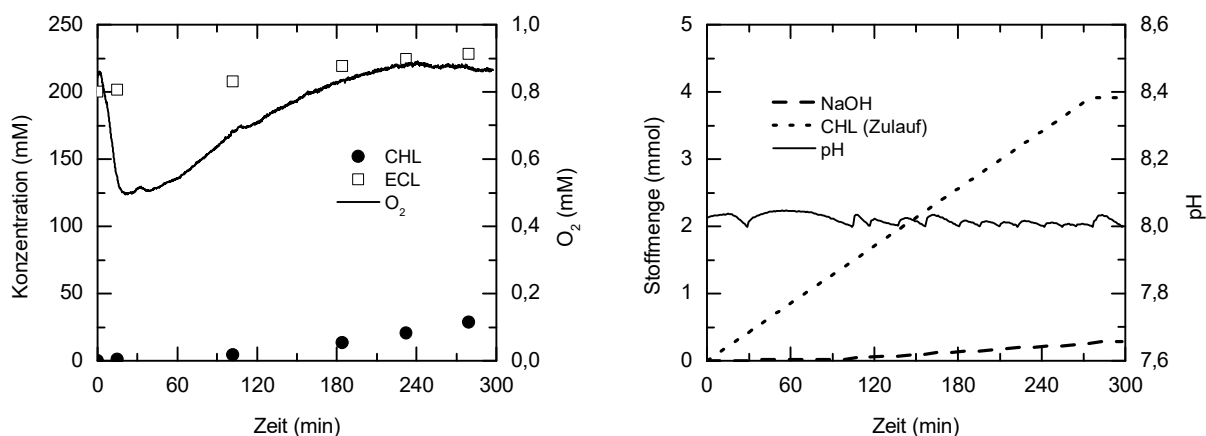


Abb. 6-15 Reaktionsverläufe des Zulaufverfahrens mit 200 mM ECL zu Beginn der Reaktion (links). Titrationsverlauf und Zulauf von CHL während der Reaktion (rechts). Reaktionsbedingungen: 60 ml NaPP (33 mM, pH 8), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM NADP⁺, 0,5 U ml⁻¹ CHMO, 0,55 U ml⁻¹ ADH, $14,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ ($1,5 \mu\text{l min}^{-1}$) CHL-Zulauf, 25 °C, Titration mit 5 N NaOH, 30 ml min⁻¹ Flussrate der Reaktionslösung.

6.3 Zusammenfassung

Bei der Prozessentwicklung für die zweistufige Reaktionssequenz wurden Versuche im Satzbetrieb und im Zulaufverfahren durchgeführt, wobei folgende Ergebnisse erzielt wurden:

- Der Umsatz von 20 mM CHL zu ECL im Satzbetrieb führte durch den Verlust von CHL zu einer verringerten Produktausbeute.
- Anhand der kinetischen Parameter wurde ein kinetisches Modell erstellt, welches zur Simulation des Versuchs im Satzbetrieb angewendet wurde. Die berechneten Reaktionsverläufe hatten gegenüber den experimentellen Daten eine Übereinstimmung von 93 und 97 % für CHL und ECL.
- Das Zulaufverfahren bietet gegenüber dem Satzbetrieb einen effizienteren Stoffumsatz aufgrund der Inhibierung der CHMO durch CHL.

- Für das Zulaufverfahren konnte eine diskontinuierliche Zugabe einer verdünnten Substratlösung automatisiert umgesetzt werden.
- Mit Hilfe des kinetischen Modells wurden weitere Versuche im Satzbetrieb und im Zulaufverfahren simuliert, um Limitationen des Reaktionssystems identifizieren zu können.
- Durch die kontinuierliche Substratzugabe mit unverdünntem Substrat war eine Optimierung der Substratzugabe möglich. Des Weiteren wurde eine pH-Kontrolle mittels Autotitration etabliert.
- Aufgrund der Inhibierung der CHMO durch ECL ist das Zulaufverfahren im Bereich höherer Produktkonzentrationen limitiert.

7 Strategien zur Vermeidung der Produktinhibierung

7.1 Isolierung von ϵ -Caprolacton

Damit auch bei höheren Produktkonzentrationen die Enzymaktivität erhalten bleibt, ist es notwendig, ECL während der Reaktion zu entfernen. Dies kann potenziell über eine *in situ* Produktentfernung mittels Extraktion aus der wässrigen Phase in ein organisches Lösungsmittel erfolgen. Dazu wurden Verteilungskoeffizienten K_{sw} von ECL für einige mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel bestimmt, welche in Tab. 7-1 aufgeführt sind. Dabei konnten für Chloroform und Dichlormethan die besten Extraktionsergebnisse erzielt werden. *n*-Alkane wie Hexan oder Heptan erwiesen sich als ungeeignet.

Eine experimentelle Umsetzung einer *in situ* Produktextraktion konnte jedoch nicht erfolgen, da die CHMO gegenüber organischen Lösungsmitteln nicht stabil ist. Dies wurde anhand eines Aktivitätstests überprüft. Dabei war keine CHMO-Aktivität mehr festzustellen, nachdem ein verdünnter Rohextrakt mit den einzelnen Lösungsmitteln vermischt und vorsichtig invertiert wurde.

Tab. 7-1 Verteilungskoeffizienten von ECL in verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	K_{sw}
Chloroform	$32,9 \pm 2,2$
Dichlormethan	$30,9 \pm 0,9$
Ethylacetat	$3,31 \pm 0,01$
Heptan	$0,075 \pm 0,002$
Hexan	$0,074 \pm 0,001$
MTBE	$1,018 \pm 0,001$

7.2 Lipasekatalysierte Umsetzung von ϵ -Caprolacton

7.2.1 Polymerisation von ϵ -Caprolacton

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ECL weiter zu PCL umzusetzen (Abb. 7-1). Dies kann ebenfalls enzymatisch durch Ringöffnungspolymerisation (ROP) im organischen Lösungsmittel mittels einer Lipase erfolgen. In der Literatur ist diese Reaktion bereits unter verschiedenen Bedingungen umfänglich beschrieben worden (Gross *et al.* 2001; Kumar und Gross 2000; Labet und

(CALA) beobachtet worden (Schmidt *et al.* 2015b; Schmidt *et al.* 2015a). Aufgrund der geringen Aktivität von CALA bzgl. des Umsatzes von ECL war hierfür eine im Vergleich zu CALB sehr viel höhere Menge an Enzym erforderlich (Scherkus *et al.* 2016). Des Weiteren wurden keine Oligomere erzeugt, die groß genug waren, um während der Reaktion aus der Lösung auszufallen. Dies wäre ein enormer Vorteil hinsichtlich der Produktaufarbeitung gewesen, da keine Extraktion erforderlich gewesen wäre.

7.2.2 Hydrolyse von ϵ -Caprolacton und deren Kinetik

Zunächst war die beobachtete Hydrolyse von ECL zu 6-HHA (Abb. 7-4) eine unerwünschte Nebenreaktion. Da jedoch keine selektive Methode zur *in situ* Produktentfernung von ECL umgesetzt werden konnte, sollte daher jene katalytische Aktivität von CALB zur Vermeidung einer Akkumulation von ECL eingesetzt werden. Dadurch ergab sich ein weiterer Reaktionsschritt, der zunächst separat untersucht wurde und anschließend in die Reaktionssequenz einbezogen werden sollte.

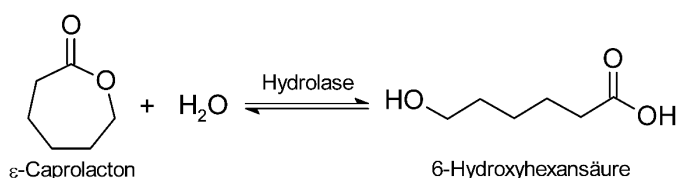


Abb. 7-4 Enzymatische Hydrolyse von ECL zu 6-HHA.

Katalysatorauswahl

Als Katalysator diene hierfür ebenfalls CALB. Aufgrund der Stabilität dieses Enzyms in immobilisierter Form und der damit verbundenen Vorteile, wie einer vereinfachten Abtrennung und Wiederverwendung, sollte CALB im Gegensatz zu den löslichen Enzymen, ADH und CHMO, immobilisiert eingesetzt werden. Für wasserfreie Reaktionssysteme und Reaktionen in organischen Lösungsmitteln wird CALB hauptsächlich adsorptiv immobilisiert an einen hydrophoben Träger angewendet (Miletic *et al.* 2012). Bei der Verwendung im wässrigem Medium besteht die Gefahr, dass sich das Enzym vom Träger löst, wodurch die Vorteile immobilisierter Enzyme nicht mehr gegeben sind (Hanefeld *et al.* 2009). Daher sollte CALB kovalent an einen hydrophilen Träger gebunden sein. Die Polarität des Trägermaterials ist entscheidend für die Benetzung der Trägeroberfläche und den Zugang des wässrigen Lösungsmittels in die Poren. Dadurch wird letztendlich auch die Aktivität der immobilisierten Präparation bestimmt, indem möglichst jedes einzelne immobilisierte Enzymmolekül mit dem Lösungsmittel in Berührung kommt. In einer Kooperation mit der Firma Fermenta Biotech Limited (Maharashtra, Indien) (FBL) wurden verschiedene Träger mit und ohne immobilisierter Lipase getestet (Tab. 7-2). Dazu sind verdünnte Rohextrakte von ADH und CHMO mit den einzelnen Substanzen inkubiert und anschließend die Enzymaktivität im Überstand bestimmt worden. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen in Abb. 7-5 zeigen, dass jede Testsubstanz einen Einfluss auf die Enzymaktivität im Überstand hatte. Nach der Inkubation mit den Präparaten NIN-527, NIN-528, EDX und ED3X wurde für die CHMO eine 13–

35 % geringere Aktivität im Überstand bestimmt. Eine Ursache dafür könnte eine Adsorption am Trägermaterial gewesen sein. Da keine Immobilisierung von ADH und CHMO erfolgen sollte, wurde dies nicht eingehender untersucht. Die Präparate K15, VDN und MDN hatten hingegen einen aktivitätssteigernden Effekt auf ADH und CHMO. Ursachen dafür könnten eine Fremdkaktivität des Trägermaterials oder chemische Rückstände gewesen sein, die möglicherweise einen „aktivierenden“ Effekt auf die Enzyme bewirkten oder direkt umgesetzt wurden. VDN und MDN eigneten sich aufgrund der adsorptiven Immobilisierung und des unpolaren Materials nicht für weitere Anwendungen. Das Trägermaterial K15 hatte einen polaren Charakter und wurde bereits mit CALB beladen, was den Anforderungen entsprach. Chemische Rückstände, die eine höhere Aktivität bewirkten, wurden nach drei Waschschrritten mit Wasser entfernt. Eine vermeintliche Fremdkaktivität durch ein anderes Enzym konnte durch weitere Aktivitätstests ausgeschlossen werden.

Tab. 7-2 Übersicht der verschiedenen Träger und Immobilisierungen.

Bezeichnung	Immobilisierung	Polarität*
CALB gebunden:		
NIN-527	adsorptiv	unpolar
NIN-528	adsorptiv	unpolar
K15	kovalent	polar
freie Träger:		
EDX	kovalent	polar
ED3X	kovalent	polar
VDN	adsorptiv	unpolar
MDN	adsorptiv	unpolar

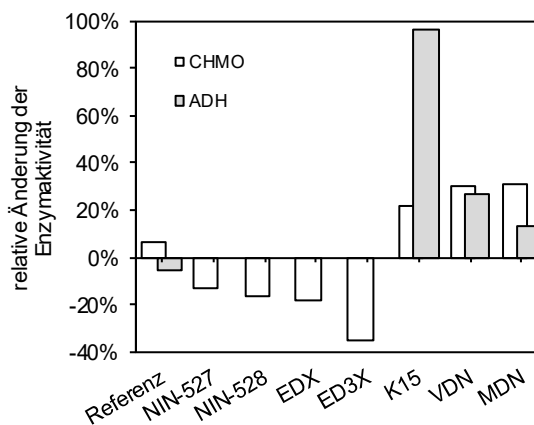


Abb. 7-5 Änderung der Enzymaktivitäten von ADH und CHMO nach 1 h Inkubation von 1,5 ml verdünntem Rohextrakt in NaPP (100 mM, pH 8) mit 50 mg Testsubstanz bei Raumtemperatur.

Der biokatalytische Umsatz von ECL zu 6-HHA in Wasser bzw. Puffer ist exemplarisch in Abb. 7-6 gezeigt. Dabei wurde innerhalb der Reaktionszeit von 190 min ein Umsatz von 89 % erzielt. Eine Analytik über den Verbrauch von ECL und der Bildung von 6-HHA erfolgte mittels HPLC. Hierbei war mit der Abnahme der ECL-Konzentration entsprechend die Bildung der korrespondierenden Hydroxysäure, 6-HHA, beobachtet worden (Abb. 7-7). Die Entstehung von Dimeren oder Oligomeren wurde nicht festgestellt. Es war daher anzunehmen, dass nach weiterer Reaktionszeit ein vollständiger Umsatz erreicht werden konnte. Nach etwa 40–50 % Umsatz zeigte sich im Vergleich zu einer Reaktion erster Ordnung eine größere Abnahme der Aktivität. Das lag daran, dass durch die Bildung der Säure der pH sank und damit die Aktivität der CALB beeinflusste. Im wässrigen Medium ist die CALB in einem Bereich von pH 3,5 bis 9,5 stabil, die maximale katalytische Aktivität liegt allerdings bei pH 7 vor (Anderson *et al.* 1998).

* nach Angaben des Herstellers

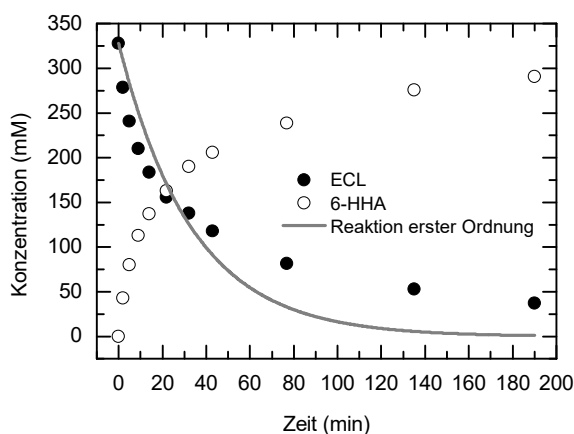


Abb. 7-6 Reaktionsverlauf einer lipasekatalysierten Hydrolyse von ECL zu 6-HHA. Reaktionsbedingungen: 1450 μ l NaPP (100 mM, pH 7), 50 μ l ECL (315 mM), 49,7 mg CALB (FBL), 30 $^{\circ}$ C, 900 rpm Schüttelgeschwindigkeit.

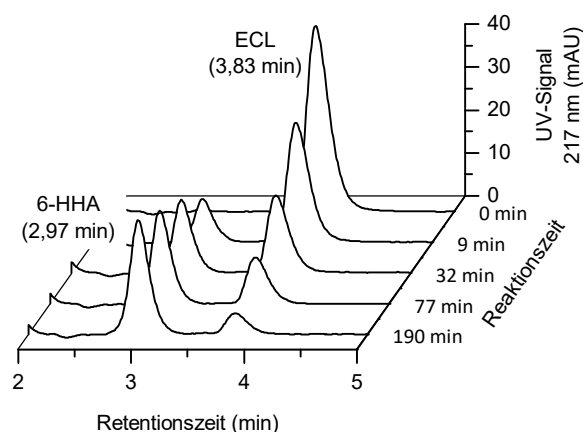


Abb. 7-7 Chromatogramme (HPLC) zu verschiedenen Zeitpunkten während der Lipase katalysierten Hydrolyse von ECL zu 6-HHA.

Kinetik der Lipase*

Um die Aktivität der CALB bei pH 8 zu bestimmen und 6-HHA als ausschließliches Produkt zu bestätigen, wurde mittels Autotitration der pH-Wert während der Hydrolyse konstant gehalten (Abb. 7-8).

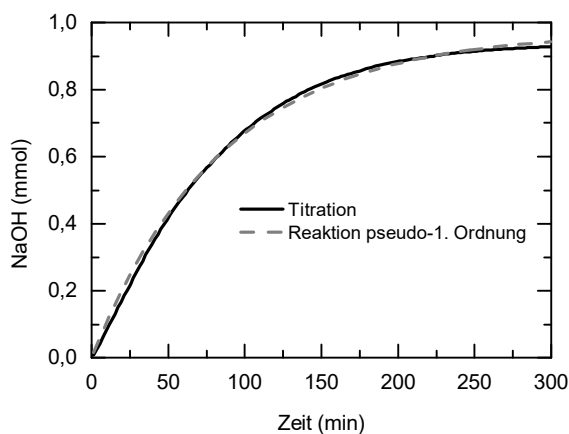


Abb. 7-8 Titrationskurve zur enzymatischen Hydrolyse von ECL (0,95 mmol, 23,6 mM) zu 6-HHA. 111 mg CALB (K15, FBL), 100 μ l ECL in 40 ml NaPP (10 mM, pH 8), 25 $^{\circ}$ C.

Vereinfacht konnte anhand des Reaktionsverlaufes durch Gleichung (7-1) eine Kinetik erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_{ECL} (min^{-1}) angepasst werden.

$$v_{CALB} = k_{ECL} \cdot n(ECL) \quad (7-1)$$

* Ergebnisse in diesem Kapitel sind Bestandteil einer Veröffentlichung (Scherkus *et al.* 2017).

Unter Berücksichtigung der konstanten CALB-Konzentration wurde eine Kinetik pseudo-1. Ordnung angenommen, wodurch sich k_{ECL} wie in Gleichung (7-2) aus der Geschwindigkeitskonstanten k'_{ECL} mit $0,004 \pm 3 \cdot 10^{-5} \text{ l g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und der CALB-Konzentration (g l^{-1}) zusammensetzt.

$$k_{ECL} = k'_{ECL} \cdot [CALB] \quad (7-2)$$

Mit der vereinfachten Kinetik zur lipasekatalysierten Hydrolyse von ECL zu 6-HHA sind die Gleichungen (6-4) und (6-5) zu (7-3) und (7-4) modifiziert worden, wodurch das kinetische Modell um einen Reaktionsschritt erweitert wurde. Die Hydrolyse erforderte eine höhere Titrationsrate, wodurch ebenfalls die Änderung des Reaktionsvolumens angepasst werden musste. Damit wurde Gleichung (6-6) durch Gleichung (7-5) ersetzt.

$$\frac{dn(ECL)}{dt} = v_{CHMO} \cdot V_0 - (k_{ECL} + k_d^{ECL}) \cdot n(ECL) \quad (7-3)$$

$$\frac{dn(6-HHA)}{dt} = (k_{ECL} + k_d^{ECL}) \cdot n(ECL) \quad (7-4)$$

$$\frac{dV}{dt} = k_{feed} + \frac{k_{ECL} + k_d^{ECL}}{[NaOH]} \cdot n(ECL) \quad (7-5)$$

7.3 Isolierung von 6-Hydroxyhexansäure

Die Aufarbeitung von 6-HHA als alternatives Produkt sollte am Ende der Reaktion mittels Extraktion mit einem passenden Lösungsmittel erfolgen. Es wurden daher Verteilungskoeffizienten für eine Auswahl verschiedener Lösungsmittel bestimmt (Tab. 7-3). Für die Extraktion der Säure ist die wässrige Lösung zuvor mit HCl auf pH 1–2 eingestellt worden. Mit Ethylacetat und MTBE wurden die höchsten Verteilungskoeffizienten erreicht. Für die übrigen Lösungsmittel waren die Verteilungskoeffizienten so niedrig, dass sie sich für eine Extraktion von 6-HHA nicht eigneten. Zwar konnte mit Ethylacetat im Vergleich zu MTBE eine effizientere Extraktion erzielt werden, dennoch wurde MTBE für die Extraktion eingesetzt. Auch 6-HHA sollte polymerisiert werden. Als unvorteilhaft erweisen sich dabei Rückstände von Ethylacetat aus der Aufarbeitung, da es während der Polymerisation zu einer Spaltung von Ethylacetat führen kann. Durch die daraus entstehenden Produkte Essigsäure und Ethanol könnte eine Veresterung mit 6-HHA auftreten, wodurch das Kettenwachstum unterbrochen wäre. Außerdem hätten für eine nahezu vollständige Extraktion von 6-HHA aus einer wässrigen Phase mehrere Extraktionsschritte erfolgen müssen. Durch die im Vergleich zu MTBE höhere Löslichkeit von Wasser in Ethylacetat und umgekehrt wären womöglich mehr Schritte mit Ethylacetat erforderlich als mit MTBE.

Theoretisch kann mittels eines Rotationsverdampfers das Lösungsmittel entfernt werden, um 6-HHA als reines Produkt zu erhalten. Da allerdings unvermeidbare Rückstände von Wasser mit

sehr niedrigem pH-Wert im Lösungsmittel nach der Extraktion auftraten, war eine säurekatalysierte Polymerisation zu beobachten, indem als Produkt eine bei Raumtemperatur sehr viskose Masse erhalten werden konnte. Diese war in Wasser nicht mehr löslich. Es bestand auch nicht die Möglichkeit, 6-HHA mittels HPLC nachzuweisen.

Tab. 7-3 Verteilungskoeffizienten von 6-HHA in verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	K_{sw}
Chloroform	$0,02 \pm 4 \cdot 10^{-5}$
Dichlormethan	$0,06 \pm 4 \cdot 10^{-4}$
Ethylacetat	$0,88 \pm 0,01$
Heptan	$0,03 \pm 5 \cdot 10^{-5}$
Hexan	$0,02 \pm 3 \cdot 10^{-4}$
MTBE	$0,57 \pm 0,02$

7.3.1 Polymerisation von 6-Hydroxyhexansäure*

Wie ECL sollte 6-HHA auch enzymatisch zu Poly-6-Hydroxyhexansäure umgesetzt werden. Aufgrund der identischen Polymerstruktur zu PCL wird im Folgenden für Poly-6-Hydroxyhexansäure die gleiche Abkürzung verwendet. Als Hydroxycarbonsäure stehen die für eine Veresterung erforderlichen funktionalen Gruppen innerhalb eines Moleküls zur Verfügung, so dass weitere Moleküle 6-HHA miteinander zu PCL verestert werden können (Abb. 7-9).

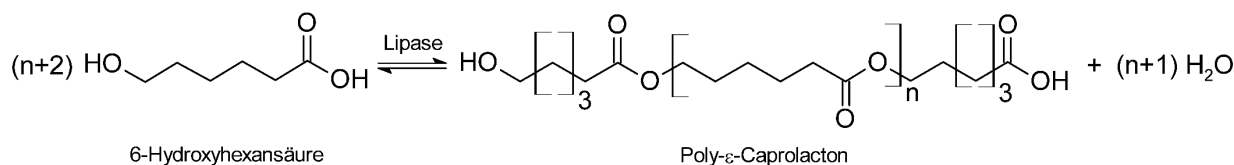


Abb. 7-9 Enzymatisch katalysierte Polymerisation von 6-HHA zu PCL.

Die lösungsmittelfreie Polymerisation von ω -Hydroxysäuren mittels CALB wurde bereits in der Literatur beschrieben und für diese Arbeit exemplarisch durchgeführt (Mahapatro *et al.* 2004). Dabei wurde 6-HHA aus einer präparativen, enzymatischen Hydrolyse von ECL gewonnen und für die enzymatische Polymerisation eingesetzt. Die Reaktion wurde bei einem Unterdruck von 80 mbar durchgeführt, um das gebildete Wasser zu entfernen. Nach einer Reaktionszeit von 27 h wurde die Reaktion beendet. Die Viskosität war dabei durch die Polymerisation so weit angestiegen, dass die mit CALB immobilisierten Träger durch den Rührer zerrieben wurden. Des Weiteren war dadurch keine homogene Durchmischung mehr möglich. Die Analyse des entstandenen Polymers mittels GPC ergab eine bimodale Polymerverteilung. Dabei konnte ein M_w -Wert von ca.

* Die Ergebnisse in diesem Kapitel sind teilweise aus einer Veröffentlichung entnommen (Scherkus *et al.* 2016).

63400 g mol⁻¹ mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 1,1 für die höhere Molekulargewichtfraktion ermittelt werden und für die niedrigere Molekulargewichtfraktion ein M_w -Wert von ca. 24000 g mol⁻¹ mit einem PDI von 2,1. Die Verteilung des Molekulargewichts ist in Abb. 7-10 im Vergleich zu den Molekulargewichtstandards, bestehend aus Polystyrol (28000 und 66000 g mol⁻¹), dargestellt und zeigt, dass ein Großteil des gebildeten Polymers mit einem hohen Molekulargewicht gebildet werden konnte.

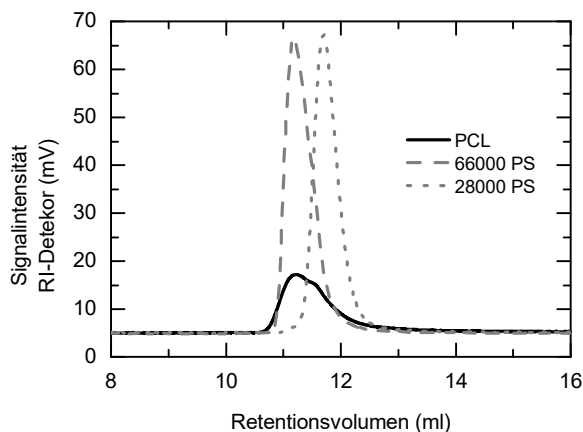


Abb. 7-10 Chromatogramm zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PCL aus 6-HHA im Vergleich zu Molekulargewichtstandards aus Polystyrol (PS). Reaktionsbedingungen: 6-HHA extrahiert aus einer enzymatischen Hydrolyse von 30,61 g ECL und 30,28 g Wasser, 1 g (3707 PLU) CALB (c-LEcta), 70 °C, 80 mbar, 27 h.

7.4 Zusammenfassung

Zur Überwindung der Produktinhibierung durch ECL, die zu einer kinetischen Limitation des Zulaufverfahrens führte, wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Eine effiziente Extraktion von ECL aus dem wässrigen Reaktionsansatz konnte mit Chloroform und Dichlormethan erfolgen. Die Umsetzung einer *in situ* Produktentfernung mittels Extraktion war hingegen aufgrund der geringen Stabilität der löslichen Enzyme gegenüber organischen Lösungsmitteln nicht möglich.
- Statt der Bildung von Oligomeren war mit dem Einsatz von CALB die Hydrolyse von ECL zu 6-HHA zu beobachten.
- In Kooperation mit der Firma Fermenta Biotech Limited wurde eine kovalent auf einen polaren Träger gebundene CALB ausgewählt und für die Hydrolyse von ECL eingesetzt.
- Für die durch CALB katalysierte Hydrolyse ist eine Kinetik pseudo-erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten bestimmt worden.
- Die Isolierung von 6-HHA konnte durch die Extraktion mit MTBE erzielt werden.
- Sowohl ECL als auch 6-HHA wurden erfolgreich mittels CALB zu PCL umgesetzt.

8 Zulaufverfahren mit immobilisierter Lipase*

8.1 Erweiterung der Reaktionssequenz

Nachdem die lipasevermittelte Hydrolyse von ECL und die Aufarbeitung zunächst separat von der Syntheseroute betrachtet wurden, sollte die Hydrolyse schließlich in die Reaktionssequenz integriert werden. Damit wurde die zweistufige Synthese von ECL zu einer dreistufigen Synthese von 6-HHA (Abb. 8-1).

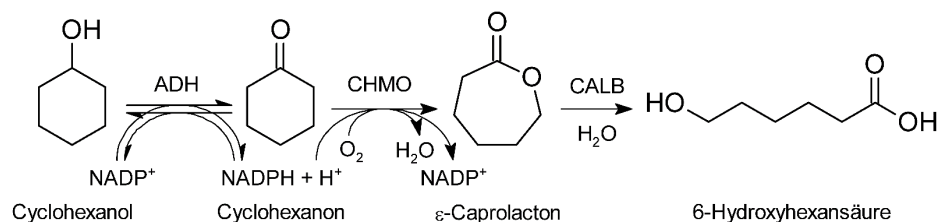


Abb. 8-1 Dreistufige, lineare Reaktionskaskade zur Synthese von 6-HHA.

Mit dem Einsatz der immobilisierten Lipase musste der experimentelle Aufbau so modifiziert werden, dass eine Blockierung der dünnen Schläuche durch Partikel zu vermeiden war. Dazu ist CALB direkt im Rührkessel eingesetzt und durch eine entsprechende Filtermembran das Eindringen von Partikeln in den Begasungskreislauf verhindert worden. Alternativ wurde CALB in ein Festbett eingebracht, das innerhalb des Begasungskreislaufs durchströmt wurde (Abb. 8-2). Sofern nicht anders vermerkt, wurde CALB bevorzugt im Rührkessel eingesetzt.

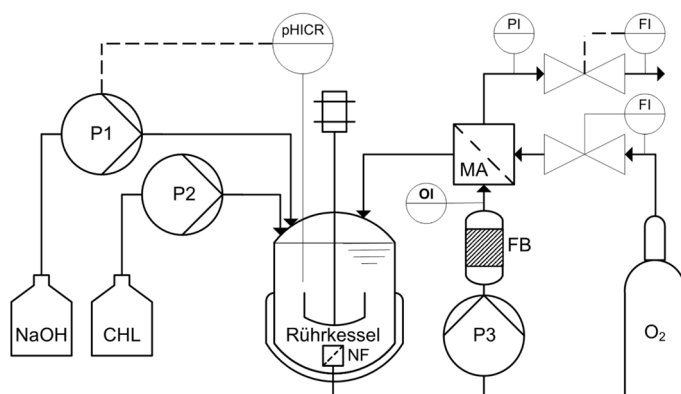


Abb. 8-2 Fließbild zum experimentellen Aufbau des Zulaufverfahrens. FB: Festbett mit immobilisierter CALB, FI: Schwebekörper-Durchflussmesser, MA: Membranbegasung, NF: Nylonfiltermembran (200 μm), OI: O₂-Sonde, PI: Manometer, pHICR/P1: Pumpe mit pH-Sonde und Regelung (Autotitration), P2: Spritzenpumpe, P3: Mehrkanal-Schlauchpumpe.

* Ergebnisse in diesem Kapitel sind Bestandteil von Veröffentlichungen (Scherkus *et al.* 2016, 2017).

8.2 Vermeidung der Produktinhibierung durch Hydrolyse

Um zu zeigen, dass die Inhibierung durch ECL mittels Hydrolyse zu 6-HHA überwunden werden konnte, war es notwendig, den Versuch aus Kapitel 6.2.3 (Abb. 6-15) zu wiederholen. Statt mit ECL ist dieser mit 200 mM 6-HHA wiederholt worden. Dazu wurde ECL mit CALB zu 6-HHA umgesetzt, bevor ADH und CHMO zugegeben und der Substratzulauf gestartet wurde. Die Ergebnisse zu diesem Versuch sind in Abb. 8-3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei einer bereits vorgelegten Konzentration von 200 mM 6-HHA eine kontinuierliche Bildung von 6-HHA bestand und die ECL-Konzentration stets niedrig bei ca. 4 mM gehalten werden konnte. Allerdings war auch in diesem Versuch eine Akkumulation von CHL während des kontinuierlichen Zulaufs zu beobachten. Das lag daran, dass die Zulaufgeschwindigkeit von $14,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ ($1,5 \mu\text{l min}^{-1}$) CHL zu hoch eingestellt war im Vergleich zur eingesetzten Enzymaktivität, insbesondere der CHMO-Aktivität. Nach 300 min wurde der Substratzulauf gestoppt, doch der Reaktionsverlauf wurde noch für weitere 60 min verfolgt. Es war eine rasche Abnahme der CHL- und ECL-Konzentration zu beobachten (Abb. 8-3). Innerhalb von 300 min wurden der Reaktion ca. 4,2 mmol CHL zugeführt und nahezu vollständig zu 6-HHA umgesetzt, was anhand der Titration verfolgt werden konnte. Weiterhin war es möglich, die Konzentrationsverläufe für ECL und 6-HHA durch das um die Hydrolyse erweiterte kinetische Modell entsprechend wiederzugeben. Eine Akkumulation von CHL wurde jedoch bei dem errechneten Verlauf nicht festgestellt, was darauf zurückzuführen ist, dass die womöglich unzureichende Durchmischung im Reaktor oder eine Abnahme der Enzymaktivität durch Enzymdegradation nicht im kinetischen Modell berücksichtigt wurden.

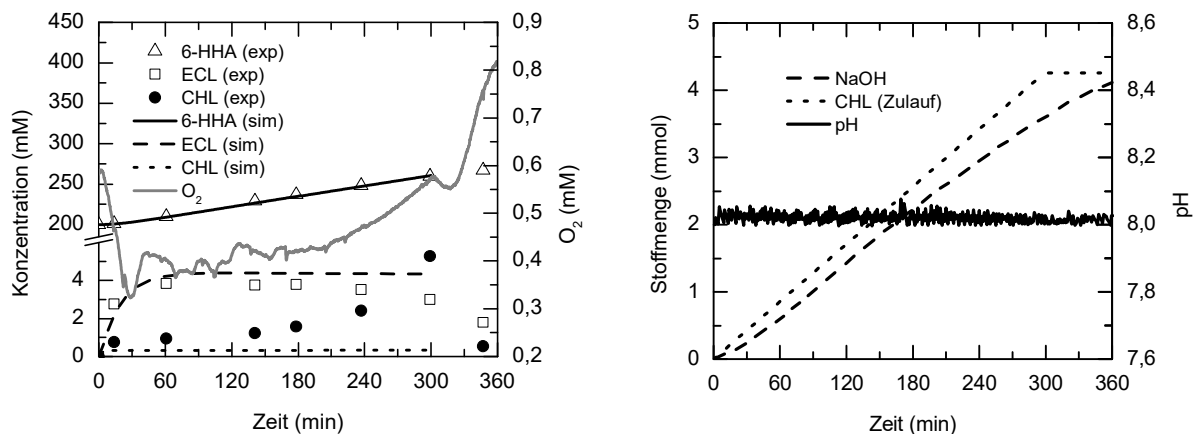


Abb. 8-3 Reaktionsverläufe des Zulaufverfahrens mit 200 mM 6-HHA zu Beginn der Reaktion (links). Titrationsverlauf und Zulauf von CHL während der Reaktion (rechts). Reaktionsbedingungen: 60 ml NaPP (33 mM, pH 8), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM NADP⁺, 0,5 U ml⁻¹ CHMO, 0,55 U ml⁻¹ ADH, $14,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ ($1,5 \mu\text{l min}^{-1}$) CHL-Zulauf, 25 °C, Titration mit 5 N NaOH, 30 ml min⁻¹ Flussrate der Reaktionslösung. Simulationswerte: $V = 0,06 \text{ l}$, $a_{\text{tot}}^{\text{CHMO}} = 34,2 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{\text{tot}}^{\text{ADH,ox}} = 622,2 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{\text{tot}}^{\text{ADH,red}} = 5075,3 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{\text{CHL}} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{\text{ECL}} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{\text{feed}} = 14,2 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_{\text{feed}} = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ l min}^{-1}$, $k_{\text{base}} = 10,7 \cdot 10^{-6} \text{ l mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k'_{\text{ECL}} = 0,004 \text{ l g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $[\text{CALB}] = 0,8 \text{ g l}^{-1}$.

Der direkte Vergleich der Versuche aus Abb. 6-15 und Abb. 8-3 hinsichtlich der Akkumulation von CHL ist in Abb. 8-4 gezeigt. Darin wird verdeutlicht, dass die Akkumulation von CHL im

Versuch mit der Lipase viel geringer ist und damit die Inhibierung durch ECL überwunden werden konnte.

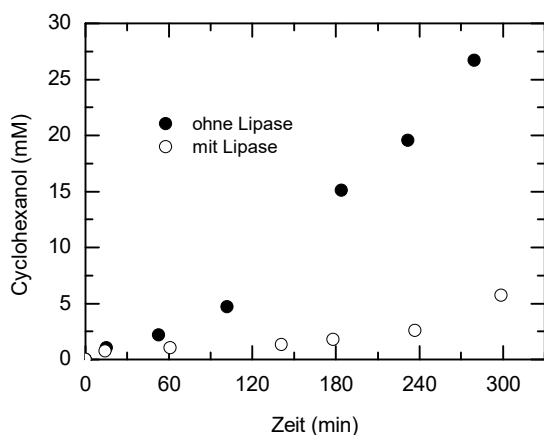


Abb. 8-4 Vergleich der Akkumulationen von CHL während der Versuche aus Abb. 6-15 und Abb. 8-3 bzw. ohne Lipase und mit Lipase.

Durch den Einsatz der Lipase im Zulaufverfahren wird die potentielle Enzymaktivität der CHMO effizienter genutzt als ohne Lipase. Dies kann anhand der berechneten Konzentrationsverläufe in Abb. 8-5 im Vergleich zu den errechneten Werten in Abb. 6-14 nachvollzogen werden, wo keine Hydrolyse von ECL katalysiert wurde. Bei einer konstanten Zulaufgeschwindigkeit von $19 \mu\text{mol min}^{-1}$ ist in Abb. 8-5 nach einer kurzen Anlaufphase eine konstante Bildung von 6-HHA zu beobachten, wobei ECL in einem Fließgleichgewicht unter 10 mM bleibt und CHL nicht akkumuliert. Im Vergleich zu den Werten in Abb. 6-14, bei denen die gleichen Aktivitäten für ADH und CHMO eingesetzt wurden, tritt eine signifikante Akkumulation von CHL bereits bei einer Zulaufgeschwindigkeit von $17,5 \mu\text{mol min}^{-1}$ ein.

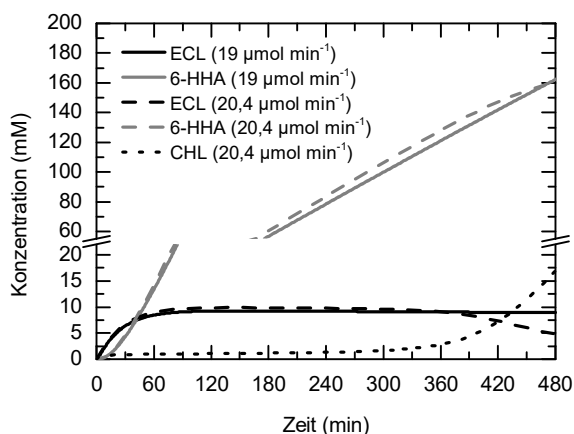


Abb. 8-5 Simulierte Reaktionsverläufe zur Synthese von ECL und anschließender Hydrolyse mit kontinuierlicher Zugabe von CHL. Simulationswerte: $V = 50 \text{ ml}$, $a_{\text{tot}}^{\text{CHMO}} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{\text{tot}}^{\text{ADH,ox}} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{\text{tot}}^{\text{ADH,red}} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{\text{CHL}} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{\text{ECL}} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{\text{feed}} = 19/20,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_{\text{feed}} = 2 \cdot 10^{-6}/2,15 \cdot 10^{-6} \mu\text{l min}^{-1}$, $k_{\text{base}} = 8 \cdot 10^{-6} \text{ l mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k'_{\text{ECL}} = 0,004 \text{ l g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $[\text{CALB}] = 0,5 \text{ g l}^{-1}$.

Mit einer weiteren Erhöhung der Zulaufgeschwindigkeit auf $20,4 \mu\text{mol min}^{-1}$ stellt sich zunächst ein ähnlicher Verlauf für die Bildung von 6-HHA und ECL ein, jedoch ist zu erkennen, dass von Beginn an eine niedrige CHL-Konzentration um ca. 1 mM vorliegt (Abb. 8-5). Diese steigt innerhalb von 300 min leicht an. Danach ist eine stark zunehmende Akkumulation von CHL festzustellen bis zu 17 mM innerhalb von 480 min , womit eine Inhibierung der CHMO einhergeht. Dies führt ab ca. 420 min zu einer verringerten Bildungsrate von 6-HHA. Die Hydrolyse von ECL läuft hingegen weiter ab, was anhand der sinkenden ECL-Konzentration zu erkennen ist.

Obwohl in der Berechnung eine maximale Enzymaktivität von $28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$ für die CHMO eingesetzt wurde, konnte ein optimaler Reaktionsverlauf mit einer Zulauftrate von nur $19 \mu\text{mol min}^{-1}$ simuliert werden, was etwa 67 % der eingesetzten CHMO-Aktivität entspricht. Eine Steigerung der Zulaufgeschwindigkeit auf 72 % ($20,4 \mu\text{mol min}^{-1}$) der CHMO-Aktivität führte nach 420 min zum Erliegen der Reaktion. Damit unterliegt die Reaktionssequenz auch mit der Lipase einer kinetischen Limitierung, die jedoch nicht aufgrund einer Inhibierung besteht, sondern bedingt durch die konsekutive Reaktionssequenz vorliegt.

In Abb. 8-6 sind die Ergebnisse eines Versuchs dargestellt, bei dem die gesamte dreistufige Reaktionssequenz über 20 h durchgeführt wurde. CALB ist in diesem Versuch in Form eines Festbetts in das Reaktionssystem integriert worden (Abb. 8-2). Während der ersten 7 h war eine konstante Bildung von 6-HHA bis 149 mM zu verzeichnen. Die Konzentration von 6-HHA wurde anhand der zugegebenen Menge an NaOH und dem Zeitpunkt der Probenahme entsprechenden Reaktionsvolumen ermittelt. Die Konzentrationen von CHL und ECL erreichten dabei maximal 3 bzw. 6 mM. Aufgrund der stetigen Konzentrationsbestimmung konnte die Zulauftrate zwischen 5 und $38 \mu\text{mol min}^{-1}$ variiert werden, um sowohl eine Steigerung der Produktbildung erzielen zu können als auch auf eine Akkumulation von CHL reagieren zu können. Um eine Akkumulation von CHL zu vermeiden, welche aufgrund der geringen Enzymstabilität von ADH und CHMO unter Prozessbedingungen zu erwarten war, wurde die Zulauftrate nach ca. 7 h auf $10 \mu\text{mol min}^{-1}$ reduziert und konstant gehalten. Dies führte dazu, dass nach 20 h insgesamt 15,2 mmol CHL vollständig zu 6-HHA umgesetzt wurden, was anhand des Titrationsverlaufs in Abb. 8-6 verfolgt werden konnte und eine analytische Ausbeute von 100 % ermöglichte. Dabei wurde eine Produktkonzentration von 291 mM 6-HHA erreicht, was bis dahin die höchste Produktkonzentration war, die mit diesem Reaktionssystem erzielt wurde (Schmidt *et al.* 2015b).

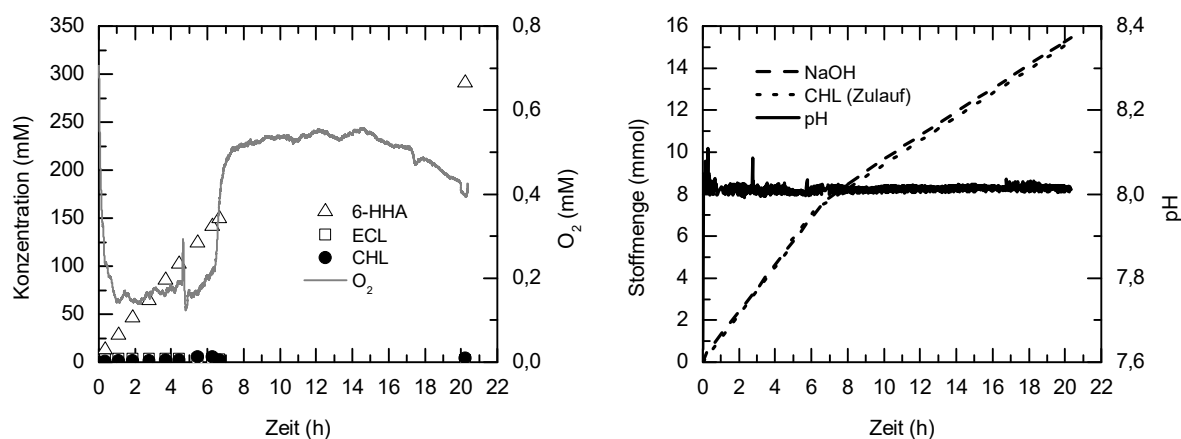


Abb. 8-6 Synthese von 6-HHA im Zulaufverfahren mit kontinuierlicher Substratzugabe. 50 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 U ml^{-1} CHMO, $1,1 \text{ U ml}^{-1}$ ADH, 1,5 g (653 CLU) CALB (FBL) im Festbett, 5 mM MgCl_2 , 0,4 mM NADP^+ , $5\text{--}38 \mu\text{mol min}^{-1}$ ($0,5\text{--}4 \mu\text{l min}^{-1}$) CHL-Zulauf, 10 ml min^{-1} Flussrate der Reaktionslösung, Titration mit NaOH (5 N), 25°C , Begasung mit O_2 .

Die Produktisolierung ist nach einem in ähnlicher Weise durchgeführten Versuch vorgenommen worden. Dazu wurde der pH-Wert des Reaktionsansatzes zunächst zwischen 1 und 2 eingestellt, wodurch die Proteine denaturierten und mittels Zentrifugation abgetrennt wurden. Anschließend

erfolgte eine Reduktion des Volumens im Rotationsverdampfer bis ein kristalliner Niederschlag von NaCl zu beobachten war. Anschließend wurde mit MTBE extrahiert und die organische Phase abgetrennt. Im Rotationsverdampfer wurde MTBE entfernt, bis ein zähflüssiger Rückstand erhalten werden konnte (Abb. 8-7). Dieser verfestigte sich nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur, was auf eine durch Säure katalysierte Polymerisation von 6-HHA zurückzuführen war.



Abb. 8-7 Zähflüssiger Rückstand als isoliertes Produkt der dreistufigen, enzymatischen Reaktionssequenz.

8.3 Zusammenfassung

Die Umsetzung der dreistufigen Reaktionssequenz lieferte folgende Ergebnisse:

- Der Einsatz der immobilisierten Lipase erfolgte experimentell in Form eines Festbetts und direkt im Rührkessel.
- Durch die Hydrolyse von ECL zu 6-HHA konnte die bei hohen Produktkonzentrationen eingetretene Inhibierung der CHMO durch ECL vermieden werden.
- Die dreistufige Reaktionssequenz konnte anhand des kinetischen Modells beschrieben und die experimentellen Daten teilweise wiedergeben werden.
- Durch die Simulation des Zulaufverfahrens mit katalysierter Hydrolyse von ECL konnte eine kinetische Limitierung hinsichtlich der eingesetzten CHMO-Aktivität festgestellt werden, die aufgrund der konsekutiven Reaktionssequenz besteht.

9 Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel sollen die gewonnenen Ergebnisse zur biotechnologischen Synthese von ECL im Einzelnen sowie übergreifend diskutiert und in den bisherigen Stand der Wissenschaft eingeordnet werden. Anhand dieser Beurteilung erfolgt zugleich ein Ausblick als Empfehlung für fortführende Untersuchungen zur Optimierung oder Erweiterung der Reaktionssequenz und der Prozessentwicklung.

9.1 Biotechnologische Synthese von ϵ -Caprolacton

Die Eigenschaften der eingesetzten Biokatalysatoren bestimmen grundlegend die Prozessentwicklung einer enzymatischen Reaktion. Dabei steht besonders die Enzymkinetik im Vordergrund. Zunächst wurden ADH und CHMO als Katalysatoren für die zweistufige Synthese von ECL ausgehend von CHL untersucht. Dabei wiesen ADH und CHMO eine ganz unterschiedliche Kinetik bzgl. ihrer Substrate auf. Während für die ADH unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen eine Kinetik ohne Inhibierung für Hin- und Rückreaktion angenommen werden konnte, wurde hingegen für die CHMO eine Substratüberschussinhibierung durch CHN und weitere unkompetitive Inhibierungen durch CHL und ECL in die Kinetik integriert. Die Inhibierung durch CHL war dabei um 55-mal stärker im Vergleich zur Inhibierung durch ECL. Dies führte dazu, dass CHL als Substrat für die Reaktionssequenz nur in geringen Konzentrationen von 1–2 mM zugunsten der CHMO-Aktivität eingesetzt werden konnten. Der sehr niedrige K_M -Wert von 6 μ M der CHMO für CHN hat zur Folge, dass das Enzym bei einer konstant gehaltenen Substratkonzentration um 1 mM etwa mit der maximalen Enzymaktivität arbeitet, was eine effiziente Ausnutzung der Enzymaktivität bereits bei einer geringen Substratkonzentration bedeutet und für das Zulaufverfahren vorteilhaft ist. Der niedrige K_M -Wert ist dabei vergleichbar mit den Literaturwerten (Donoghue *et al.* 1976; Latham und Walsh 1987; Ryerson *et al.* 1982). Für die ADH wurde hingegen ein K_M -Wert für CHL von 10,1 mM ermittelt. Beide K_M -Werte unterscheiden sich damit um den Faktor 1683. Das bedeutet, dass bei Substratkonzentrationen um 1 mM nur ein Bruchteil der potentiellen Enzymaktivität der ADH genutzt wird, was eine ineffiziente Ausnutzung der ADH-Aktivität bedeutet. Da die verwendete ADH der Literatur entsprechend vorwiegend für die Synthese von chiralen Alkoholen untersucht wurde, sind daher keine vergleichbaren Werte zur Enzymkinetik für den Umsatz von CHL zu CHN bekannt (Bradshaw *et al.* 1992; Hummel 1990; Weckbecker und Hummel 2006).

Durch den Einsatz freier Enzyme war es möglich, die einzelnen Enzyme und Reaktionsschritte anhand der Kinetik detailliert zu beschreiben und mittels eines kinetischen Modells die Reaktionssequenz zu charakterisieren. Andere Arbeiten zur biotechnologischen Synthese von ECL befassten sich mit dem Einsatz ganzer Zellen (*E. coli*), in denen die überexprimierten Enzyme enthalten waren (Doig *et al.* 2002; Schmidt *et al.* 2015b; Schmidt *et al.* 2015a; Wedde *et al.* 2017). Dabei

wurden die Enzyme separat oder gemeinsam in einer Zelle exprimiert. Mit der Ganzzellbiokatalyse erfolgt die Regeneration des Cofaktors durch den Zellmetabolismus unter dem Verbrauch von Glukose. Daher kann prinzipiell auf ein zusätzliches Regenerationssystem durch ein weiteres Enzym mit einem weiteren Substrat verzichtet werden. Da durch die Reaktionssequenz nur ein Substrat eingesetzt wird und die Regeneration des Cofaktors durch die anschließende Reaktion erfolgt, wäre theoretisch durch mehr Enzymaktivität eine beschleunigte Regeneration des Cofaktors und damit ein beschleunigter Umsatz möglich im Vergleich zur Regeneration des Cofaktors durch den Zellmetabolismus. Demnach wäre eine Ganzzellbiokatalyse mit ADH und CHMO in derselben Zelle sinnvoll. Des Weiteren bleiben die Enzyme innerhalb der Zelle länger aktiv, da sie vor äußeren Einflüssen, wie Sauerstoff und Enzymdegradation an der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser, geschützt sind. Bei der Festlegung der Reaktionsbedingungen wurde ein pH-Wert von 8 als bestmöglicher Kompromiss zwischen den Enzymaktivitäten von ADH und CHMO ermittelt und sollte daher während der Reaktion konstant gehalten werden. Innerhalb einer Zelle sind allerdings die optimalen Reaktionsbedingungen für den Prozess nicht immer gegeben. Der pH-Wert im Cytoplasma einer *E. coli*-Zelle, in dem sich die gebildeten Enzyme befinden, liegt bei pH 7,2–7,8 (Wilks und Slonczewski 2007). Dieser pH-Bereich wäre für ADH und CHMO nicht optimal gewählt und würde zu einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit führen. Andererseits könnte die daraus resultierende niedrigere Produktivität durch eine längere Nutzbarkeit der Katalysatoren kompensiert werden. Im Vergleich zum freien Enzym können die Enzymaktivitäten von ADH und CHMO kaum aufeinander abgestimmt werden. Dies wäre ausschließlich über die Kontrolle der Genexpression möglich und durch eine Reihe aufwendiger mikrobiologischer Untersuchungen umzusetzen. Es ist daher vorteilhaft, die freien Enzyme einzusetzen oder sie gezielt zu immobilisieren, um i) die Abtrennung des Katalysators zu erleichtern, ii) die Produktaufarbeitung zu vereinfachen, da Zellmetaboliten bereits abgetrennt wurden, iii) die Enzymaktivitäten aufeinander abzustimmen und iv) kinetische Modelle zur Prozessoptimierung leichter anwenden zu können. Dies erfordert jedoch eine entsprechende Enzymstabilität, welche für beide Enzyme gesteigert werden müsste. Durch Modifikationen der Proteinstruktur kann dies mittels *Protein Engineering* umgesetzt werden, was sich andere Arbeitsgruppen zur Aufgabe gesetzt haben und bereits erfolgreich umsetzen konnten (Bocola *et al.* 2005; Fraaije *et al.* 2005; Opperman und Reetz 2010; Schmidt *et al.* 2015b; Schmidt *et al.* 2015a; Torres Pazmino *et al.* 2009). Weiterhin steht durch die Änderung der Cofaktorpräferenz eine größere Auswahl an Enzymen zur Verfügung, die miteinander kombiniert werden können, da viele ADHs eine Präferenz für NADH haben und BVMOs vorwiegend NADPH-abhängig sind (Beier *et al.* 2016; Huang *et al.* 2017).

Die biotechnologische Synthese von ECL über eine mehrstufige Reaktionssequenz kann als Grundlage für den Einsatz weiterer Substrate und Enzyme dienen. Die Umsätze von substituierten, chiralen CHL- und CHN-Verbindungen sowie mehrgliedrige, aromatische Ringsysteme und aliphatische Ketone und Alkohole sind in der Literatur für ADHs und BVMOs umfangreich beschrieben worden (Balke *et al.* 2012; Bradshaw *et al.* 1992; Drauz *et al.* 2012; Hummel und Kula 1989; Leisch *et al.* 2011). Dadurch kann auf die Stereo- bzw. Enantioselektivität von Enzymen zurückgegriffen werden, was einen enormen Vorteil gegenüber der chemischen Katalyse bietet. Dies ermöglicht bspw. die Synthese von wertvollen chiralen Verbindungen für pharmazeutische

Wirkstoffe wie Steroide (Leisch *et al.* 2011), β -Aminosäuren oder β -Aminoalkohole (Balke *et al.* 2012).

9.2 Begasung

Zugunsten der Flexibilität des experimentellen Aufbaus und der damit verbundenen einfachen Handhabung und Reinigung, jedoch zulasten des Stoffübergangs, wurde ein Silikonschlauch für den Eintrag von Sauerstoff in das Reaktionsmedium eingesetzt. Der K_M -Wert der CHMO für Sauerstoff wurde auf ca. 0,01 mM abgeschätzt und konnte dadurch als kinetisch unabhängiger Parameter betrachtet werden. Es genügt daher, wenn Sauerstoff im messbaren einstelligen mM-Bereich vorhanden ist, damit die Reaktion nicht durch Sauerstoff limitiert wird. Auch in der Literatur konnte lediglich ein K_M -Wert mit $< 0,1$ mM als Orientierung angegeben werden (Donoghue *et al.* 1976; Ryerson *et al.* 1982). Aufgrund der zu überwindenden Diffusionsbarriere durch die Membran hat diese Art der Begasung eine geringere Begasungsleistung im Vergleich zum direkten Eintrag über die Gas-Flüssigkeit-Grenzfläche in porösen Membranen oder bei der Blasenbegasung. Durch die Begasung mit Sauerstoff, statt mit Luft, konnte mit dem angewendeten Begasungssystem max. 17,9 μmol Sauerstoff pro Minute eingetragen werden, wodurch eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von CHL festgelegt ist. Für ein Reaktionsvolumen von 50–60 ml bedeutet dies eine max. nutzbare Enzymaktivität von 0,36–0,30 U ml^{-1} . Eine höhere Enzymaktivität bzw. ein höherer Sauerstoffeintrag war nur noch durch einen höheren Druck im Begasungsmodul und einer zusätzlichen Oberflächenbegasung des Reaktionsvolumens zu gewährleisten. Die Erweiterung des Begasungsmoduls durch einen längeren Schlauch bei gleichem Reaktionsvolumen bietet allerdings nur noch wenig Spielraum, weil dadurch das Verhältnis des Volumens im Reaktor zum peripheren Volumen im Begasungskreislauf sinkt und der Reaktor damit von einem Rührkessel zu einem Strömungsrohr übergeht. Eine Steigerung des Sauerstoffeintrags wäre daher durch eine Vergrößerung des Verhältnisses von Membranfläche zum Schlauchvolumen möglich. Mit einer geringeren Wanddicke und einem geringeren Schlauchdurchmesser müsste der Schlauch jedoch in eine geordnete, geführte Geometrie gebracht werden, um nicht einzuknicken. Des Weiteren wären mehrere Kanäle vorteilhaft, um einen zu hohen Druckverlust über die Länge des Schlauches zu vermeiden. Durch die Anordnung des Schlauches in eine helikale Geometrie kann zudem eine verbesserte Durchmischung durch die Erzeugung von Sekundärströmungen erzielt werden (Kaufhold *et al.* 2012; Moulin *et al.* 1996). Die Anwendung poröser Membranen wäre allerdings erst zu empfehlen, wenn gereinigte oder immobilisierte Enzyme eingesetzt werden können, um Blockierungen durch ausgefallene Proteine oder Mikrobewachstum in den Poren zu vermeiden.

Für eine Vergrößerung des Maßstabs eignet sich eine dynamische Membranbegasung über einen Silikonschlauch, wie sie in Abb. 9-1 gezeigt ist (Frahm *et al.* 2007). Hierbei befindet sich das Gas innerhalb des Schlauches und das zu gasende Medium außerhalb. Die Silikonschläuche sind dabei entlang des Reaktors um die Rotorarme gewickelt. Eine Durchmischung wird durch die Oszillation der Membranträger um die eigene Achse und das Umströmen der Flüssigkeit erzielt. Dieses System wurde erfolgreich für die Sauerstoffversorgung empfindlicher Zelllinien in Maßstäben zwischen 12 und 200 l eingesetzt. Durch die Begasung innerhalb des Reaktors entfällt ein zusätzlicher Begasungskreislauf, womit weniger Scherkräfte durch die Pumpe auf die freien Enzyme

wirken und die Enzymaktivität voraussichtlich länger erhalten bleibt. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Verhältnis zwischen der Begasungsoberfläche und dem zu begasenden Volumen durch die Auslegung eines solchen Reaktors viel geringer sein kann im Vergleich zu einem separaten Begasungskreislauf. So ist bspw. für den 100 l-Maßstab eine volumenspezifische Stoffaustauschfläche von 68 m^{-1} erreicht worden, wohingegen für den separaten Begasungskreislauf im 60 ml-Maßstab in dieser Arbeit eine volumenspezifische Stoffaustauschfläche von 523 m^{-1} erzielt werden konnte. Des Weiteren ist aufgrund der pH-Kontrolle und der Zugabe von CHL als Substrat eine zusätzliche Durchmischung durch einen Rührer bspw. am Boden des Reaktors zu empfehlen, um Konzentrationsgradienten innerhalb des Reaktors zu vermeiden.

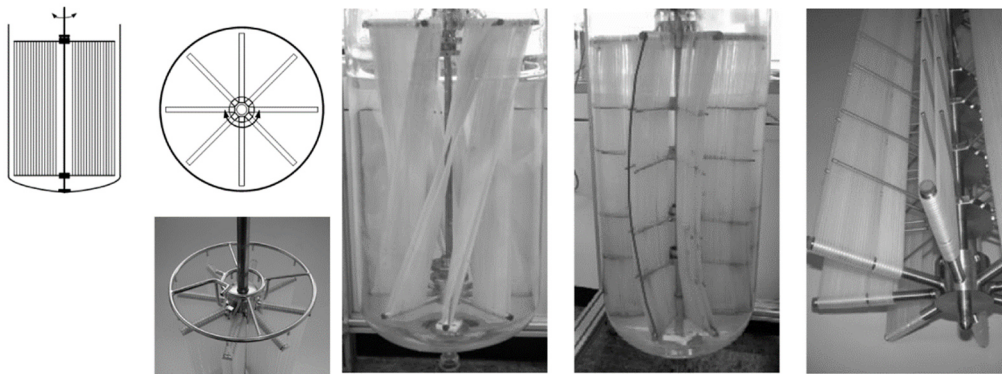


Abb. 9-1 Dynamische Membranbegasung zur Sauerstoffversorgung über Silikonschläuche, die um einen oszillierenden Rotor gewunden sind (Frahm *et al.* 2007).

9.3 Reaktorkonzept und experimentelle Umsetzung

Die Reaktionsführung wurde aufgrund der Enzymkinetik der CHMO ausgewählt. Zur Überwindung der Inhibierung der CHMO durch CHL, dem eingesetzten Substrat der Reaktionssequenz, ist daher das Zulaufverfahren etabliert worden. Dies konnte erfolgreich realisiert werden, indem CHL unverdünnt in das Reaktionsmedium geleitet wurde. In anderen Arbeiten, die sich ebenfalls mit der Synthese von ECL über die Kombination einer ADH mit einer BVMO innerhalb einer Reaktionssequenz beschäftigten, wurde CHL lediglich im Satzbetrieb umgesetzt oder für das Zulaufverfahren in Aceton gelöst (Schmidt *et al.* 2015b; Schmidt *et al.* 2015a; Wedde *et al.* 2017). Das Zuführen einer verdünnten Substratlösung führte jedoch zwangsläufig zu einer Verdünnung des gesamten Ansatzes und damit zu längeren Reaktionszeiten. Eine Zusammenfassung der einzelnen untersuchten Reaktorkonzepte Satzbetrieb und Zulaufverfahren ist in Tab. 9-1 dargestellt. Zur Bewertung wurden Parameter, wie die eingesetzte Menge an Cofaktor (NADP^+) und die eingesetzten Enzymaktivitäten (ADH, CHMO), verwendet. Der TON-Wert (engl.: *turnover number*) gibt an, wieviel mol Produkt pro mol Cofaktor in einem Versuch gebildet wurden. Für das Zulaufverfahren ist ein höherer Wert im Vergleich zum Satzbetrieb erzielt worden. Der Cofaktor konnte damit effektiver eingesetzt werden. Eine erhebliche Steigerung konnte durch den Einsatz der Lipase im Zulaufverfahren erreicht werden. Ähnlich wie für den Cofaktor wurde der Enzymverbrauch als eingesetzte Enzymaktivität pro gebildetem mmol Produkt erfasst. Auch hier war es möglich, eine effektivere Nutzung der Enzymaktivität durch einen geringeren Enzymverbrauch beim Zulaufver-

fahren im Vergleich zum Satzbetrieb zu erzielen. Natürlich würde eine höhere Substratkonzentration im Satzbetrieb eine verbesserte Nutzung des Cofaktors und der Enzymaktivitäten vorweisen. Unter Berücksichtigung der massiven Inhibierung der CHMO durch CHL und der damit verbundenen geringeren Reaktionsgeschwindigkeit sowie der Verlust von CHL wäre der Einsatz höherer Substratkonzentrationen nicht sinnvoll, was anhand von Simulationen verdeutlicht werden konnte.

Tab. 9-1 Vergleich der untersuchten Prozessmodi zur biotechnologischen Synthese von ECL bzw. 6-HHA.

Reaktor	Satzbetrieb (20 mM)	Zulaufverfahren ohne Lipase	Zulaufverfahren mit Lipase
NADP ⁺	0,01 mmol	0,02 mmol	0,02 mmol
CHMO, ADH	25 U, 28 U	50 U, 60 U	50 U, 55 U
Umsatz, Reaktionszeit	98 %, 1,4 h	97 %, 4,2 h	99 %, 20,3 h
analytische Ausbeute	85 %	81 %	100 %
TON (NADP ⁺)	85	125	770
Enzymverbrauch pro mmol Produkt	30 U CHMO 33 U ADH	21 U CHMO 25 U ADH	4 U CHMO 4 U ADH

Alternativ zu den Reaktorkonzepten in dieser Arbeit wurden Untersuchungen von Reimer *et al.* sowie von Bornadel *et al.* in einem zweiphasigen System durchgeführt. Dabei war durch die Zugabe von Isooktan (10 % (v/v)) ein beschleunigter Umsatz zu beobachten (Reimer *et al.* 2017). Die Zugabe von Dodekan zum gleichen Volumenanteil wie die wässrige Phase konnte als Substratreservoir genutzt werden und führte zu einer höheren Produktivität bei einem konvergenten Reaktionssystem, in dem CHN und 1,6-Hexandiol zu ECL umgesetzt wurden (Bornadel *et al.* 2015a, 2015b). Beide Ansätze sind im Maßstab von 1 bis 50 ml im Satzbetrieb mit Substratkonzentrationen zwischen 40 und 80 mM durchgeführt worden. Wedde *et al.* konnten ebenfalls eine organische Phase (Methylcyclohexan) in das Reaktionssystem integrieren, welche mittels einer Silikonmembran von der wässrigen Phase getrennt wurde, um eine *in situ*-Produktentfernung mit anschließender Polymerisation durchzuführen. Dadurch erfolgte sogar ein vollständiger Umsatz von 100 mM CHL. Diese Arbeiten zeigen, dass die Etablierung einer zweiten Phase mit bestimmten Lösungsmitteln für die *in situ*-Produktentfernung von ECL möglich ist. Im Vergleich zum Zulaufverfahren mit einer Lipase, wie es in dieser Arbeit vorgestellt wurde, waren die erreichten Produktkonzentrationen jedoch wesentlich geringer sowie der Maßstab, in dem die Reaktionen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind daher als Konzeptvorschläge zu berücksichtigen, die hinsichtlich einer weiteren Prozessentwicklung noch optimiert werden können.

Das Zulaufverfahren wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer immobilisierten Lipase experimentell im Rührkessel sowie in einem Festbett betrieben. Die Durchmischung im Rührkessel erfolgte bevorzugt mit einem über Kopf angebrachten Propellerrührer gegenüber einem Magnetrührer vorgezogen, um ein Zermahlen der Enzymträger durch den Magnetstab am Boden des Rührkessels zu vermeiden. Doch auch durch den Propellerrührer war nach einem Betrieb von ca. 20 h eine leichte Trübung durch zerkleinerte Enzymträger zu beobachten, die teilweise die Filtermemb-

ran vor dem Begasungskreislauf durch den Sog der Pumpe blockierten. Dadurch wurde die Sauerstoffversorgung des Rührkessels eingeschränkt, und die Filtermembran musste regelmäßig überprüft, gesäubert oder ggf. ausgetauscht werden. Durch das Einbringen der Lipase in ein Festbett blieben die Enzymträger unbeschadet, jedoch erforderte der Betrieb eines Festbetts einen hohen Volumenstrom, um den pH-Wert innerhalb des Festbetts konstant zu halten. Durch den Einsatz von ADH und CHMO in Form von bakteriellen, zellfreien Rohextrakten unter nicht sterilen Bedingungen trat ebenfalls eine Trübung, evtl. durch mikrobielles Wachstum, aber auch durch denaturierte Proteine, auf. Diese feinen Partikel sammelten sich im Festbett, das wie ein Filter wirkte und zu einem erhöhten Druck zwischen Pumpe und Festbett führte. Um eine bevorstehende Blockierung des Systems zu vermeiden, wäre für zukünftige Versuche ein weniger eng gepacktes Festbett mit immobilisierter Lipase vorzuschlagen, das aufgrund des Volumenstroms eine Durchmischung des gesamten Kompartiments zulässt. Dies könnte ggf. durch geeignete Füllkörper umgesetzt werden, die eine gleichmäßige Verteilung der Enzymträger bewirken. Dadurch ist das Festbett nicht auf die geringe Porengröße beschränkt, und ausgefallene Partikel könnten das Festbett einfacher passieren. Da aufgrund der externen Sauerstoffversorgung ein Begasungskreislauf erforderlich ist, wäre es vorteilhaft, solch ein Festbett zwischen dem Rührkessel und der Begasungseinheit zu integrieren. Innerhalb des Rührkessels könnte ein Festbett ebenso durch ein rotierendes Festbett umgesetzt werden, wie es bspw. von der Firma SpinChem® (Umeå, Schweden) hergestellt wird.

Die Blasensäule bietet im Hinblick auf die Begasung und die Durchmischung eines sauerstoffabhängigen Prozesses einen vorteilhaften Reaktortypen. Dieser und andere Reaktoren, die eine Begasung über die Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit vorsehen, ließen sich jedoch erst dann erfolgreich umsetzen, sofern die einzusetzenden Enzyme über eine entsprechende Stabilität an der Grenzfläche und gegenüber oxidativer Degradation verfügen.

9.4 Biokatalytische Polymerisation durch Veresterung

Polymerisationsreaktionen mittels Enzymkatalyse – speziell die Synthese von PCL – sind in Fachzeitschriften durch Artikel und Rezensionen umfangreich beschrieben worden und Bestandteil ganzer Lehrbücher, so dass die Biokatalyse gegenüber chemischen Verfahren industrielle Relevanz erreicht hat (Drauz *et al.* 2012; Gross *et al.* 2001; Kobayashi und Makino 2009; Labet und Thielemans 2009; Loos 2010). Die chemische Polymerisation von ECL durch Ringöffnung kann über eine enorm vielfältige Auswahl verschiedener chemischer Katalysatoren bewerkstelligt werden. Diese bestehen vorwiegend aus komplexen Organometallverbindungen, welche von Alkali-, Erdalkali- über Leicht- bis hin zu Übergangs-, seltenen Erdmetallen und anderen organischen Verbindungen reichen (Labet und Thielemans 2009). Für die Katalyse ist oftmals eine zusätzliche nucleophile Verbindung als Initiator erforderlich. Normalerweise wird hierfür ein kurzkettiger Alkohol verwendet. Als kommerziell erhältlicher und vielfach eingesetzter chemischer Katalysator wird Zinnbis(2-ethylhexanot) verwendet. Aufgrund des flüssigen Aggregatzustands, der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und des niedrigen Dampfdrucks ist diese Verbindung für derartige Reaktionen sehr gut geeignet. Bei biokatalytischen Veresterungsreaktionen bzw. Polymeri-

sationen wird üblicherweise eine auf einem festen Trägermaterial immobilisierte Lipase eingesetzt. Ein zusätzliches Initiator-molekül ist für die Biokatalyse nicht erforderlich. Im Unterschied zur homogenen chemischen Katalyse wird aufgrund des immobilisierten Enzyms eine heterogene Katalyse durchgeführt, bei der u. a. Diffusionsprozesse für den Reaktionsablauf entscheidend sein können. Allerdings kann dadurch der Katalysator am Ende der Reaktion sehr leicht mittels Filtration entfernt werden, wohingegen Rückstände des chemischen Katalysators nach der Aufarbeitung im Produkt enthalten sein können. Dies ist gerade dann entscheidend, wenn Polymere für medizinische Anwendungen eingesetzt werden sollen. Die Biokompatibilität bei der Verwendung von chemischen Katalysatoren wie Organozinnverbindungen ist dann nicht mehr gegeben, da diese als gesundheitsschädlich eingestuft sind*. Aufgrund der ansteigenden Viskosität während einer Polymerisationsreaktion wird bei der chemischen Katalyse sowie bei der Biokatalyse bevorzugt Toluol als Lösungsmittel eingesetzt. Zwar werden chemische Polymerisationen auch bei Temperaturen bis zu 130 °C für die lösungsmittelfreie Reaktion durchgeführt, aber auch bei Temperaturen zwischen 60 und 80 °C bei dem Einsatz von Toluol genau wie bei der Biokatalyse. Bei einer Temperatur von 150 °C konnte sogar ohne Katalysator die Bildung von PCL beobachtet werden (Braud *et al.* 1998).

Die chemische Polymerisation wurde von der Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, Deutschland) im Rahmen einer Kooperation für diese Arbeit durchgeführt. Die Produkte der chemischen und biokatalytischen Polymerisationen von ECL wurden hinsichtlich ihres Molekulargewichts untersucht. Abb. 9-2 zeigt die beiden überlagerten Chromatogramme der beiden Polymere. Beide weisen einen ähnlichen Verlauf und damit eine vergleichbare Molekulargewichtsverteilung auf. Anhand von polymerspezifischen Kennzahlen wie M_n , M_w und dem PDI, welcher durch den Quotienten aus M_w und M_n ermittelt wird, kann dies in Tab. 9-2 genauer betrachtet werden.

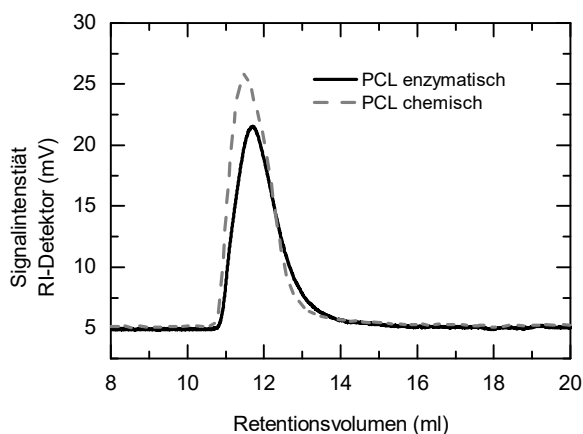


Abb. 9-2 Vergleich der Molekulargewichtsverteilung zwischen chemisch und enzymatisch hergestelltem PCL aus ECL anhand der Chromatogramme, die mittels GPC erstellt wurden.

* gemäß GESTIS-Stoffdatenbank für Zinnbis(2-ethylhexanoat)

Tab. 9-2 Molmassen von chemisch und biokatalytisch hergestelltem PCL.

	M_n (g mol ⁻¹)	M_w (g mol ⁻¹)	PDI
chemisch hergestelltes PCL	21000	35000	1,7
biokatalytisch hergestelltes PCL	16700	28700	1,7

Mit der chemischen Synthese konnten etwas höhere Molekulargewichte erzielt werden, wobei die gleiche Molmassenverteilung (PDI = 1,7) erreicht wurde. In der Literatur wurden mit dem gleichen Katalysator für die chemische Synthese auch höhere Molmassen um 70000 g mol⁻¹ (M_n) und mit einem niedrigeren PDI (~ 1,3) erzielt (Labet und Thielemans 2009). Für die biokatalytische Synthese sind Literaturwerte für Molmassen um 50000 g mol⁻¹ (M_w) (Poojari *et al.* 2013) und 44800 g mol⁻¹ (M_n) (Kumar und Gross 2000) mit einem PDI zwischen 1,4 und 1,7 vorzufinden. Der Vergleich von chemisch und biokatalytisch hergestelltem Polymer ist nicht so einfach anhand von absoluten Literaturdaten anzustellen, da auch die Analytik zur Bestimmung der Molmassen und deren Verteilung systemabhängig ist. Vorwiegend ist zu erkennen, dass mittels chemischer Katalyse höhere Molmassen erreicht werden können, allerdings wäre ein direkter Vergleich verschiedener Methoden und Polymere über die gleiche Analytik zu empfehlen. Neben den polymer-spezifischen Kennzahlen wäre letztendlich eine Materialprüfung erforderlich, die den Ansprüchen der jeweiligen Anwendung genügt. Gegenüber der Veresterung bzw. der Polykondensation von 6-HHA entsteht bei der ROP des Lactons kein Wasser, das der Reaktion entzogen werden muss, um hochmolekulares Polymer zu erhalten. Das entstandene Wasser wird der Reaktion i. d. R. über eine Vakuumpumpe abgeführt. Dabei wird ebenfalls ein Teil des Lösungsmittels (Toluol) entfernt, wodurch die Viskosität des Reaktionsansatzes ansteigt. Um den Verlust des Lösungsmittels zu vermeiden, wäre der Einsatz einer ionischen Flüssigkeit (IL, engl.: *ionic liquids*) vorteilhaft. Zur biokatalytischen Polymerisation von ECL und anderen Kondensationsreaktionen in verschiedenen ILs wurden bereits einige Ergebnisse veröffentlicht, die in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden könnten (Gorke *et al.* 2010; Kragl *et al.* 2002; Madeira Lau *et al.* 2000; Marcilla *et al.* 2006; Moniruzzaman *et al.* 2010).

9.5 Fazit

Die biotechnologische Herstellung von ECL und die weiterführende Polymerisation über ein mehrstufiges, biokatalytisches Reaktionssystem konnte im Rahmen der Prozessentwicklung erfolgreich umgesetzt werden, wodurch das Potential der Biokatalyse in der organischen Synthese umfassend dargestellt werden konnte. Aufgrund detaillierter Kenntnisse über die Enzymkinetik wurde das Zulaufverfahren als zielführendes Reaktorkonzept herausgearbeitet, wodurch höhere Produktkonzentrationen erzielt werden konnten im Vergleich zu Reaktionen im Satzbetrieb und den bisherigen Literaturdaten. Eine weitere Steigerung der Produktkonzentration wurde durch die Etablierung einer dreistufigen Reaktionssequenz ermöglicht, wodurch die Hydrolyse von ECL zu 6-HHA mittels einer Lipase durchgeführt wurde. Der Sauerstoffeintrag ist über eine Membranbegasung mit einem Silikonschlauch realisiert worden, was im Vergleich zur Blasenbegasung zu einer höheren Enzymstabilität führte. Obwohl eine Steigerung der Produktkonzentration im Vergleich zu den bisher veröffentlichten Untersuchungen zu erreichen war, ist das System gegenüber

der industriellen Herstellung von ECL über die chemische BV-Oxidation noch nicht konkurrenzfähig. Hierfür ist die geringe Stabilität der löslichen Enzyme, insbesondere der verwendeten BVMO, entscheidend sowie die Membranbegasung, die für eine Maßstabserweiterung noch Optimierungspotential bietet. Hinsichtlich der analytischen Ausbeute ist jedoch die enzymatische Reaktion aufgrund der Selektivität im Vorteil gegenüber der chemischen Reaktion. Die Untersuchungen zur biokatalytischen Polymerisation von ECL oder die Polykondensation von 6-HHA haben auf Grundlage der Ergebnisse in dieser Arbeit und der profunden Fachliteratur überzeugende Werte geliefert, die Alternativen zu den chemischen Katalysatoren darstellen. Weitere Herausforderungen bestehen darin, die Sauerstoffversorgung in größerem Maßstab zu verwirklichen sowie die Immobilisierung der Enzyme zur Steigerung der Enzymstabilität und Verwertung der Katalysatoren. Diese Optimierungsansätze tragen maßgeblich zur Erhöhung der Produktivität bei.

10 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Prozessentwicklung einer biokatalytischen Reaktionssequenz für die biotechnologische Synthese von ECL. Diese basiert auf einem zweistufigen Oxidationsprozess von CHL, das zuerst mittels einer ADH zu CHN oxidiert und anschließend mittels einer BVMO unter dem Verbrauch von Sauerstoff zu ECL umgesetzt wird. Innerhalb dieser beiden aufeinanderfolgenden Reaktionen wird der für beide Schritte erforderliche Nikotinamid-Cofaktor regeneriert. Die Ergebnisse dazu umfassen vier ineinandergreifende Teile:

- Festlegung der Reaktionsbedingungen und Bestimmung der Enzymkinetik der eingesetzten Biokatalysatoren ADH und BVMO
- Entwicklung eines Membranmoduls für die Begasung über einen Silikonschlauch zur Sauerstoffversorgung und Aufrechterhaltung der Enzymstabilität
- Durchführung der biokatalytischen Reaktionssequenz im Satzbetrieb und im Zulaufverfahren im Rahmen der Prozessentwicklung sowie die Erstellung eines kinetischen Modells zur Charakterisierung beider Reaktorkonzepte
- Erweiterung der Reaktionssequenz zur Vermeidung der Produktinhibierung mit anschließender Polymerisation mittels einer Lipase

Zu Beginn wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die ADH und die BVMO festgelegt. Dazu sind die Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Puffern im pH-Bereich zwischen pH 6,5 und 9 sowie die Enzymstabilitäten bei Temperaturen zwischen 25 und 40 °C untersucht worden. Weitere Untersuchungen wurden schließlich in NaPP mit pH 8 bei 25 °C durchgeführt. Aufgrund der mäßigen Wasserlöslichkeit von CHL war eine gründliche Durchmischung erforderlich, womit die Substratzugabe zunächst über eine wässrige Substratlösung erfolgte. Unter den festgelegten Reaktionsbedingungen wurde die MM-Kinetik jeweils für die ADH und die BVMO untersucht, um kinetische Konstanten zu ermitteln. Dabei ist aufgrund des gleichzeitigen Umsatzes des Cofaktors eine MM-Kinetik für zwei Substrate berücksichtigt worden. Bezüglich der ADH wurde dies für die Oxidation von CHL zu CHN sowie im Hinblick auf die Reduktion von CHN zu CHL vorgenommen, um Hin- und Rückreaktion des ersten reversiblen Oxidationsschrittes darzustellen. Bei der BVMO mussten zusätzlich die Substratinhibierung durch CHN und Inhibierungen seitens CHL und ECL berücksichtigt werden. Da der exakte Inhibierungstyp der letzteren Verbindungen nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden zunächst zwei Typen (kompetitiv und unkompetitiv) angenommen, auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen wurde.

Um der Reaktion ausreichend Sauerstoff zur Verfügung zu stellen, wurde eine Membranbegasung etabliert. Im Vergleich zur Blasenbegasung konnte dadurch die Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben und eine Schaumbildung vermieden werden. Die Membranbegasung

erfolgte über einen Silikonschlauch ($d_{\text{innen}} = 2 \text{ mm}$, $d_{\text{außen}} = 3 \text{ mm}$), durch den das Reaktionsmedium gefördert wurde und der Sauerstoff entlang des Konzentrationsgradienten von außen nach innen diffundierte. Für den Silikonschlauch wurde ein Stoffübergangskoeffizient $k_{L,app}$ mit $0,046 \text{ cm min}^{-1}$ bestimmt. Für die Begasung sind 5 m Schlauch in einer 0,5 l-Flasche eingesetzt worden. Durch die Begasung mit Sauerstoff war daher bei 1013 hPa und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ max. ein Sauerstoffeintrag von $17,9 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$ möglich. Dies konnte durch die Erhöhung des gaseitigen Drucks und durch eine zusätzliche Oberflächenbegasung gesteigert werden. Über einen Begasungskreislauf mittels einer Pumpe wurde die Begasungseinheit in den experimentellen Aufbau integriert und die Sauerstoffkonzentration mittels einer optischen Sauerstoffsonde überwacht.

Anhand der ermittelten kinetischen Daten ließ sich ein kinetisches Modell für die zweistufige Reaktion erstellen. Der experimentelle Reaktionsverlauf im Satzbetrieb konnte dadurch mit einer Übereinstimmung von 93 % für CHL und 97 % für ECL durch die berechneten Werte wiedergegeben und charakterisiert werden. Von den zuvor angenommenen Inhibierungstypen der BVMO wurde anhand der Übereinstimmung der experimentellen und der berechneten Werte der unkompetitive Typ für weitere Berechnungen verwendet. Aufgrund der starken Inhibierung der BVMO durch CHL ist das Zulaufverfahren für das Reaktionssystem etabliert worden. Mittels einer Spritzenpumpe und einer feinen Kapillare wurde CHL der Reaktion kontinuierlich und unverdünnt so zugeführt, dass die Konzentration an CHL stets niedrig gehalten wurde, wodurch die Inhibierung der BVMO weitestgehend vermieden werden konnte. Im Vergleich zum Satzbetrieb verringerte sich dadurch der Enzymverbrauch pro mmol Produkt (ECL) bis zu 30 % und der TON-Wert konnte für den Cofaktor von 85 auf 125 gesteigert werden.

Die Inhibierung der BVMO durch ECL, die sich etwa ab einer Konzentration von 100 mM signifikant auf die Enzymaktivität der BVMO auswirkte, erforderte eine *in situ* Produktentfernung. Aufgrund der geringen Stabilität von ADH und BVMO gegenüber organischen Lösungsmitteln, war die Entfernung über ein Extraktionsverfahren nicht möglich. Daher wurde die Reaktionssequenz um einen weiteren Schritt ergänzt, in dem ECL zur korrespondierenden Hydroxysäure (6-HHA) mittels einer immobilisierten Lipase hydrolysiert wurde. Die Bildung von Oligomeren im wässrigen Reaktionsansatz konnte dabei nicht festgestellt werden. Zusätzlich wurde das kinetische Modell anhand von experimentell ermittelten kinetischen Konstanten der Lipase erweitert, wodurch ebenfalls das dreistufige Reaktionssystem in Übereinstimmung der berechneten Daten mit den experimentellen Werten beschrieben werden konnte. Die Lipase ist dabei direkt im Rührkessel oder in Form eines Festbettreaktors in das System integriert worden. Mittels Autotitration wurde der pH konstant gehalten, um die gebildete Säure zu neutralisieren. Hierdurch war eine Steigerung der Produktkonzentration bis zu 291 mM 6-HHA möglich, womit der Enzymverbrauch im Vergleich zum Zulaufverfahren ohne Lipase um weitere 81 % verringert und für den Cofaktor ein TON-Wert bis zu 770 erreicht werden konnte.

Neben der biokatalytischen Polymerisation von ECL wurde ebenfalls die Polymerisation von 6-HHA dargestellt, wobei Molmassen zwischen 24000 und 63400 g mol^{-1} (M_w) erreicht werden konnten. Der Vergleich von chemisch und biokatalytisch hergestelltem Polymer aus ECL hat gezeigt, dass ähnliche Molmassen erreicht wurden.

11 Materialien und Methoden

11.1 Materialien

11.1.1 Chemikalien

Tab. 11-1 Liste der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
ϵ -Caprolacton	99 %	Acros Organics (Geel, Belgien)
Ampicillin	99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Cyclohexanol	99 %	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Cyclohexanon	≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	$\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hefeextrakt	-	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycinsulfat	-	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Laurinsäure	98 %	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
LB-Medium, Luria / Miller	-	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
NADP-Dinatriumsalz	≥ 97 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
NADPH-Tetranatriumsalz	≥ 97 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
Natriumhydroxid	≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tetrahydrofuran stabilisiert	-	BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland)
Trichlormethan / Chloroform	≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

11.1.2 Enzyme

Alkohol-Dehydrogenase und Cyclohexanon-Monooxygenase

ADH und CHMO wurden separat in Form eines bakteriellen, zellfreien Rohextrakts (*E. coli* BL21 (DE3)) eingesetzt. Dieser Rohextrakt wurde je nach Verfügbarkeit erneut hergestellt.

Lipasen

Tab. 11-2 Liste der verwendeten Lipasen.

Enzym	Bezeichnung	Hersteller	Aktivität (Hersteller)	PLU/g	CLU/g
Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>	CalA Iyo	c-LEcta GmbH (Leipzig, Deutschland)	34 TBU/g	-	11
Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>	Lipase A Candida antarctica immobilized on Immobead 150, recombinant from <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	≥ 500 TBU/g	21	2
Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	Fermase CALB 10000-K15 (kovalent)	Fermenta Biotech Limited (Maharashtra, Indien)	9200 PLU/g	3626	435
Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	CalB immo (adsorptiv)	c-LEcta GmbH (Leipzig, Deutschland)	-	3707	-

CLU: 1 Caprolacton Unit definiert die Hydrolyse von 1 µmol ECL pro Minute

PLU: 1 Propyllaurat Unit definiert die Veresterung von 1 µmol Laurinsäure und 1 µmol Propanol pro Minute

TBU: 1 Tributyrin Unit definiert die Bildung von 1 µmol Butansäure pro Minute aus der Hydrolyse von Tributyrin

11.1.3 Geräte

Tab. 11-3 Liste der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
GC	Agilent 7890B	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
GPC / SEC	LC-20AT (Pumpe)	Shimadzu Scientific Instruments (Kyoto, Japan)
	Smartline Autosampler 3900	Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin, Deutschland)
	GMHHR-L Mixed Bed (Säule 1)	Viscotek (Houston, Texas, USA)
	PLgel 3 µm Mixed-E (Säule 2)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA)
HPLC	WellChrom K-2301 Refraktionsindexdetektor	Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin, Deutschland)
	Agilent 1100	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Sauerstoffsensor	Fibox 3 LCD trace	Presens - Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland)
Schlauchpumpe	Ismatec IPC 4	Cole-Parmer GmbH (Wertheim, Deutschland)
Spritzenpumpe	Aladdin 1000	World Precision Instruments Ltd (Sarasota, USA)
Titration	848 Titrino Plus	Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG (Filderstadt, Deutschland)
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 2070 mit Sonotrode Typ KE 76	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
UV / Vis Spektralphotometer	Uvikon XL	Goebel Instrumentelle Analytik GmbH (Hallertau, Germany)

11.2 Methoden

11.2.1 Mikrobiologische und biochemische Methoden

Stammhaltung

Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin oder $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zusätzlich wurde jeweils ein Glycerol-Stock bei -20 sowie $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ verwahrt. Hierfür ist ein Teil einer Übernachtskultur 1:1 mit Glycerol vermischt worden.

Herstellung einer Übernachtskultur

Zum Ansetzen einer Übernachtskultur wurden 20 ml LB-Medium im 100 ml-Schikanekolben mit Antibiotikum versetzt ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin oder $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin) und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Der Ansatz ist dann über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt worden.

*Kultivierung von *E. coli* und Enzymherstellung*

Für die Kultivierung von rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurden 400 ml TB-Medium in einen 2 l-Schikanekolben gegeben und mit Antibiotikum versetzt ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin oder $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin). Anschließend ist das Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt worden bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,8–1,0. Die Genexpression wurde mit ca. 0,1 mM IPTG induziert und der Ansatz für 20–24 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation ($4424 \times g$) für 10 min. Das überstehende Medium wurde verworfen und das Zellpellet in max. 50 ml NaPP (100 mM, pH 7,2) resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert ($2370 \times g$) und der wässrige Überstand verworfen. Das gewaschene Zellpellet wurde dann bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren oder für den Zellaufschluss bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. auf Eis bereitgehalten.

Zellaufschluss und Rohextrakt

Das aus der Fermentation gewonnene Zellpellet wurde in ca. 10 ml NaPP (100 mM, 50 mM NaCl, pH 7,2) in demselben Gefäß resuspendiert. Der Zellaufschluss ist mittels Ultraschall-Homogenisator auf Eis für 3 min (50 % Cycle, 70 % Power) durchgeführt und 1–2 mal wiederholt worden. Zwischen den Wiederholungen wurde der Ansatz auf Eis für 5–10 min gekühlt.

Anschließend wurde der gesamte Ansatz in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit für 30–40 min zentrifugiert ($75600 \times g$), um Zellbestandteile sowie übrige Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und für Versuche verwendet. Der Rohextrakt wurde stets auf Eis bzw. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Mit der Zeit beobachtete Trübungen des Rohextrakts konnten mittels Zentrifugation abgetrennt werden. Diese Trübungen sind womöglich auf mikrobielles Wachstum und ausgefallene Proteine zurückzuführen.

Aktivitätstest ADH und CHMO (Referenzaktivität, a_{ref})

Vor jedem Einsatz des Rohextrakts wurde die Enzymaktivität bestimmt. Hierzu wurde eine 20–100-fache Verdünnung des Rohextrakts zu 1 ml mit NaPP (100 mM, pH 8) und eine frische 1 %ige (v/v) wässrige Substratlösung (Cyclohexanol bzw. Cyclohexanon) zu 1 ml vorbereitet. Die Aktivitätsmessung wurde mit einem Spektralphotometer durchgeführt und die Reaktion fand in einer Küvette statt. Dabei wurde die Bildung bzw. der Verbrauch von NADPH bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) für 1 min aufgezeichnet. Die Enzymverdünnung richtete sich nach der Aktivität des Enzyms und wurde so gewählt, dass die gemessenen Werte einer linearen Funktion zugeordnet werden konnten. Das Reaktionsvolumen in der Küvette betrug 1 ml und setzte sich wie folgt zusammen:

ADH: NaPP (100 mM, pH 8), 0,6 mM NADP⁺, 0,01 % (v/v) (96 mM) Cyclohexanol, 50 μl verdünnter Rohextrakt

CHMO: NaPP (100 mM, pH 8), 0,2 mM NADPH, 0,01 % (v/v) (97 mM) Cyclohexanon, 50 μl verdünnter Rohextrakt

Die Reaktionstemperatur betrug 25 °C und der Puffer wurde vor der Messung auf 25 °C temperiert. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde aus der Steigung des Reaktionsverlaufs die Enzymaktivität (U ml^{-1}) des Rohextrakts ermittelt, wobei 1 U definiert ist als die Bildung bzw. der Verbrauch von 1 μmol NADPH pro Minute:

$$a_{ref} = \frac{\Delta \text{Abs.} \cdot 20 \cdot \text{Dil.}}{\epsilon_{\text{NADPH}} \cdot d} \quad (11-1)$$

a_{ref} : Enzymaktivität Rohextrakt (U ml^{-1}), $\Delta \text{Abs.}$: Änderung der Absorption (min^{-1}), Dil.: Verdünnungsfaktor der Vorverdünnung, ϵ_{NADPH} : molarer Extinktionskoeffizient von NADPH ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d: Schichtdicke Küvette (cm)

Bestimmung der Cofaktorkonzentration einer Stammlösung

Es wurden Stammlösungen von NADP⁺ und NADPH zu 20–25 mM und 1 ml in NaPP (100 mM, pH 8) angesetzt. Die Stammlösungen sind mehrfach verwendet und bei -20 °C gelagert worden. Vor jeder Nutzung einer Stammlösung wurde die aktuelle Konzentration bestimmt. Dies war erforderlich, da insbesondere die Konzentration von NADPH mit jeder Wiederverwendung sank.

Zur Bestimmung der NADPH-Konzentration wurde die Absorption einer 1:100-Verdünnung bei 340 nm ermittelt und gemäß der Gleichung (11-2) die Konzentration berechnet:

$$c = \frac{\text{Abs.} \cdot 100}{\epsilon_{\text{NADPH}}} \quad (11-2)$$

c: Konzentration (mM), Abs.: Absorptionswert, ϵ_{NADPH} : molarer Extinktionskoeffizient von NADPH ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Um die Konzentration einer NADP^+ -Stammlösung zu ermitteln, musste NADP^+ vollständig zu NADPH umgesetzt werden. Dies konnte mit dem Einsatz einer Glukose-Dehydrogenase (GDH) realisiert werden (Abb. 11-1). Für den Umsatz wurden 10 mM Glukose, 0,25 mg ml^{-1} GDH und 10 μl einer NADP^+ -Stammlösung in 1 ml NaPP (100 mM, pH 8) vermischt und der Reaktionsverlauf photometrisch bei 340 nm verfolgt, bis keine Änderung der Absorption mehr zu beobachten war. Durch den Überschuss an Glukose wurde ein vollständiger Umsatz von NADP^+ angenommen. Der maximale Absorptionswert ist zur Berechnung der NADP^+ -Konzentration herangezogen worden.

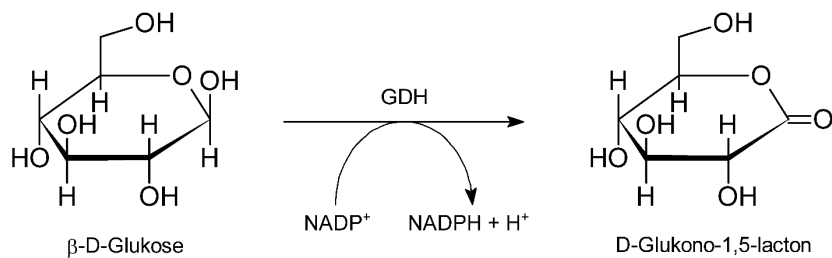


Abb. 11-1 Umsatz von β -D-Glukose zu D-Glukono-1,5-lacton katalysiert durch eine GDH.

11.2.2 Analytische Methoden

Gaschromatografie (GC)

Die Konzentrationen von CHL, CHN und ECL in einer wässrigen Lösung wurden mittels Extraktion und GC bestimmt. Dazu wurden 200 μl einer wässrigen Probe oder verdünnter Stammlösung mit 10 μl einer Acetophenon-Lösung (interner Standard, 23,8 mg ml^{-1} in DMSO) in einem Reaktionsgefäß vermischt und 300 μl Chloroform hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß ist dann für 1 min gründlich geschüttelt und die Phasen mittels Zentrifugation getrennt worden. 200 μl der Chloroform-Phase wurden in ein GC-Fläschchen mit Mikroinsert überführt und analysiert.

Zur Kalibrierung wurden jeweils ca. 200 mg der Analyten zusammen in einen 10 ml-Messkolben gegeben und in Wasser gelöst. Die exakt eingewogenen Mengen wurden notiert. Von dieser Stammlösung wurden Verdünnungen um den Faktor 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 angefertigt und für die Erstellung einer Eichgerade mit internem Standard verwendet.

Säule: CP-Chirasil-Dex CB, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Methode: 3 min 150 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ bis 167 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ bis 190 $^{\circ}\text{C}$, 1,4 min 190 $^{\circ}\text{C}$, H_2 als Trägergas, 0,2 ml min^{-1} Gasflussrate

Retentionszeiten: CHN 3,5 min, CHL 3,8 min, Acetophenon 4,2 min, ECL 5,2 min

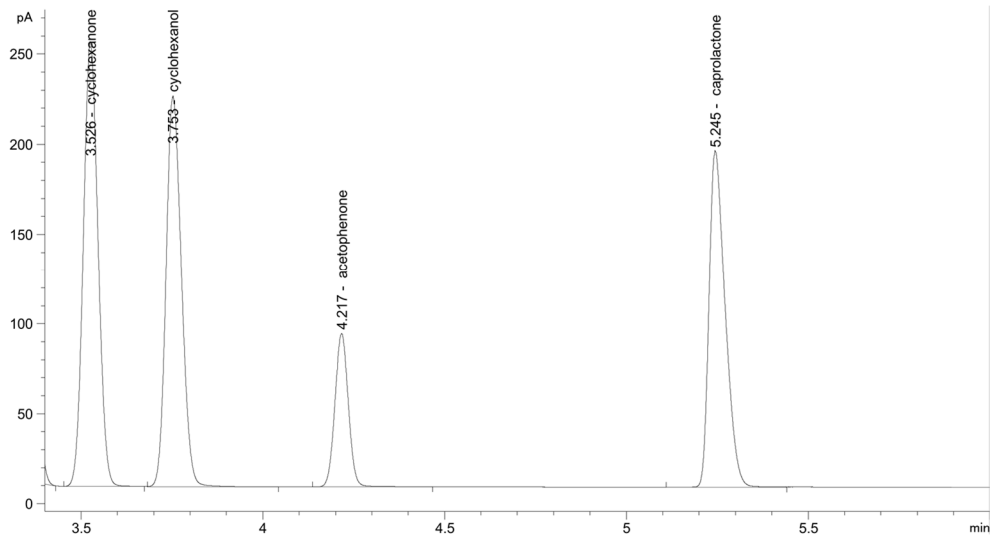


Abb. 11-2 Chromatogramm (GC).

Kalibrationskurven:

Compound: **caprolactone**

Signal: FID1B

Exp. RT: 5.184

Corr. Coeff.: 0.999933

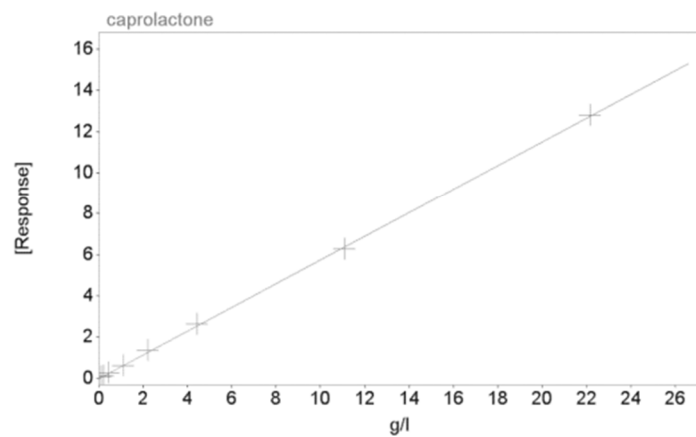
Residual: 0.06382

RF RSD%:

Formula: $y = ax + b$

a: 0.57551

b: 0.00000



Compound: **cyclohexanol**

Signal: FID1B

Exp. RT: 3.720

Corr. Coeff.: 0.999926

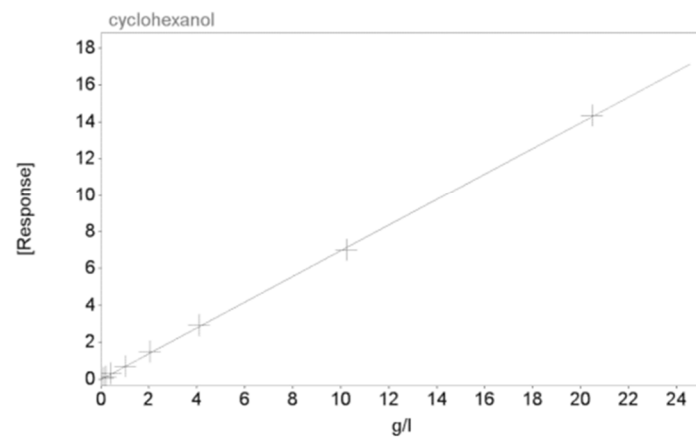
Residual: 0.07501

RF RSD%:

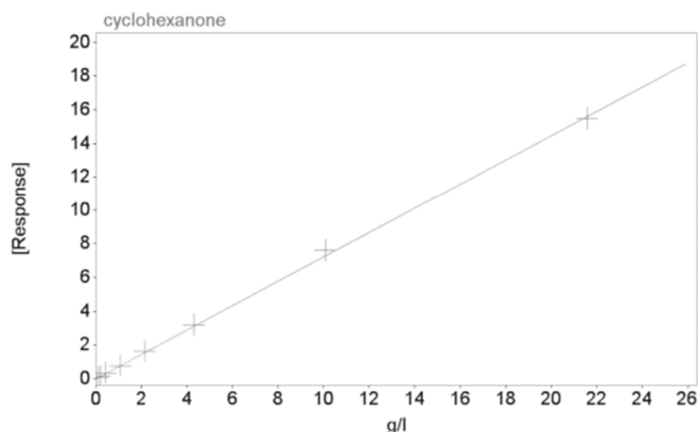
Formula: $y = ax + b$

a: 0.69735

b: 0.00000



Compound: **cyclohexanone**
Signal: FID1B
Exp. RT: 3.506
Corr. Coeff.: 0.999810
Residual: 0.12967
RF RSD%:
Formula: $y = ax + b$
a: 0.72329
b: 0.00000



Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

HPLC wurde verwendet, um 6-HHA und ECL in wässrigen Lösungen zu trennen und zu detektieren. Die zu analysierende Probe wurde mit Acetonitril / Wasser (1:1) so verdünnt, dass sich die zu erwartende Konzentration innerhalb die Kalibrierung befand. Zur Trennung der Komponenten wurde Methanol / Wasser im Verhältnis 1:1 als Eluent mit 1 ml min^{-1} Volumenstrom eingesetzt. Mittels UV-Detektor bei 217 nm konnten beide Komponenten detektiert werden.

Zur Kalibrierung von ECL wurden ca. 200 mg in einen 10 ml-Messkolben gegeben und in Wasser gelöst. Die exakt eingewogene Menge wurde notiert. Von dieser Stammlösung wurden Verdünnungen um den Faktor 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 in HPLC-Fläschchen zu 1 ml angefertigt und für die Erstellung einer Eichgerade mit internem Standard verwendet.

Nach der Kalibrierung von ECL konnte eine Kalibrierung für 6-HHA (als Produkt der Hydrolyse) vorgenommen werden. Hierzu wurden ca. 10–20 mg immobilisierte Lipase (CALB, Fermenta Biotech Ltd.) mit $1470 \mu\text{l}$ NaPP (100 mM, pH 7) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurden $30 \mu\text{l}$ ECL zugegeben und bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Während der Hydrolyse von ECL zu 6-HHA wurden in bestimmten Zeitabständen $50 \mu\text{l}$ entnommen und mit $950 \mu\text{l}$ Acetonitril / Wasser (1:1) in einem HPLC-Fläschchen verdünnt und analysiert. Die Kalibrierung für 6-HHA ist dann aus der Änderung der Konzentration von ECL berechnet worden.

Säule: LiChrospher 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$) LiChroCART 250-4

Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$

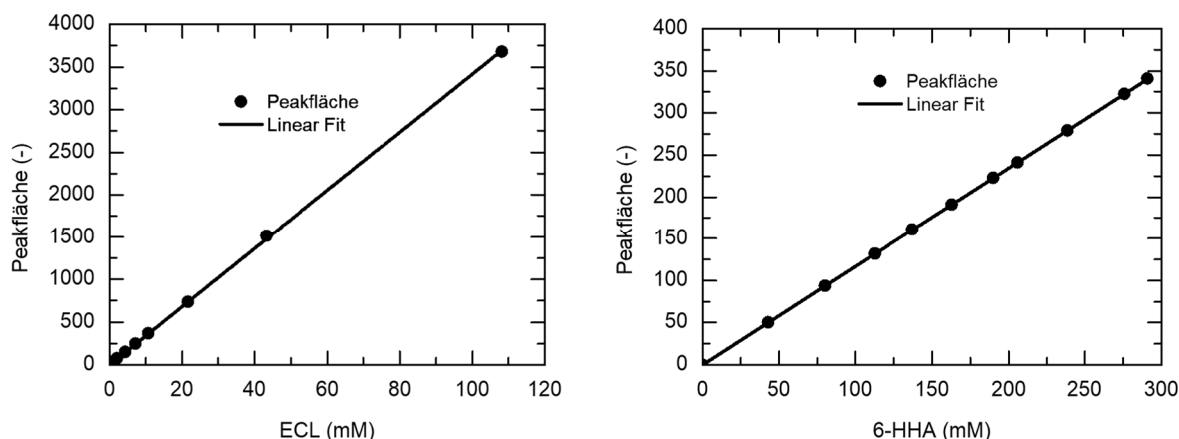


Abb. 11-3 Kalibrationskurven HPLC.

Gelpermeationschromatografie (GPC / SEC)

Es wurden 5–20 mg Probe bzw. Polymer(standard) in 997 μl THF und 3 μl Toluol (Laufmarker) gelöst. Mit einer 1 ml-Spritze und einer feinen Kanüle wurde das gesamte Volumen aufgenommen und durch einen Nylonfilter (0,2 μm) in ein 1,5 ml-Glasfläschchen überführt. Für die Trennung wurde THF als Laufmittel mit einem Volumenstrom von 1 ml min^{-1} eingesetzt. Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte anhand einer Eichkurve durch die Software *OmniSEC* (Version 4.6.1), welche zuvor mit Polymerstandards aus Polystyrol (M_p 66,000; 28,000; 12,600; 9,130; 6,100; 4,920; 3,470; 2,280; 1,250, 162 g/mol) (PSS Polymer Standards Service GmbH, Germany) für die Methode erstellt wurde.

Säulen: siehe Tab. 11-3

Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und des $k_L a$ -Werts

Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs wurde entweder direkt im Reaktionsgefäß oder über eine Durchflusszelle mit einem nicht-invasiven Sauerstoffsensoren ermittelt.

Zur Bestimmung des $k_L a$ -Werts wurde die Sauerstoffkonzentration direkt im Gefäß gemessen. Dazu wurden 30 ml Wasser in ein Schnappdeckelglas gefüllt und mit einem Magnetrührer bei 600 rpm gerührt. Das Glas wurde mit Parafilm mehrfach verdeckt. Der Temperaturfühler der Sauerstoffsonde sowie Kanülen zur Begasung wurden durch den Parafilm gestochen und so in das Gefäß eingebracht. Die $k_L a$ -Wert-Bestimmung wurde anhand der dynamischen Methode durchgeführt, indem der gelöste Sauerstoff zunächst durch die Begasung mit Stickstoff ausgetragen und die Zunahme der Sauerstoffkonzentration nach Beendigung der Stickstoffbegasung zur Auswertung herangezogen wurde. Für die Membranbegasung wurde das Wasser mit einer mehrkanaligen Schlauchpumpe durch ein Stück des zu untersuchenden Schlauches zurück in das Gefäß gefördert.

11.2.3 Biokatalyse

Reaktion im Satzbetrieb

Das Reaktionsgefäß war i. d. R. ein konisch geformter, temperierter Rührkessel (75 ml), passend zum Titrator (848 Titrino Plus). Zuerst wurde mit einer Glaspipette Puffer vorgelegt und anschließend NADP^+ und MgCl_2 zugegeben. Zur Durchmischung diente ein Magnetrührer, sofern kein immobilisiertes Enzym eingesetzt wurde. Andernfalls wurde ein Propellerrührer eingesetzt, um ein Zerreiben der Enzymträger zu vermeiden. Immobilisiertes Enzym wurde von Beginn an zugegeben, um die Enzymträger hinreichend zu benetzen. Dann wurde die Schlauchpumpe angestellt, um die Durchflusszelle der Sauerstoffsonde und die Begasungseinheit in das Reaktionssystem zu integrieren. Bei immobilisiertem Enzym wurde eine Filtermembran aus Nylon (200 μm , Reichelt Chemie Technik GmbH + Co, Heidelberg, Deutschland) am Schlaucheingang angebracht, um Blockierungen zu vermeiden. Je nach Volumenstrom wurden ein, zwei oder vier gleiche Schläuche parallel miteinander verbunden und entsprechend die Kanäle der Pumpe belegt. Des Weiteren wurden die pH-Elektrode und die Thermometer der Titrationseinheit sowie der Sauerstoffsonde in die Reaktionslösung eingetaucht. ADH und CHMO wurden zusammen in einem separaten Gefäß gemischt und schließlich mit einer Pasteurpipette möglichst blasenfrei in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Titration und die Sauerstoffmessung wurden gestartet und der pH auf den eingestellten Wert automatisch eingestellt bzw. korrigiert. Zum Start der Reaktion wurde eine definierte Menge der Substratlösung (CHL in Wasser) ebenfalls mit einer Pasteurpipette in das Reaktionsgefäß gegeben. Dabei wurde die bereits verstrichene Zeit bei der Titration sowie bei der Sauerstoffmessung notiert, damit beide Datensätze später miteinander abgeglichen werden konnten.

Reaktion im Zulaufverfahren

Die Versuche im Zulaufverfahren wurden in gleicher Weise vorbereitet wie für den Satzbetrieb, mit dem Unterschied, dass das Substrat nicht komplett von Beginn an zugegeben wurde, sondern langsam durch eine weitere Pumpe dem Reaktionsgemisch mit einem definierten Volumenstrom kontinuierlich zugeführt wurde. Hierfür wurde CHL mit einer stabilen Spritze aus Glas aufgezogen und die Spritze in eine Spritzenpumpe eingespannt. Da CHL einen Schmelzpunkt im Bereich der Raumtemperatur hat, musste die Spritze sowie der Zulauf zum Reaktionsgefäß beheizt werden. Dazu wurde ein dünner Silikonschlauch auf bzw. um die Spritze gelegt. Anfang und Ende des Schlauchs ragten in ein Wasserbad, das auf 50–60 °C temperiert wurde. Mit einer weiteren Schlauchpumpe wurde das Wasser durch den Schlauch gefördert. An die Spritze wurde eine dünne Kapillare aus PTFE angebracht, um CHL in das Reaktionsgefäß zu fördern. Die Kapillare wurde ebenfalls mit dem beheizten Silikonschlauch und mit Alufolie umwickelt. Bevor die Reaktion durch die Zugabe des Substrates gestartet werden konnte, wurde die Kapillare mit dem gewünschten Volumenstrom befüllt und ausgetretenes CHL aufgefangen und verworfen. Danach wurde die Pumpe gestoppt, ausgetretenes CHL am Ende der Kapillare mit einem Tuch entfernt und die Kapillare in das Reaktionsmedium eingetaucht. Dann konnte die Reaktion durch erneutes Starten der Pumpe gestartet werden.

Präparative Hydrolyse von ϵ -Caprolacton zu 6-Hydroxyhexansäure

6-HHA wurde aus der enzymatischen Hydrolyse von ECL in Wasser erhalten. Als Katalysator diente immobilisierte CALB (FBL). Je nach Bedarf wurde eine bestimmte Menge ECL mit einer äquivalenten Menge Wasser verdünnt. Es sind beispielsweise 30,61 g (0,268 mol) ECL mit 30,27 g (1,682 mol) Wasser gemischt worden. Durch den Überschuss an Wasser war eine vollständige Hydrolyse von ECL anzunehmen. Die eingesetzte Menge an Lipase variierte zwischen 0,5 und 2 g und wurde teilweise für weitere Ansätze wiederverwendet. Die Reaktion wurde in einem temperierten Rührkessel (150 ml), passend zum Titrator (848 Titrino Plus) bei 40 °C durchgeführt. Die Hydrolyse wurde mit der Zugabe des Katalysators gestartet. Mit einem Propellerrührer wurde eine hinreichende Durchmischung gewährleistet. Während der Reaktion wurde ein vorgegebener pH-Wert von 7 durch die Titration der gebildeten Säure automatisch eingestellt und konstant gehalten. Die Titrationsgeschwindigkeit wurde zu Beginn und teilweise während der Reaktion manuell der Reaktionsgeschwindigkeit angepasst. Zur Titration wurde 5 N NaOH eingesetzt. Das zugegebene Volumen der Lauge wurde während der Reaktion aufgezeichnet, so dass der Umsatz jederzeit verfolgt werden konnte. Die Reaktion wurde beendet, sobald die errechnete Menge NaOH zugegeben und ECL komplett umgesetzt wurde. Der komplette Umsatz wurde schließlich mittels HPLC überprüft.

Zur Isolierung von 6-HHA wurde der Ansatz mit konz. HCl-Lösung (37 %) auf pH 1 eingestellt und das Wasser bei 60–80 °C und 20–60 mbar mittels Rotationsverdampfer entfernt, bis ein kristalliner Niederschlag von NaCl zu beobachten war. Anschließend wurden 50–100 ml MTBE zugegeben, um 6-HHA zu extrahieren und ausgefallenes NaCl durch Filtration abzutrennen. MTBE wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt. Es blieb eine durchsichtige, viskose Masse zurück, die darauf schließen ließ, dass womöglich eine Polymerisation durch Säure-Katalyse stattgefunden hat.

Polymerisation zu Poly- ϵ -Caprolacton

Durch die lipasekatalysierte Polymerisation von ECL oder 6-HHA konnte PCL erhalten werden. Dazu wurde kommerzielles ECL oder 6-HHA aus einer präparativen, enzymatischen Hydrolyse von ECL verwendet. Als Katalysator wurden ca. 2–5 % (g/v) zum Monomer immobilisierte CALB (c-LEcta) eingesetzt. Die Polymerisation kann mit oder ohne Lösungsmittel erfolgen, wobei die Viskosität mit fortschreitender Reaktionszeit stark ansteigt und dadurch die Enzymträger zerrieben werden. Als Lösungsmittel wurde Toluol mit etwa dem doppelten an Volumen vom Monomer eingesetzt. Die Reaktionen wurden bei 60–80 °C in einem Rührkessel durchgeführt und mit einem entsprechenden Rührwerk über Kopf durchmischt. Die Polykondensation von 6-HHA wurde bei 80 mbar durchgeführt, um das entstandene Wasser aus der Reaktion zu entfernen.

11.2.4 Chemische Polymerisation zu Poly- ϵ -Caprolacton (Polymaterials AG)

Die Vorschrift für die Vorbereitung und Durchführung der chemischen Polymerisation von ECL ist von der Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, Deutschland) erstellt und entsprechend ausgeführt worden.

Destillation von ϵ -Caprolacton über CaH_2

In einem 1 l Schlenkkolben werden 700 g ϵ -Caprolacton über 5 g CaH_2 unter Stickstoffatmosphäre für 1 Stunde gerührt. Danach wird eine Destillationsapparatur aufgesetzt und das ϵ -Caprolacton auf 70 °C erwärmt. Man rührt für eine Stunde bei 70 °C und 150 mbar. Anschließend wird bei bis zu 150 °C Ölbadtemperatur und 15 mbar 4 Stunden destilliert. Man erhält 681 g ϵ -Caprolacton. Das Produkt wird unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb gelagert.

Trocknung von Zinn(II) 2-ethylhexanoat und Herstellung einer Lösung in Toluol

In einem 250 ml Schlenkkolben werden 30 g Zinn(II) 2-ethylhexanoat vorgelegt und in 100 ml wasserfreiem Toluol gelöst. Diese Lösung wird für 3 Stunden mit einem Wasserabscheider unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird das Toluol abdestilliert. Man lässt den Rückstand auf Raumtemperatur abkühlen und legt für ca. 20 Minuten Vakuum an (ca. 5×10^{-1} mbar). Unter Stickstoffatmosphäre stellt man mit wasserfreiem Toluol eine 50 %ige Lösung her. Das Produkt wird unter Stickstoffatmosphäre gelagert.

Polymerisation

Zuerst wird ein 500 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Innenthermometer und Rückflusskühler ausgeheizt (ca. 5×10^{-1} mbar). Dann werden 150 g ϵ -Caprolacton (1,32 mol) in 146,2 g wasserfreiem Toluol gelöst und mit einer Pipette wird für 30 Minuten Stickstoff durch die Reaktionslösung geleitet. Unter leichtem N_2 -Strom wird die Reaktionslösung auf 80 °C erwärmt und 3,56 g der Zinn(II) 2-ethylhexanoat Lösung (4,2 mmol) über eine Spritze zugegeben. Die Spritze wird mit der Reaktionslösung gespült. Nach 2 Minuten wird ebenfalls in einer Spritze 0,273 g Ethylenglykol (4,4 mmol) zugegeben (=Reaktionsstart). Die Spritze wird mit der Reaktionslösung gespült. Die Polymerisation wird für 29,5 Stunden bei 80 °C (± 2 °C) durchgeführt. Nach jeweils 3, 7 und 23,5 Stunden wird eine Probe genommen. Nach Reaktionsende wird die Reaktionslösung in 3 l Isopropanol gefällt (5 l PE-Becher mit KPG-Rührer) und über Nacht gerührt. Das Polymer wird zerkleinert und zweimal in 2 l Isopropanol für 3 Stunden gerührt. Anschließend trocknet man das Produkt im Trockenschrank bei 50 °C und ca. 20 mbar. Man erhält 144 g Polymer.

MATLAB Skripte

Kinetisches Modell (Teil 1/2), „Kinetik_fedbatch_ISPR_dn.m“:

```
function dn dt = Kinetik_fedbatch_ISPR_dn(~,n)

global KmADHox KmCoADHox kADH KmSBVMO KichonBVMO KicholBVMO KmCoBVMO KiPBVMO
kBVMO kCL KmADHr KmCoADHr feedrate feedrate_n feedbase vol_0 kchol kchon kLip

vol = n(1);
chol = n(2);
chon = n(3);
CL = n(4);
nadp = n(5);
nadph = n(6);
vmaxADHox = n(7);
vmaxBVMO = n(8);
vmaxADHred = n(9);

%Geschwindigkeitsgleichungen / (vol*1000) v1 - CHol -> CHon durch ADH,
%Oxidation v2 - CHon -> CL durch BVMO v3 - CHon -> CHol durch ADH,
%Reduktion
v1 =
vmaxADHox*(vol_0/vol)*(chol/vol)/(KmADHox+(chol/vol))*(nadp/vol)/(KmCoADHox+(
nadp/vol));
v2 =
vmaxBVMO*(vol_0/vol)*(chon/vol)/(KmSBVMO+(chon/vol)*(1+(chon/vol)/KichonBVMO)
*(1+(chol/vol)/KicholBVMO)*(1+(CL/vol)/KiPBVMO))*((nadph/vol)/(KmCoBVMO+(nadp
h/vol)));
v3 =
vmaxADHred*(vol_0/vol)*(chon/vol)/(KmADHr+(chon/vol))*(nadph/vol)/(KmCoADHr+(
nadph/vol));

dvdt = feedrate/1000+feedbase/1000*CL;
dn1dt = feedrate_n-v1+v3-kchol*chol; %CHol
dn2dt = v1-v2-v3-kchon*chon; %CHon
dn3dt = v2-(kCL+kLip)*CL; %CL
dn4dt = v2-v1+v3; %NADP
dn5dt = v1-v2-v3; %NADPH
dn6dt = -kADH*vmaxADHox;
dn7dt = -kBVMO*vmaxBVMO;
dn8dt = -kADH*vmaxADHox;
dn9dt = (kCL+kLip)*CL; %formation of 6HHA

dn dt = [dvdt; dn1dt; dn2dt; dn3dt; dn4dt; dn5dt; dn6dt; dn7dt; dn8dt; dn9dt];

end
```

Kinetisches Modell (Teil 2/2), „Reaktor_fedbatch_ISPR_dn“:

```

clc
clear all
close all

%Konstanten
global KmADHox KmCoADHox kADH KmSBVMO KichonBVMO KicholBVMO KmCoBVMO KiPBVMO
kBVMO kCL KmADHr KmCoADHr kchol kchon feedrate vol_0 cbase feedrate_n
feedbase kLip

%ADH-Konstanten
KmADHox = 10.11; % mM
KmCoADHox = 0.05; % mM

KmADHr = 3.64; %mM
KmCoADHr = 0.092; %mM

kADH = 0; % 1/min 7.8e-4

%BVMO-Konstanten
KmSBVMO = 0.003; % mM 0.003
KichonBVMO = 34.8; % mM 34.8
KmCoBVMO = 0.006; % mM 0.006
KiPBVMO = 442.15; % mM
KicholBVMO = 8; % mM

kBVMO = 0; % 1/min 2.97e-3

%Autohydrolyse Caprolacton
kCL = 9.3e-5; % 1/min
kchol = 0.002; % 1/min 0.002
kchon = 0; % 1/min

%Startwerte
vol_0 = 0.06; % L
dil_0 = 0;
n0_chol = 0*vol_0; % mM
n0_chon = 0*vol_0; % mM
n0_CL = 0; % mM
n0_nadp = 0.2*vol_0; % mM*initial volume
n0_nadph = 0; % mM
c0_vmaxADHox = 10.37*vol_0; % U/ml 10.37
c0_vmaxBVMO = 0.57*vol_0; % U/ml 0.57
c0_vmaxADHred = c0_vmaxADHox*8.157; %7.07
n0_acid = 0*vol_0;

%Zeitvektor
tspan = 0:1:300; % min

%Titration of hydrolysed caprolactone and lipase activity
k_pseudo = 0.004; %rate constant of CALB in L/(g min)
mLip = 0.8; %gram
cLip = mLip/vol_0; %g/L
kLip = k_pseudo*cLip; %rate constant for pseudo-1st order reaction of
hydrolysis in min-1

cbase = 5; %base concentration, mol/L = mmol/ml

```

```

feedbase = (kLip+kCL)/cbase; %ml/min

%Substrate Feed
Dchol = 0.95; %density CHOL, g/ml
Mchol = 100.16; %molar mass, g/mol
feedrate = 1.5e-3; %ml/min 2e-3
feedrate_n = Dchol*feedrate/Mchol*1000; %mmol/min
totsub = feedrate*tspan; %total delivered volume of substrate, mL

%Anfangsvektor
n0 = [vol_0, n0_chol, n0_chon, n0_CL, n0_nadp, n0_nadph, c0_vmaxADHox,
c0_vmaxBVMO, c0_vmaxADHred, n0_acid];
%%
%Loesen der DGL
[t,n] = ode23s(@Kinetik_fedbatch_ISPR_dn,tspan,n0);
%%
%Ausgaben
volume = n(:,1);
n_chol = n(:,2);
n_chon = n(:,3);
n_CL = n(:,4);
n_nadp = n(:,5);
n_nadph = n(:,6);
n_vmaxADHox = n(:,7);
n_vmaxBVMO = n(:,8);
n_vmaxADHred = n(:,9);
n_6HHA = n(:,10);

%Umrechnung in Konzentration
c_chol = n_chol./volume;
c_chon = n_chon./volume;
c_CL = n_CL./volume;
c_nadp = n_nadp./volume;
c_nadph = n_nadph./volume;
c_6hha = n_6HHA./volume;

%Umrechnung volumen in mL und Berechnung der Verdünnung
volume_mL = volume.*1000;
dilution = vol_0./volume;

%Aktivitäten der einzelnen Schritte zu jedem Zeitpunkt
ADHox =
n_vmaxADHox.*dilution.*(c_chol./volume)./(KmADHox+(c_chol./volume)).*(c_nadp.
/volume)./(KmCoADHox+(c_nadp./volume));
ADHred =
n_vmaxADHred.*dilution.*(c_chon./volume)./(KmADHr+(c_chon./volume)).*(c_nadph
./volume)./(KmCoADHr+(c_nadph./volume));
CHMO =
n_vmaxBVMO.*dilution.*(c_chon./volume)./(KmSBVMO+(c_chon./volume)).*(1+(c_chon
./volume)./KichonBVMO)).*(1+(c_chol./volume)./KicholBVMO)).*(1+(c_CL./volume)./
KiPBVMO)).*((c_nadph./volume)./(KmCoBVMO+(c_nadph./volume)));

%% Ausgabe Plots
f1 = figure(1);
set(f1,'Position',[300,80,1100,900]) %position display and graph size
%% Plot#1
% plot(x,y,'b')
% hold on
subplot(2,2,1); %subplot (row,col,plot#)

```

```

plot(t,n_chol,'k')
hold on
plot(t,n_chon,'b')
hold on
plot(t,n_CL,'r')
hold on
plot(t,n_nadp,'c')
hold on
plot(t,n_nadph,'m')
hold on
plot(t,n_6HHA,'g')
hold on
xlabel('Zeit (min)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
ylabel('Stoffmenge (mmol)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
legend('CHL','CHN','ECL','NADP^+','NADPH','6HHA');
set(legend,'FontSize', 8,'Fontname','Helvetica','Location','East');
% axis([0 tspan(end) 0 c0_chol]);
%set(gca,'xtick', 0:(tspan(end)/10):tspan(end),'ytick',0:5:50,'FontSize', 12,
'FontName', 'Helvetica');

%% Plot#2
subplot(2,2,2);
plot(t,volume_mL,'b')
hold on
xlabel('Zeit (min)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
ylabel('Volumen (ml)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');

%% Plot#3
subplot(2,2,3);
plot(t,c_chol,'k')
hold on
plot(t,c_chon,'b')
hold on
plot(t,c_CL,'r')
hold on
plot(t,c_nadp,'c')
hold on
plot(t,c_nadph,'m')
hold on
plot(t,c_6hha,'g')
hold on
xlabel('Zeit (min)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
ylabel('Konzentration (mM)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
legend('CHL','CHN','ECL','NADP^+','NADPH','6HHA');
set(legend,'FontSize', 8,'Fontname','Helvetica','Location','East');

%% Plot#4
subplot(2,2,4);
plot(t,ADHox,'k')
hold on
plot(t,ADHred,'b')
hold on
plot(t,CHMO,'r')
hold on
xlabel('Zeit (min)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
ylabel('Aktivität (U/ml)','FontSize', 12, 'FontName', 'Helvetica');
legend('ADHox', 'ADHred', 'CHMO');
set(legend,'FontSize', 8,'Fontname','Helvetica','Location','East');

```

Pumpensteuerung, automatisierte Substratzugabe, “readout_pump”:

```

##### INTRODUCTION #####
% This script was created by Christian Scherkus
% (christian.scherkus@tuhh.de) for automated pump control in dependence of
% oxygen concentration measured by an optical oxygen sensor. Pump: ISMATEC
% IPC High precision Tubing Pump (commands provided by manual)

% Principle: Oxygen concentration data is imported from a text file which
% has been already created by the oxygen measuring software. The slope from
% the last detected values will be calculated and when a certain slope is
% exceeded the pump starts to dispense a calculated volume. Import,
% calculation and pumping is integrated in a loop control. So far all
% starting values a provided the feed will be adjusted automatically for
% the next round.

% Connection: The pump has to be connected on a serial COM port. Also
% virtual / emulated serial USB COM ports are supported. Find the
% particular port in the windows device manager. Then you are able to send
% commands and get response over RS232 (digital) very easily.

% Before running the script: 1. Script and text file with oxygen data must
% be in the same directory 2. Define serial COM port with connected pump 3.
% Set starting values: c0, c, vstart, flowrate 4. Define path or filename
% of text file with oxygen data (e.g. 'O2.txt'). The same filename that was
% chosen in oxygen measuring software. 5. The first substrate feed has to
% be added manually. 6. Start script right after first addition of
% substrate as long as oxygen concentration decreases.

clear; %Clear workspace
clc; %Clear command window

%% Get access to pump (RS232) over serial COM Port and open Port.
s = serial('COM5');

%% Define variables and initial conditions at start
go = '1H'; %Start
stop = '1I'; %Stop

c0 = 250; %Concentration feed stock [mM]
c = 2; %Target concentration [mM]
v = 0; %Start value for additional volume from feed.
vstart = 25; %Total start volume [ml]
flowrate = 10; %Flow rate [ml/min]

fid = fopen('Feed.txt','w'); %Creates a textfile to annotate feed
information.
fprintf(fid, '%s\t','Current Volume (ml)','Dispensed volume (ml)','Total Feed
Volume (ml)','Slope','Feed
Time(sec)','Year','Month','Day','Hour','Minute','Second'); %Write first row
as a header
fprintf(fid, '\n'); %Next row.
fopen(s);
fprintf(s, '%s\r', '1N'); %Operation MODE »DISP Time«
pause(0.5) %0.5 sec delay to finish previous operation
fprintf(s, '%s\r', '1W'); %Reset totally delivered volume (»TOTAL«) to 0
pause(0.5) %0.5 sec delay to finish previous operation
fclose(s);

```

```

x = 1;    %Value which is true for the loop control.

%% Import data from text file.
% Script for importing data from the text file
%
% To extend the code to different selected data or a different text file,
% generate a function instead of a script.

% Auto-generated by MATLAB on 2014/07/04 14:33:00

%% Initialize variables.
while x>0    % Start loop from here.
    filename = 'O2.txt';
    delimiter = ';';

    %% Read columns of data as strings:
    % For more information, see the TEXTSCAN documentation.
    formatSpec = '%*s%*s%*s%*s%[\n\r]';

    %% Open the text file.
    fileID = fopen(filename,'r');

    %% Read columns of data according to format string.
    % This call is based on the structure of the file used to generate this
    % code. If an error occurs for a different file, try regenerating the
    % code from the Import Tool.
    dataArray = textscan(fileID, formatSpec, 'Delimiter', delimiter,
'ReturnOnError', false);

    %% Close the text file.
    fclose(fileID);

    %% Convert the contents of columns containing numeric strings to numbers.
    % Replace non-numeric strings with NaN.
    raw = repmat({''},length(dataArray{1}),length(dataArray)-1);
    for col=1:length(dataArray)-1
        raw(1:length(dataArray{col}),col) = dataArray{col};
    end
    numericData = NaN(size(dataArray{1},1),size(dataArray,2));

    for col=[1,2]
        % Converts strings in the input cell array to numbers. Replaced
        % non-numeric strings with NaN.
        rawData = dataArray{col};
        for row=1:size(rawData, 1);
            % Create a regular expression to detect and remove non-numeric
            % prefixes and suffixes.
            regexstr = '(?<prefix>.*?)(?<numbers>([-
]*(\d+[\,]*)+[\.]{0,1}\d*[eEdD]{0,1}[-+]*\d*[i]{0,1})|([-
]*(\d+[\,]*)+[\.]{1,1}\d+[eEdD]{0,1}[-+]*\d*[i]{0,1})) (?<suffix>.*)';
            try
                result = regexp(rawData{row}, regexstr, 'names');
                numbers = result.numbers;

                % Detected commas in non-thousand locations.
                invalidThousandsSeparator = false;
                if any(numbers=='');

```

```

        thousandsRegExp = '^\\d+?(\\,\\d{3})*\\.\\{0,1\\}\\d*$';
        if isempty(regexp(thousandsRegExp, ',', 'once'));
            numbers = NaN;
            invalidThousandsSeparator = true;
        end
    end
    % Convert numeric strings to numbers.
    if ~invalidThousandsSeparator;
        numbers = textscan(strrep(numbers, ',', ''), '%f');
        numericData(row, col) = numbers{1};
        raw{row, col} = numbers{1};
    end
end
catch me
end
end

%% Replace non-numeric cells with NaN
R = cellfun(@(x) ~isnumeric(x) && ~islogical(x), raw); % Find non-numeric
cells
raw(R) = {NaN}; % Replace non-numeric cells

%% Create output variable
O2 = cell2mat(raw);
%% Clear temporary variables
clearvars filename delimiter formatSpec fileID dataArray ans raw col
numericData rawData row regexstr result numbers invalidThousandsSeparator
thousandsRegExp me R;

%% Calculate slope m from oxygen data
m = (O2(end,2)-O2(end-6,2))/(O2(end,1)-O2(end-6,1));

%% Operations which are able to iterate from here after the first
substrate feed.
v0 = vstart+v; %Starting volume in reactor [ml]

t1 = round(c*v0*60/((c0-c)*flowrate)*10); %Time to dispense calculated
volume [sec]. Multiplied by ten because dispensing time has to be given in
1/10 sec. Round to nearest integer.
t = sprintf('%04.f',t1); %Replace leading spaces with 0 and forms a
string with exactly four characters (e.g. 0012).

disp = '1V'; %Command to dispense volume
combinedStr = strcat(disp,t); %Combines strings from 'disp' and 't' to
get '1V0000' as a command to dispense for the in t1 calculated time value.

%% Pump and request delivered volume
if m > 27
    fopen(s);
    fprintf(s,'%s\r',combinedStr); %Dispensing time in 1/10 sec.
(0000-9999)
    pause(0.5) %0.5 sec delay is necessary to finish previous
operation
    ct = fix(clock);
    fprintf(s,'%s\r',go); %Start Pump. Stops automatically in DISP
mode.
    pause(t/10+2) %Delay of time of pumping plus 2 second to finish
pumping properly for further requests.

```

```

        fprintf(s,'%s\r','1:'); %Request: Totally delivered volume (in
µl, ml or litres)
        vans = fscanf(s,'%s'); %Get totally delivered volume (in µl, ml
or litres)
        fclose(s);

        % Delete (*) and (#) from vans for easier handling and output.
        vans1 = strrep(vans,'*',''); %Replace * to nothing
        vans2 = strrep(vans1,'#','') %Replace # to nothing
        vstr = vans2(1:end-2); %Format answer of totally delivered volume
into a string with only numeric characters like µl or ml
        v = str2num(vstr); %Format string in a number to recalculate t
for the next cycle
        vdisp = vstart+v-v0; %Calculation of current feed volume.

        % Edit text file which was created after starting the script
        % and collect data
        fprintf(fid, '%.3f\t',v0,vdisp,v);
        fprintf(fid, '%.f\t',t1,m,ct);
        fprintf(fid, '\n');
        ct
        fprintf('!!!!!!!!!!!!!! Press (Ctrl+C) in command window to stop
script !!!!!!!!!!!!!!!')
        end
        pause(15)
end

```

Abkürzungen

6-HHA	6-Hydroxyhexansäure
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BVMO	Baeyer-Villiger Monooxygenase
BVO	Baeyer-Villiger-Oxidation
CALA	Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>
CALB	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>
CHL	Cyclohexanol
CHMO	Cyclohexanon-Monooxygenase
CHN	Cyclohexanon
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	ϵ -Caprolacton
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GC	Gaschromatografie
GDH	Glukose-Dehydrogenase
GPC	Gelpermeationschromatografie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NAD(P) ⁺ , NAD(P)H	Nicotinamidadeninukleotid(phosphat)
NaOH	Natriumhydroxid
NaPP	Natriumphosphatpuffer
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PDI	Polydispersitätsindex
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>rounds per minute</i>
SEC	siehe GPC, engl.: size exclusion chromatography
TEA	Triethanolamin
THF	Tetrahydrofuran
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Symbole und Einheiten

[X]	mM, g l ⁻¹	Konzentration von Komponente X
ϵ_{NADPH}	6,22 mM ⁻¹ cm ⁻¹	molarer Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm
a_{max}	U ml ⁻¹	maximale volumetrische Enzymaktivität
a_{ref}	U ml ⁻¹	Referenzaktivität
d	mm	Durchmesser
F_{ref}	-	Relationsfaktor für maximale Enzymaktivität und der Referenzaktivität
F_{vmax}	-	Relationsfaktor für die maximale Enzymaktivität von Hin- und Rückreaktion
k_{base}	l mmol ⁻¹ min ⁻¹	Geschwindigkeitskonstante des Titrationsvolumens
k_d^{CHL}	min ⁻¹	Geschwindigkeitskonstante des Substratverlustes
k_d^{ECL}	min ⁻¹	Geschwindigkeitskonstante der Autohydrolyse von ECL
K_{eq}	-	Gleichgewichtskonstante
k_{feed}	l min ⁻¹	Geschwindigkeitskonstante der Zufuhr an Substratvolumen
K_I	mM	Inhibitorkonstante
k_{La}	min ⁻¹	volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient
K_M	mM	Michaelis-Menten-Konstante
K_{sw}	-	Verteilungskoeffizient eines Stoffes zwischen einem organischen Lösungsmittel und Wasser
min	min	Minute
mM	mmol l ⁻¹	Stoffmengenkonzentration
$\tau_{1/2}$	h	Halbwertszeit
U	μmol min ⁻¹	engl.: <i>Unit</i> , Enzymaktivität
v	U ml ⁻¹	enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit
V	l	Volumen
v_{feed}	mmol min ⁻¹	Rate der Substratzufuhr
v_{max}	U mg ⁻¹	maximale Enzymaktivität

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Schematische Übersicht für weiterführende Reaktionen ausgehend von ECL.....	1
Abb. 1-2	Übersicht zu der Anzahl von Veröffentlichungen pro Jahr mit dem Wortinhalt „caprolactone“ im Zeitraum von 2007 bis 2016 (Quelle: Literaturdatenbank <i>Web of Science</i> , Stand: 01/2017).	2
Abb. 1-3	Konzentrationsverläufe einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Der graue Bereich kennzeichnet in etwa die <i>steady-state</i> -Phase.....	4
Abb. 1-4	Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_0 als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ zur grafischen Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung und den Parametern v_{max} und K_M	4
Abb. 1-5	Katalysierte Reaktion einer ADH.....	5
Abb. 1-6	Kristallstruktur der ADH aus <i>Lactobacillus kefir</i> als Homotetramer (26,8 kDa pro Monomer) in Cartoon-Darstellung (PDB Code: 4RF2) (Noey <i>et al.</i> 2015). Zur Unterscheidung einzelner Proteinketten sind zwei Untereinheiten in Regenbogenfarben von blau (C-Terminus) nach rot (N-Terminus), NADP ⁺ in orange und Mg ²⁺ in magenta hervorgehoben.	6
Abb. 1-7	Schematisch dargestellte Reduktion (a) und Protonierung des Alkoxids (b) in Ketoreduktasen. NADPH ist in rosa, das Substrat in violett und die katalytisch wirksamen Aminosäurereste (katalytische Triade) sind in petrol dargestellt (Noey <i>et al.</i> 2015).	7
Abb. 1-8	Reaktionsgleichungen der chemisch und enzymatisch katalysierten Baeyer-Villiger-Oxidation.	7
Abb. 1-9	Kristallstruktur einer CHMO aus <i>Rhodococcus</i> sp. HI-31 in Cartoon-Darstellung (PDB Code: 4RG3) (Yachnin <i>et al.</i> 2014). Rot markierte Bereiche kennzeichnen eine Sequenzhomologie mit der CHMO aus <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIMB 9871 (Chen <i>et al.</i> 1988) über mindestens vier zusammenhängende Aminosäuren, die hauptsächlich das aktive Zentrum umgeben. Die Cofaktoren NADP ⁺ und FAD sind in grün und gelb hervorgehoben und gebundenes ECL in cyan.....	9
Abb. 1-10	Angenommener Reaktionsmechanismus der CHMO schematisch dargestellt (Yachnin <i>et al.</i> 2012). Einzelne Reaktionsschritte sind von A bis J gekennzeichnet. Schemata und chemische Strukturen in der Mitte sind in den gleichen Farben hervorgehoben. FAD ist mit drei verbundenen Sechsecken gekennzeichnet. Das reduzierte NADPH ist mit dem Adenin als Rechteck und dem Nikotinamid als Sechseck in blau und das oxidierte NADP ⁺ ist in rot dargestellt. Das Substrat ist grün, das Lacton orange und das Criegee-Intermediat braun hervorgehoben.	10
Abb. 1-11	Hydrolyse und Bildung eines Esters durch eine Hydrolase.	10

Abb. 1-12	Kristallstruktur von CALB in Cartoon-Darstellung (PDB Code: 4ZV7) (Strzelczyk <i>et al.</i> 2016). Sekundärstrukturelemente wie α -Helices und β -Faltblätter sind blau bzw. rot hervorgehoben. Die cyan-gefärbten α -Helices bilden eine flexible Region, die durch Konformationsänderung den Zugang zum aktiven Zentrum bestimmt. Zwei zusammenhängende und am Protein gebundene (Asn74) <i>N</i> -Acetylglucosamine sind gelb und die an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäurereste (Ser105-Asp187-His224) sind grün dargestellt. 11	11
Abb. 1-13	Reaktionsmechanismus einer Esterase bzw. einer Lipase (Abb. nach (Drauz <i>et al.</i> 2012)). 12	12
Abb. 1-14	Strategien zum Cofaktorrecycling. Cofaktor* entspricht dem entgegengesetzten Zustand des oxidierten oder reduzierten Cofaktors. 13	13
Abb. 1-15	Begasungsarten. 17	17
Abb. 2-1	Biokatalytische Synthese von ECL über eine zweistufige Reaktion ausgehend von CHL, das im ersten Oxidationsschritt mittels einer ADH zu CHN umgesetzt wird. Der zweite Oxidationsschritt wird mittels einer BVMO katalysiert, wobei molekularer Sauerstoff als umweltfreundliches Oxidationsmittel eingesetzt wird. Innerhalb der Reaktionssequenz wird der verbrauchte Nikotinamid-Cofaktor regeneriert. 19	19
Abb. 3-1	Enzymaktivitäten von ADH und CHMO in Abhängigkeit vom pH und Puffersubstanz (50 mM). Die Enzymaktivität entspricht der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit unter den jeweiligen Bedingungen bei Raumtemperatur (23 ± 2 °C) und wurde doppelt bestimmt. Reaktionsbedingungen ADH-Aktivität: 1 mM CHL, 0,2 mM NADP ⁺ . Reaktionsbedingungen CHMO-Aktivität: 1 mM CHN, 0,2 mM NADPH. 21	21
Abb. 3-2	Enzymaktivität von ADH und CHMO nach 30 min Inkubation bei unterschiedlicher Temperatur. Reaktionsbedingungen: 0,27 mM NADPH und 0,01 % (v/v) (97 mM) CHN zur Bestimmung der CHMO-Aktivität, 0,39 mM NADP ⁺ und 0,01 % (v/v) (96 mM) CHL zur Bestimmung der ADH-Aktivität, NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C. 23	23
Abb. 4-1	Gleichgewichtsreaktion zwischen CHL und CHN sowie den Cofaktoren NADP ⁺ und NADPH mit der ADH als Katalysator. 25	25
Abb. 4-2	Michaelis-Menten-Kinetik der ADH für den Umsatz von CHL und NADP ⁺ bei 25 °C in NaPP (100 mM, pH 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. 26	26
Abb. 4-3	Michaelis-Menten-Kinetik der ADH für den Umsatz von CHN und NADPH bei 25 °C in NaPP (100 mM, pH 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. 27	27
Abb. 4-4	Feinabstimmung der ADH-Kinetik mittels Simulation der experimentellen Daten und Anpassung kinetischer Parameter. Die Ansätze A-C haben jeweils unterschiedliche Startkonzentrationen (siehe Tab. 4-1). Der Reaktionsfortschritt wurde durch die Bildung von NADPH photometrisch verfolgt. 29	29
Abb. 4-5	Baeyer-Villiger-Oxidation von CHN zu ECL unter dem Verbrauch von NADP ⁺ und Sauerstoff mit der CHMO als Katalysator. 30	30

Abb. 4-6	Michaelis-Menten-Kinetik der CHMO für den Umsatz von CHN und NADPH bei 25 °C in NaPP (100 mM, pH 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.	31
Abb. 4-7	Lineare und enzymatisch katalysierte Reaktionskaskade.	32
Abb. 4-8	Inhibierung der CHMO-Aktivität durch CHL und ECL. Die Werte entsprechen dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Reaktionsbedingungen: 2 mM CHN, 0,2 mM NADPH, NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.....	32
Abb. 4-9	Abhängigkeit der CHMO-Aktivität von der im Medium gelösten O ₂ -Konzentration während der Oxidation von CHN zu ECL mit Luft gesättigtem und O ₂ angereichertem Medium. Reaktionsbedingungen: 0,01 % (v/v) (97 mM) CHN, NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.....	34
Abb. 5-1	Reaktionsansatz mit Rohextrakten von ADH und CHMO in der Blasensäule (links). Einleiten von Luft in einen verdünnten CHMO-Rohextrakt (rechts).....	37
Abb. 5-2	Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff mittels Katalase.....	38
Abb. 5-3	Einheit zur Membranbegasung über einen Silikonschlauch.	40
Abb. 5-4	Bestimmung des k_{La} -Werts für die Begasung von 30 ml Wasser mit einem Silikonschlauch (48 cm) bei 20 ± 1 °C. Das Volumen wurde über eine zwei-kanalige Schlauchpumpe mit einem Volumenstrom von 2 ml min ⁻¹ durch den Silikonschlauch gefördert.	41
Abb. 5-5	Abhängigkeit des Sauerstoffeintrags von der Flussrate der Pumpe.....	41
Abb. 6-1	Zweistufige Synthese von ECL im Satzbetrieb ausgehend von CHL mittels ADH und CHMO. Reaktionsbedingungen: 50 ml NaPP (100 mM, pH 8), 2 mM MgCl ₂ , 0,2 mM NADP ⁺ , 0,5 U ml ⁻¹ CHMO, 0,55 U ml ⁻¹ ADH, pH mit NaOH (1 N) mittels Autotitration kontrolliert, 25 °C, Magnetrührer, Begasung mit O ₂ unter Normaldruck, 30 ml min ⁻¹ Pumprate für Begasung.	45
Abb. 6-2	Verlust von Cyclohexanol aus dem Reaktor. 60 ml einer gepufferten CHL-Lösung (NaPP, 100 mM, pH 8) wurden bei 25 °C mit 30 ml min ⁻¹ durch die Begasungseinheit gepumpt.	46
Abb. 6-3	Autohydrolyse von ECL (100 µl, 0,95 mmol, 23,6 mM) bei 25 °C in 40 ml NaPP (10 mM, pH 8), Titration mit 1 N NaOH.	46
Abb. 6-4	Änderung der ADH-Aktivität (links) und der CHMO-Aktivität (rechts) unter Prozessbedingungen im Vergleich zur Inkubation im geschlossenen Reaktionsgefäß ohne Pumpen (Referenz). Verdünnter Rohextrakt in 40 ml NaPP (100 mM, pH 8), 2 mM MgCl ₂ , 25 °C, 30 ml min ⁻¹ Pumprate durch Begasungseinheit, Magnetrührer.	48
Abb. 6-5	Experimentelle und berechnete Konzentrationsverläufe für den Umsatz von 20 mM CHL im Satzbetrieb. Simulationswerte: V = 50 ml, $a_{tot}^{CHMO} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,ox} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,red} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{CHL} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{ECL} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{feed} = 0$, $k_{feed} = 0$, $k_{base} = 0$	49

- Abb. 6-6 Enzymaktivitäten von ADH und CHMO während des Umsatzes von 20 mM CHL zu ECL. 49
- Abb. 6-7 Simulationen zur enzymatischen Synthese von ECL mittels ADH und CHMO ausgehend von 20, 50 und 100 mM CHL im Satzbetrieb. Simulationswerte: $V = 50$ ml, $a_{tot}^{CHMO} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,ox} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,red} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{CHL} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{ECL} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{feed} = 0$, $k_{feed} = 0$, $k_{base} = 0$ 50
- Abb. 6-8 Reaktion im Zulaufverfahren mit manueller, diskontinuierlicher Substratzugabe in Abhängigkeit vom O_2 -Verbrauch. Reaktionsbedingungen: 25 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 mM $MgCl_2$, 0,4 mM $NADP^+$, 0,7 U ml^{-1} CHMO, 1 U ml^{-1} ADH, 254 mM CHL Stammlösung, 25 °C, Begasung mit Luft. 51
- Abb. 6-9 Reaktion im Zulaufverfahren mit automatisierter Substratzugabe in Abhängigkeit vom O_2 -Verbrauch. Reaktionsbedingungen: 25 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 mM $MgCl_2$, 0,4 mM $NADP^+$, 0,7 U ml^{-1} CHMO, 1 U ml^{-1} ADH, 242 mM CHL Stammlösung, 25 °C, Begasung mit Luft. 51
- Abb. 6-10 Reaktion im Satzbetrieb. Reaktionsbedingungen: 25 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 mM $MgCl_2$, 0,5 mmol (20 mM) CHL, 0,4 mM $NADP^+$, 0,5 U ml^{-1} CHMO, 1 U ml^{-1} ADH, 25 °C, Begasung mit O_2 52
- Abb. 6-11 Fließbild zum experimentellen Aufbau des Zulaufverfahrens. FI: Schwebekörper-Durchflussmesser, MA: Membranbegasung, OI: O_2 -Sonde, PI: Manometer, pHICR/P1: Pumpe mit pH-Sonde und Regelung (Autotitration), P2: Spritzenpumpe, P3: Mehrkanal-Schlauchpumpe. 53
- Abb. 6-12 Experimenteller Aufbau des Zulaufverfahrens. 1: Wasserbad zur Temperierung des Rührkessels, 2: PC zur Datenaufnahme und Pumpensteuerung, 3+4: Wasserbad und Schlauchpumpe zur Temperierung der Spritzenpumpe, 5: Spritzenpumpe mit CHL, 6: pH-Kontrolle und Autotitration (ca. 10^{-3} – 1 ml min^{-1}), 7: Sauerstoffsonde, 8: Rührer. 9: Rührkessel (75 ml), 10: Membranbegasung (max. 0,5 bar Überdruck), 11: Messzelle zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration, 12: mehrkanalige Schlauchpumpe. Die rote Linie kennzeichnet mit Pfeilen den Umlauf des Reaktionsmediums. 53
- Abb. 6-13 Reaktion im Zulaufverfahren mittels kontinuierlicher Substratzugabe (unverdünntes CHL) und integrierter pH-Kontrolle. Reaktionsbedingungen: 50 ml NaPP (100 mM, pH 8), 5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM $NADP^+$, 1 U ml^{-1} CHMO, 1,2 U ml^{-1} ADH, 25 °C, 9,6–14,4 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (1–1,5 $\mu\text{l min}^{-1}$) Zulauf CHL, Begasung mit O_2 , Titration mit 1 N NaOH. 54
- Abb. 6-14 Simulierte Reaktionsverläufe mit kontinuierlicher Zugabe von CHL. Simulationswerte: $V = 50$ ml, $a_{tot}^{CHMO} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,ox} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,red} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{CHL} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{ECL} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{feed} = 14,2/ 17,5/ 19 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_{feed} = 1,5 \cdot 10^{-6}/ 1,85 \cdot 10^{-6}/ 2 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$, $k_{base} = 8 \cdot 10^{-6} \text{ l mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 54
- Abb. 6-15 Reaktionsverläufe des Zulaufverfahrens mit 200 mM ECL zu Beginn der Reaktion (links). Titrationsverlauf und Zulauf von CHL während der Reaktion (rechts). Reaktionsbedingungen: 60 ml NaPP (33 mM, pH 8), 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM $NADP^+$,

	0,5 U ml ⁻¹ CHMO, 0,55 U ml ⁻¹ ADH, 14,2 μmol min ⁻¹ (1,5 μl min ⁻¹) CHL-Zulauf, 25 °C, Titration mit 5 N NaOH, 30 ml min ⁻¹ Flussrate der Reaktionslösung.....	55
Abb. 7-1	Enzymatisch katalysierte Polymerisation von ECL zu PCL.....	58
Abb. 7-2	Polymerisation von ECL zu PCL. Reaktionsbedingungen: 77,3 g ECL, 137,8 g Toluol, 2 g CALB (c-LEcta), 60 °C.....	58
Abb. 7-3	Ausgehärtetes PCL nach Aufarbeitung und enzymatischer Polymerisation von ECL.....	58
Abb. 7-4	Enzymatische Hydrolyse von ECL zu 6-HHA.....	59
Abb. 7-5	Änderung der Enzymaktivitäten von ADH und CHMO nach 1 h Inkubation von 1,5 ml verdünntem Rohextrakt in NaPP (100 mM, pH 8) mit 50 mg Testsubstanz bei Raumtemperatur.....	60
Abb. 7-6	Reaktionsverlauf einer lipasekatalysierten Hydrolyse von ECL zu 6-HHA. Reaktionsbedingungen: 1450 μl NaPP (100 mM, pH 7), 50 μl ECL (315 mM), 49,7 mg CALB (FBL), 30 °C, 900 rpm Schüttelgeschwindigkeit.....	61
Abb. 7-7	Chromatogramme (HPLC) zu verschiedenen Zeitpunkten während der Lipase katalysierten Hydrolyse von ECL zu 6-HHA.....	61
Abb. 7-8	Titrationsskurve zur enzymatischen Hydrolyse von ECL (0,95 mmol, 23,6 mM) zu 6-HHA. 111 mg CALB (K15, FBL), 100 μl ECL in 40 ml NaPP (10 mM, pH 8), 25 °C.....	61
Abb. 7-9	Enzymatisch katalysierte Polymerisation von 6-HHA zu PCL.....	63
Abb. 7-10	Chromatogramm zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PCL aus 6-HHA im Vergleich zu Molekulargewichtstandards aus Polystyrol (PS). Reaktionsbedingungen: 6-HHA extrahiert aus einer enzymatischen Hydrolyse von 30,61 g ECL und 30,28 g Wasser, 1 g (3707 PLU) CALB (c-LEcta), 70 °C, 80 mbar, 27 h.....	64
Abb. 8-1	Dreistufige, lineare Reaktionskaskade zur Synthese von 6-HHA.....	65
Abb. 8-2	Fließbild zum experimentellen Aufbau des Zulaufverfahrens. FB: Festbett mit immobilisierter CALB, FI: Schwebekörper-Durchflussmesser, MA: Membranbegasung, NF: Nylonfiltermembran (200 μm), OI: O ₂ -Sonde, PI: Manometer, pHICR/P1: Pumpe mit pH-Sonde und Regelung (Autotitration), P2: Spritzenpumpe, P3: Mehrkanal-Schlauchpumpe.....	65
Abb. 8-3	Reaktionsverläufe des Zulaufverfahrens mit 200 mM 6-HHA zu Beginn der Reaktion (links). Titrationsverlauf und Zulauf von CHL während der Reaktion (rechts). Reaktionsbedingungen: 60 ml NaPP (33 mM, pH 8), 2 mM MgCl ₂ , 0,2 mM NADP ⁺ , 0,5 U ml ⁻¹ CHMO, 0,55 U ml ⁻¹ ADH, 14,2 μmol min ⁻¹ (1,5 μl min ⁻¹) CHL-Zulauf, 25 °C, Titration mit 5 N NaOH, 30 ml min ⁻¹ Flussrate der Reaktionslösung. Simulationswerte: V = 0,06 l, a _{tot} ^{CHMO} = 34,2 μmol min ⁻¹ , a _{tot} ^{ADH,ox} = 622,2 μmol min ⁻¹ , a _{tot} ^{ADH,red} = 5075,3 μmol min ⁻¹ , k _d ^{CHL} = 0,002 min ⁻¹ , k _d ^{ECL} = 9,3 · 10 ⁻⁵ min ⁻¹ , v _{feed} = 14,2 μmol min ⁻¹ , k _{feed} = 1,5 · 10 ⁻⁶ l min ⁻¹ , k _{base} = 10,7 · 10 ⁻⁶ l mmol ⁻¹ min ⁻¹ , k ['] _{ECL} = 0,004 l g ⁻¹ min ⁻¹ , [CALB] = 0,8 g l ⁻¹	66

Abb. 8-4	Vergleich der Akkumulationen von CHL während der Versuche aus Abb. 6-15 und Abb. 8-3 bzw. ohne Lipase und mit Lipase.	67
Abb. 8-5	Simulierte Reaktionsverläufe zur Synthese von ECL und anschließender Hydrolyse mit kontinuierlicher Zugabe von CHL. Simulationswerte: $V = 50 \text{ ml}$, $a_{tot}^{CHMO} = 28,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,ox} = 518,5 \mu\text{mol min}^{-1}$, $a_{tot}^{ADH,red} = 4229,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_d^{CHL} = 0,002 \text{ min}^{-1}$, $k_d^{ECL} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, $v_{feed} = 19/20,4 \mu\text{mol min}^{-1}$, $k_{feed} = 2 \cdot 10^{-6}/2,15 \cdot 10^{-6} \mu\text{l min}^{-1}$, $k_{base} = 8 \cdot 10^{-6} \text{ l mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k'_{ECL} = 0,004 \text{ l g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $[\text{CALB}] = 0,5 \text{ g l}^{-1}$	67
Abb. 8-6	Synthese von 6-HHA im Zulaufverfahren mit kontinuierlicher Substratzugabe. 50 ml NaPP (100 mM, pH 8), 1 U ml ⁻¹ CHMO, 1,1 U ml ⁻¹ ADH, 1,5 g (653 CLU) CALB (FBL) im Festbett, 5 mM MgCl ₂ , 0,4 mM NADP ⁺ , 5–38 μmol min ⁻¹ (0,5–4 μl min ⁻¹) CHL-Zulauf, 10 ml min ⁻¹ Flussrate der Reaktionslösung, Titration mit NaOH (5 N), 25 °C, Begasung mit O ₂	68
Abb. 8-7	Zähflüssiger Rückstand als isoliertes Produkt der dreistufigen, enzymatischen Reaktionssequenz.	69
Abb. 9-1	Dynamische Membranbegasung zur Sauerstoffversorgung über Silikonschläuche, die um einen oszillierenden Rotor gewunden sind (Frahm <i>et al.</i> 2007).	74
Abb. 9-2	Vergleich der Molekulargewichtsverteilung zwischen chemisch und enzymatisch hergestelltem PCL aus ECL anhand der Chromatogramme, die mittels GPC erstellt wurden.	77
Abb. 11-1	Umsatz von β-D-Glukose zu D-Glukono-1,5-lacton katalysiert durch eine GDH. ...	88
Abb. 11-2	Chromatogramm (GC).	89
Abb. 11-3	Kalibrationskurven HPLC.	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1	Klassifizierung von Enzymen entsprechend der Reaktion, die sie katalysieren (Drauz <i>et al.</i> 2012).....	3
Tab. 1-2	Schematische Übersicht idealer Reaktortypen mit den entsprechenden Konzentrationsverläufen für Substrat [S] und Produkt [P] als Funktion der Zeit und des Orts.....	15
Tab. 4-1	Übersicht der Start- und Gleichgewichtskonzentrationen zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante und Anpassung der Werte für a_{max}^{ox} (0,497 U ml ⁻¹) und F_{vmax} (7,07).	29
Tab. 4-2	Konstanten zur Michaelis-Menten-Kinetik der ADH.	35
Tab. 4-3	Konstanten zur Michaelis-Menten-Kinetik der CHMO.....	35
Tab. 5-1	Beeinflussung der Enzymaktivitäten von ADH und CHMO in 0,01 % (v/v) (11 mM) H ₂ O ₂ und mit Katalase (0,25 g l ⁻¹). Reaktionsbedingungen: 0,01 % (v/v) (97 mM) CHN bzw. 0,01 % (v/v) (96 mM) CHL, 0,2 mM NADPH bzw. NADP ⁺ , 50 µl verdünnter Rohextrakt von CHMO bzw. ADH in 1 ml NaPP (100 mM, pH 8), 25 °C.....	38
Tab. 5-2	Skalierung der Membranbegasung vom Modellsystem zur Begasungseinheit mit einer größeren Membranoberfläche und Abschätzung der max. OTR für die Begasung mit Luft oder Sauerstoff.....	43
Tab. 7-1	Verteilungskoeffizienten von ECL in verschiedenen organischen Lösungsmitteln. .	57
Tab. 7-2	Übersicht der verschiedenen Träger und Immobilisierungen.	60
Tab. 7-3	Verteilungskoeffizienten von 6-HHA in verschiedenen organischen Lösungsmitteln.	63
Tab. 9-1	Vergleich der untersuchten Prozessmodi zur biotechnologischen Synthese von ECL bzw. 6-HHA.	75
Tab. 9-2	Molmassen von chemisch und biokatalytisch hergestelltem PCL.	78
Tab. 11-1	Liste der verwendeten Chemikalien.	83
Tab. 11-2	Liste der verwendeten Lipasen.....	84
Tab. 11-3	Liste der verwendeten Geräte.....	85

Literaturverzeichnis

- Altschul, Madden, Schäffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST. A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25. 17:3389–3402.
- Anderson, Larsson, Kirk. 1998. One Biocatalyst–Many Applications. The Use of *Candida Antarctica B-Lipase* in Organic Synthesis. *Biocatal. Biotransform.* 16. 3:181–204.
- Baeyer, Villiger. 1899. Einwirkung des Caro'schen Reagens auf Ketone. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 32. 3:3625–3633.
- Balke, Kadow, Mallin, Saß, Bornscheuer. 2012. Discovery, application and protein engineering of Baeyer–Villiger monooxygenases for organic synthesis. *Org. Biomol. Chem.* 10. 31:6249.
- Beam, Bosserman, Noinaj, Wehenkel, Rohr. 2009. Crystal Structure of Baeyer–Villiger Monooxygenase MtmOIV, the Key Enzyme of the Mithramycin Biosynthetic Pathway. *Biochemistry* 48. 21:4476–4487.
- Beier, Bordewick, Genz, Schmidt, van den Bergh, Peters, Joosten, Bornscheuer. 2016. Switch in Cofactor Specificity of a Baeyer-Villiger Monooxygenase. *ChemBioChem* 17. 24:2312–2315.
- Berezina, Kozma, Furstoss, Alphanh. 2007. Asymmetric Baeyer–Villiger Biooxidation of α -Substituted Cyanocyclohexanones: Influence of the Substituent Length on Regio- and Enantioselectivity. *Adv. Synth. Catal.* 349. 11-12:2049–2053.
- Bisogno, Rioz-Martínez, Rodríguez, Lavandera, de Gonzalo, Torres Pazmiño, Fraaije, Gotor. 2010. Oxidoreductases Working Together. Concurrent Obtaining of Valuable Derivatives by Employing the PIKAT Method. *ChemCatChem* 2. 8:946–949.
- Bisswanger. 2000. Enzymkinetik. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bocola, Schulz, Leca, Vogel, Fraaije, Reetz. 2005. Converting Phenylacetone Monooxygenase into Phenylcyclohexanone Monooxygenase by Rational Design: Towards Practical Baeyer-Villiger Monooxygenases. *Adv. Synth. Catal.* 347. 7-8:979–986.
- Bong, Clay, Collier, Mijts, Vogel, Zhang, Zhu, Nazor, Smith, Song. Codexis, Inc. 2011. Synthesis of prazole compounds. WO2011071982 A2.
- Bornadel, Hatti-Kaul, Hollmann, Kara. 2015a. A Bi-enzymatic Convergent Cascade for ϵ -Caprolactone Synthesis Employing 1,6-Hexanediol as a ‘Double-Smart Cosubstrate’. *ChemCatChem* 7. 16:2442–2445.
- Bornadel, Hatti-Kaul, Hollmann, Kara. 2015b. Enhancing the productivity of the bi-enzymatic convergent cascade for ϵ -caprolactone synthesis through design of experiments and a biphasic system. *Tetrahedron*:DOI: 10.1016/j.tet.2015.11.054.

- Bornscheuer, Huisman, Kazlauskas, Lutz, Moore, Robins. 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485. 7397:185–194.
- Bradshaw, Hummel, Wong. 1992. Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis. *J. Org. Chem.* 57. 5:1532–1536.
- Braud, Devarieux, Atlan, Ducos, Vert. 1998. Capillary zone electrophoresis in normal or reverse polarity separation modes for the analysis of hydroxy acid oligomers in neutral phosphate buffer. *J. Chromatogr. B* 706. 1:73–82.
- Briggs, Haldane. 1925. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* 19. 2:338–339.
- Bu, Lei, Ren, Wang, Holladay, Zhang, Tang, Ruan. 2011. Phenol and phenolics from lignocellulosic biomass by catalytic microwave pyrolysis. *Bioresour. Technol.* 102. 13:7004–7007.
- Bučko, Schenk Mayerová, Gemeiner, Vikartovská, Mihovilovič, Lacík. 2011. Continuous testing system for Baeyer–Villiger biooxidation using recombinant Escherichia coli expressing cyclohexanone monooxygenase encapsulated in polyelectrolyte complex capsules. *Enzyme Microb. Technol.* 49. 3:284–288.
- Calderon, Arenas, Perez, Fuentes, Araya, Saavedra, Tantalean, Pichuanes, Youderian, Vasquez. 2006. Catalases are NAD(P)H-dependent tellurite reductases. *PLoS one* 1:e70.
- Casey, Glennon, Hamer. 1999. Review of membrane aerated biofilm reactors. *Resour. Conserv. Recycl.* 27. 1-2:203–215.
- Causette, Gaunand, Planche, Lindet. 1998. Enzyme inactivation by inert gas bubbling. In: Balasteros, Plou, Iborra, Halling, editors. *Stability and Stabilization of Biocatalysts*: Elsevier. p 393–398.
- Cernuchová, Mihovilovic. 2007. Microbial Baeyer-Villiger oxidation of terpenones by recombinant whole-cell biocatalysts--formation of enantiocomplementary regioisomeric lactones. *Org. Biomol. Chem.* 5. 11:1715–1719.
- Chen, Peoples, Walsh. 1988. Acinetobacter Cyclohexanone Monooxygenase: Gene Cloning and Sequence Determination. *J. Bacteriol.* 170. 2:781–789.
- Chmiel. 2011. *Bioprozesstechnik*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XIII, 540 S.
- Clarkson, Cui, Darton. 1999. Protein Denaturation in Foam. *J. Colloid Interface Sci.* 215. 2:323–332.
- Cornish-Bowden. 2015. One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspect. Sci.* 4:3–9.
- Côté, Bersillon, Huyard. 1989. Bubble-free aeration using membranes: mass transfer analysis. *J. Memb. Sci.* 47. 1-2:91–106.
- Cotton, Elebring, Larsson, Li, Sörensen, Unge. 2000. Asymmetric synthesis of esomeprazole. *Tetrahedron: Asymmetry* 11. 18:3819–3825.
- Demirjian, Morís-Varas, Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5. 2:144–151.

- Doig, Avenell, Bird, Gallati, Lander, Lye, Wohlgemuth, Woodley. 2002. Reactor operation and scale-up of whole cell Baeyer-Villiger catalyzed lactone synthesis. *Biotechnol. Progr.* 18. 5:1039–1046.
- Donaldson, Boonstra, Hammond. 1980. Kinetics of protein denaturation at gas—liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 74. 2:441–450.
- Donoghue, Norris, Trudgill. 1976. The Purification and Properties of Cyclohexanone Oxygenase from *Nocardia globerula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur. J. Biochem.* 63. 1:175–192.
- Doran. 2013. Bioprocess engineering principles. Amsterdam: Elsevier. 919 S.
- Drauz, Gröger, May. 2012. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Elder, Soltes. 2007. Pyrolysis of Lignocellulosic Materials. Phenolic Constituents of A Wood Pyrolytic Oil. *Wood Fiber Sci.* 12. 4:217–226.
- Ferroni, Tolmie, Smit, Opperman. 2016. Structural and Catalytic Characterization of a Fungal Baeyer-Villiger Monooxygenase. *PloS one* 11. 7:1-12.
- Fita, Rossmann. 1985. The NADPH binding site on beef liver catalase. *PNAS* 82. 6:1604–1608.
- Fraaije, Wu, Heuts, Hellemond, Spelberg, Janssen. 2005. Discovery of a thermostable Baeyer-Villiger monooxygenase by genome mining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66. 4:393–400.
- Frahm, Kirchner, Kauling, Brod, Langer, Bödeker. 2007. Dynamische Membranbegasung im Bioreaktor zur Intensivierung der Sauerstoffversorgung empfindlicher Zelllinien. *Chem. Ing. Tech.* 79. 7:1052–1058.
- Franceschini, van Beek, Pennetta, Martinoli, Fraaije, Mattevi. 2012. Exploring the structural basis of substrate preferences in Baeyer-Villiger monooxygenases: insight from steroid monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 287. 27:22626–22634.
- Fürst, Savino, Dudek, Gomez Castellanos, Gutierrez de Souza, Rovida, Fraaije, Mattevi. 2017. Polycyclic Ketone Monooxygenase from the Thermophilic Fungus *Thermothelomyces thermophila*: A Structurally Distinct Biocatalyst for Bulky Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 139. 2:627–630.
- Gabelman, Hwang. 1999. Hollow fiber membrane contactors. *J. Membr. Sci.* 159. 1-2:61–106.
- Gagnon, Grogan, Levitt, Roberts, Wan, Willetts. 1994. Biological Baeyer–Villiger oxidation of some monocyclic and bicyclic ketones using monooxygenases from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 and *Pseudomonas putida* NCIMB 10007. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 43. 18:2537–2543.
- Gorke, Srienc, Kazlauskas. 2010. Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15. 1:40–53.
- Gouet, Jouve, Dideberg. 1995. Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J. Mol. Biol.* 249. 5:933–954.

- Grogan, Roberts, Willetts. 1992. Biotransformations by microbial Baeyer-Villiger monooxygenases stereoselective lactone formation in vitro by coupled enzyme systems. *Biotechnol. Lett.* 14. 12:1125–1130.
- Gross, Kumar, Kalra. 2001. Polymer Synthesis by In Vitro Enzyme Catalysis. *Chem. Rev.* 101. 7:2097–2124.
- Guzman, Carbonell, Kilpatrick. 1986. The adsorption of proteins to gas-liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 114. 2:536–547.
- Hanefeld, Gardossi, Magner. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* 38. 2:453–468.
- Hirasa, Ichijo, Yamauchi. 1991. Oxygen transfer from silicone hollow fiber membrane to water. *J. Ferment. Bioeng.* 71. 3:206–207.
- Høegh, Patkar, Halkier, Hansen. 1995. Two lipases from *Candida antarctica*. Cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Bot.* 73. S1:869–875.
- Hollmann, Arends, Buehler, Schallmeyer, Bühler. 2011. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* 13. 2:226.
- Hollmann, Schmid, Steckhan. 2001. Erste synthetische Anwendung einer Monooxygenase unter indirekter elektrochemischer NADH-Regenerierung. *Angew. Chem.* 113. 1:190–193.
- Huang, Romero, Ressmann, Rudroff, Hollmann, Fraaije, Kara. 2017. Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent Redox-Neutral Convergent Cascade for Lactonizations with Type II Flavin-Containing Monooxygenase. *Adv. Synth. Catal.* 359. 12:2142–2148.
- Hummel. 1990. Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34. 1.
- Hummel, Gröger. 2014. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *J. Biotechnol.* 191:22–31.
- Hummel, Kula. 1989. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. In: Christen P, Hofmann E, editors. *EJB Reviews 1989*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 85–97.
- Inprakhon, Panlawan, Pongtharankul, Marie, Wiemann, Durand, Sieber. 2014. Toward one-pot lipase-catalyzed synthesis of poly(ϵ -caprolactone) particles in aqueous dispersion. *Colloids Surf., B* 113:254–260.
- Isupov, Schroder, Gibson, Beecher, Donadio, Saneei, Dcunha, McGhie, Sayer, Davenport, Lau, Hasegawa, Iwaki, Kadow, Balke, Bornscheuer, Bourenkov, Littlechild. 2015. The oxygenating constituent of 3,6-diketocamphane monooxygenase from the CAM plasmid of *Pseudomonas putida*: the first crystal structure of a type II Baeyer-Villiger monooxygenase. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 71. Pt 11:2344–2353.
- Jensen, Cartwright, Ward, Hart, Turkenburg, Ali, Allen, Grogan. 2012. A Flavoprotein Monooxygenase that Catalyses a Baeyer-Villiger Reaction and Thioether Oxidation Using NADH as the Nicotinamide Cofactor. *ChemBioChem* 13. 6:872–878.

- Kamerbeek, Janssen, van Berkel, Fraaije. 2003. Baeyer–Villiger Monooxygenases, an Emerging Family of Flavin-Dependent Biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.* 345. 67:667–678.
- Kara, Schrittwieser, Hollmann, Ansorge-Schumacher. 2014. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98. 4:1517–1529.
- Kaufhold, Kopf, Wolff, Beutel, Hilterhaus, Hoffmann, Scheper, Schlüter, Liese. 2012. Generation of Dean vortices and enhancement of oxygen transfer rates in membrane contactors for different hollow fiber geometries. *J. Memb. Sci.* 423-424:342–347.
- Kirkman, Gaetani. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81. 14:4343–4347.
- Kobayashi, Makino. 2009. Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry. *Chem. Rev.* 109. 11:5288–5353.
- Kragl, Aivasidis. 2005. Technology transfer in biotechnology. From lab to industry to production. Berlin: Springer.
- Kragl, Eckstein, Kaftzik. 2002. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13. 6:565–571.
- Kumar, Gross. 2000. Candida antarctica Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature. *Biomacromolecules* 1. 1:133–138.
- Labet, Thielemans. 2009. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* 38. 12:3484.
- Latham, Walsh. 1987. Mechanism-based inactivation of the flavoenzyme cyclohexane oxygenase during oxygenation of cyclic thiol ester substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 109. 11:3421–3427.
- Leigh, Bradley, Purssell, Billson, Hutchins. 2012. A simple, low-cost conductive composite material for 3D printing of electronic sensors. *PLoS one* 7. 11:e49365.
- Leisch, Morley, Lau. 2011. Baeyer–Villiger Monooxygenases: More Than Just Green Chemistry. *Chem. Rev.* 111. 7:4165–4222.
- Lockwood, Bummer, Jay. 1997. Purification of Proteins Using Foam Fractionation. *Pharm. Res.* 14. 11:1511–1515.
- Loos. 2010. Biocatalysis in Polymer Chemistry. Weinheim, Deutschland: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Madeira Lau, van Rantwijk, Seddon, Sheldon. 2000. Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. *Org. Lett.* 2. 26:4189–4191.
- Mahapatro, Kumar, Gross. 2004. Mild, Solvent-Free ω -Hydroxy Acid Polycondensations Catalyzed by Candida antarctica Lipase B. *Biomacromolecules* 5. 1:62–68.
- Malito, Alfieri, Fraaije, Mattevi. 2004. Crystal structure of a Baeyer–Villiger monooxygenase. *PNAS* 101. 36:13157–13162.
- Mallin, Wulf, Bornscheuer. 2013. A self-sufficient Baeyer–Villiger biocatalysis system for the synthesis of ϵ -caprolactone from cyclohexanol. *Enzyme Microb. Technol.* 53. 4:283–287.

- Marcilla, Geus, Mecerreyes, Duxbury, Koning, Heise. 2006. Enzymatic polyester synthesis in ionic liquids. *Eur. Polym. J.* 42. 6:1215–1221.
- Martinelle, Holmquist, Hult. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids* 1258. 3:272–276.
- Michaelis, Menten. 1913. Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49:333–369.
- Michiyo. Novo Industri A/S. 1986. Positionally non-specific lipase from *Candida* sp, a Method for producing it, its use and a recombinant dna process for producing it. WO1988002775 A1.
- Mifsud, Gargiulo, Iborra, Arends, Hollmann, Corma. 2014. Photobiocatalytic chemistry of oxidoreductases using water as the electron donor. *Nat. Commun.* 5:3145.
- Mihovilovic. 2012. Baeyer-Villiger Oxidations. In: Drauz K, Gröger H, May O, editors. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 1439–1485.
- Mihovilovic, Kapitán. 2004. Regiodivergent Baeyer–Villiger oxidation of fused ketone substrates by recombinant whole-cells expressing two monooxygenases from *Brevibacterium*. *Tetrahedron Lett.* 45. 13:2751–2754.
- Miletic, Nastasovic, Loos. 2012. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations. Possibilities, advantages, applications. *Bioresour. Technol.* 115:126–135.
- Mirza, Yachnin, Wang, Grosse, Bergeron, Imura, Iwaki, Hasegawa, Lau, Berghuis. 2009. Crystal structures of cyclohexanone monooxygenase reveal complex domain movements and a sliding cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* 131. 25:8848–8854.
- Moenne, Mouret, Sablayrolles, Agosin, Farines. 2013. Control of bubble-free oxygenation with silicone tubing during alcoholic fermentation. *Process Biochem.* 48. 10:1453–1461.
- Moniruzzaman, Nakashima, Kamiya, Goto. 2010. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochem. Eng. J.* 48. 3:295–314.
- Moulin, Rouch, Serra, Clifton, Aptel. 1996. Mass transfer improvement by secondary flows. Dean vortices in coiled tubular membranes. *J. Memb. Sci.* 114. 2:235–244.
- Mülhaupt. 2013. Green Polymer Chemistry and Bio-based Plastics. Dreams and Reality. *Macromol. Chem. Phys.* 214. 2:159–174.
- Musser. 2000. Cyclohexanol and Cyclohexanone. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Nardini, Dijkstra. 1999. α/β Hydrolase fold enzymes. The family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9. 6:732–737.
- Niefind, Müller, Riebel, Hummel, Schomburg. 2003. The Crystal Structure of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Suggests the Structural Basis of its Metal Dependency. *J. Mol. Biol.* 327. 2:317–328.

- Niefind, Riebel, Müller, Hummel, Schomburg. 2000. Crystallization and preliminary characterization of crystals of R -alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 56. 12:1696–1698.
- Noey, Tibrewal, Jimenez-Oses, Osuna, Park, Bond, Cascio, Liang, Zhang, Huisman, Tang, Houk. 2015. Origins of stereoselectivity in evolved ketoreductases. *PNAS* 112. 51:E7065-72.
- Ollis, Cheah, Cygler, Dijkstra, Frolow, Franken, Harel, Remington, Silman, Schrag, Sussman, Verschueren, Goldman. 1992. The α / β hydrolase fold. *Protein Eng Des Sel* 5. 3:197–211.
- Opperman, Reetz. 2010. Towards Practical Baeyer-Villiger-Monooxygenases: Design of Cyclohexanone Monooxygenase Mutants with Enhanced Oxidative Stability. *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.* 11. 18:2589–2596.
- Pankhania, Stephenson, Semmens. 1994. Hollow fibre bioreactor for wastewater treatment using bubbleless membrane aeration. *Water Res.* 28. 10:2233–2236.
- Poojari, Beemat, Clarson. 2013. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone): thermal properties, recovery, and reuse of lipase B from *Candida antarctica* immobilized on macroporous acrylic resin particles. *Polym. Bull.* 70. 5:1543–1552.
- Putnam, Arvai, Bourne, Tainer. 2000. Active and inhibited human catalase structures. Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296. 1:295–309.
- Rauch, Schmidt, Arends, Oppelt, Kara, Hollmann. 2017. Photobiocatalytic alcohol oxidation using LED light sources. *Green Chem* 19. 2:376–379.
- Razzetti, Fassi, Allegrini, Riva. Dipharma S.p.A. 2007. A process for the preparation of (-) modafinil. EP1777295 A2.
- Reddy, Vivekanandhan, Misra, Bhatia, Mohanty. 2013. Biobased plastics and bionanocomposites. Current status and future opportunities. *Prog. Polym. Sci.* 38. 10-11:1653–1689.
- Reimer, Wedde, Staudt, Schmidt, Höffer, Hummel, Kragl, Bornscheuer, Gröger. 2017. Process Development through Solvent Engineering in the Biocatalytic Synthesis of the Heterocyclic Bulk Chemical ϵ -Caprolactone. *J. Heterocyclic Chem.* 54. 1:391–396.
- Rissom, Schwarz-Linek, Vogel, Tishkov, Kragl. 1997. Synthesis of chiral ϵ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron: Asymmetry* 8. 15:2523–2526.
- Romero, Castellanos, Mattevi, Fraaije. 2016. Characterization and Crystal Structure of a Robust Cyclohexanone Monooxygenase. *Angew. Chem. Int. Ed.*
- Romney, Colvin, Miller. 2014. Catalyst control over regio- and enantioselectivity in Baeyer-Villiger oxidations of functionalized ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 136. 40:14019–14022.
- Ryerson, Ballou, Walsh. 1982. Mechanistic studies on cyclohexanone oxygenase. *Biochemistry* 21. 11:2644–2655.

- Sattler, Fuchs, Mutti, Grischek, Engel, Pfeffer, Woodley, Kroutil. 2014. Introducing an in situ capping strategy in systems biocatalysis to access 6-aminohexanoic acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53. 51:14153–14157.
- Scherkus, Schmidt, Bornscheuer, Gröger, Kara, Liese. 2016. A Fed-Batch Synthetic Strategy for a Three-Step Enzymatic Synthesis of Poly- ϵ -caprolactone. *ChemCatChem* 8. 22:3446–3452.
- Scherkus, Schmidt, Bornscheuer, Gröger, Kara, Liese. 2017. Kinetic insights into ϵ -caprolactone synthesis. Improvement of an enzymatic cascade reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 114. 6:1215–1221.
- Schlegel. 1977. Aeration without air. Oxygen supply by hydrogen peroxide. *Biotechnol. Bioeng.* 19. 3:413–424.
- Schmidt, Büchsenschütz, Scherkus, Liese, Gröger, Bornscheuer. 2015a. Biocatalytic Access to Chiral Polyesters by an Artificial Enzyme Cascade Synthesis. *ChemCatChem* 7. 23:3951–3955.
- Schmidt, Scherkus, Muschiol, Menyes, Winkler, Hummel, Gröger, Liese, Herz, Bornscheuer. 2015b. An Enzyme Cascade Synthesis of ϵ -Caprolactone and its Oligomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54. 9:2784–2787.
- Seelbach, Riebel, Hummel, Kula, Tishkov, Egorov, Wandrey, Kragl. 1996. A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Lett.* 37. 9:1377–1380.
- Stauch, Fisher, Cianci. 2015. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J. Lipid Res.* 56. 12:2348–2358.
- Staudt, Bornscheuer, Menyes, Hummel, Gröger. 2013. Direct Biocatalytic One-Pot-Transformation of Cyclohexanol with Molecular Oxygen into ϵ -Caprolactone. *Enzyme Microb. Technol.* 53. 4:288–292.
- Strzelczyk, Bujacz, Kielbasinski, Blaszczyk. 2016. Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from *Candida antarctica*. *Acta Biochim. Pol.* 63. 1:103–109.
- Sussman, Harel, Frolow, Oefner, Goldman, Toker, Silman. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253. 5022:872–879.
- Torres Pazmino, Riebel, Lange, Rudroff, Mihovilovic, Fraaije. 2009. Efficient biooxidations catalyzed by a new generation of self-sufficient Baeyer-Villiger monooxygenases. *ChemBioChem* 10. 16:2595–2598.
- Uppenberg, Hansen, Patkar, Jones. 1994a. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2. 4:293–308.
- Uppenberg, Patkar, Bergfors, Jones. 1994b. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* 235. 2:790–792.
- Uyama, Kobayashi. 1993. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones Catalyzed by Lipase. *Chem. Lett.* 22. 7:1149–1150.

- Uyama, Takeya, Kobayashi. 1995. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones to Polyesters by Lipase Catalyst. Unusually High Reactivity of Macrolides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 68. 1:56–61.
- van Beek, Gonzalo, Fraaije. 2012. Blending Baeyer-Villiger monooxygenases: using a robust BVMO as a scaffold for creating chimeric enzymes with novel catalytic properties. *Chem. Commun.* 48. 27:3288–3290.
- Watanabe, Uchida, Irie, Katsuki. 2004. Zrbis(salicylidene)ethylenediaminato-mediated Baeyer-Villiger oxidation. Stereospecific synthesis of abnormal and normal lactones. *PNAS* 101. 16:5737–5742.
- Webb. 1992. Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. San Diego: Academic Press. xiii, 862.
- Weckbecker, Hummel. 2006. Cloning, expression, and characterization of an (R)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Biocatal. Biotransform.* 24. 5:380–389.
- Wedde, Rommelmann, Scherkus, Schmidt, Bornscheuer, Liese, Gröger. 2017. An alternative approach towards poly- ϵ -caprolactone through a chemoenzymatic synthesis. Combined hydrogenation, bio-oxidations and polymerization without the isolation of intermediates. *Green Chem* 19. 5:1286–1290.
- Whitman. 1962. The two film theory of gas absorption. *Int. J. Heat Mass Transfer* 5. 5:429–433.
- Wilks, Slonczewski. 2007. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. Rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* 189. 15:5601–5607.
- Willetts. 1997. Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Trends Biotechnol.* 15. 2:55–62.
- Wong, Drucekhammer, Sweers. 1985. Enzymatic vs. fermentative synthesis. Thermostable glucose dehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 107. 13:4028–4031.
- Wong, Gordon, Cooney, Whitesides. 1981. Regeneration of NAD(P)H using glucose-6-sulfate and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Org. Chem.* 46. 23:4676–4679.
- Woodyer, van der Donk, Zhao. 2003. Relaxing the Nicotinamide Cofactor Specificity of Phosphite Dehydrogenase by Rational Design. *Biochemistry* 42. 40:11604–11614.
- Yachnin, McEvoy, MacCuish, Morley, Lau, Berghuis. 2014. Lactone-bound structures of cyclohexanone monooxygenase provide insight into the stereochemistry of catalysis. *ACS Chem. Biol.* 9. 12:2843–2851.
- Yachnin, Sprules, McEvoy, Lau, Berghuis. 2012. The Substrate-Bound Crystal Structure of a Baeyer-Villiger Monooxygenase Exhibits a Criegee-like Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* 134. 18:7788–7795.
- Zopf, Hollister, Nelson, Ohye, Green. 2013. Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer. *N. Engl. J. Med.* 368. 21:2043–2045.