

Bioprozessentwicklung der AMDase katalysierten Synthese von Arylpropionsäure Derivaten

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von
Miriam Aßmann

aus
Lüdenscheid

2019

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Robert Kourist

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2018

Allgemeine Zusammenfassung

Die biokatalytische Prozessführung für enantiomerenreine Produkte stellt eine vielversprechende und umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen chemischen Synthesewegen dar und findet vermehrt Anwendung. Im Fokus der vorliegenden Arbeit lag die Bioprozessentwicklung für die enzymkatalysierte Synthese von Arylpropionsäuren, wie Ibuprofen oder Naproxen.

Der enantioselektive Syntheseschritt wird durch die Arylmalonat Decarboxylase (AMDase) realisiert, welche die Decarboxylierung von aromatischen Dicarbonsäure Derivaten in einer einfachen einstufigen Reaktion katalysiert. Eine Herausforderung war hierbei, die sehr geringe enzymatische Stabilität zu verbessern. Durch Immobilisierung an einen robusten Acrylatträger konnte die Halbwertszeit über 170-fach von 1,2 h auf 8,6 Tage gesteigert werden und so die Produktivität deutlich erhöht werden. Die Immobilisierung des Enzymes aus dem Zelllysate brachte zudem eine Zeit- und Kostenersparnis, da eine Enzymbereinigung eingespart werden kann.

Die kinetische Charakterisierung des immobilisierten Enzymes in Hinsicht auf die Naproxenmalonsäure Umsetzung zeigten einen K_M von $22,1 \pm 0,1$ mM mit einer Aktivitätsausbeute von 40 % gegenüber der Analyse mit freiem Enzym. Der leicht inhibierende Effekt des gebildeten Produktes (K_i von $26,3 \pm 1,4$ mM) führte zur Wahl eines Batch-Modus für die Hochskalierung der Reaktion. Der entwickelte Bioprozess konnte in der Synthese von (*S*)-Naproxen im präparativen Maßstab in zwei verschiedenen Rührkesselreaktoren erfolgreich realisiert werden. In einem normalen, in welchem das immobilisierte Enzym frei in der Reaktionslösung vorliegt und in einem rotierenden Festbettreaktor, in welchem das immobilisierte Enzym durch einen Gittereinsatz im Rührerelement von der Reaktionslösung getrennt vorliegt. In beiden Rührkesselreaktoren konnten mit Umsätzen von über 99,9 % in fünf wiederholten Anwendungen enantiomerenreines (*S*)-Naproxen mit einer Produktivität von über $140 \text{ kg}_{(S)\text{-Naproxen}}/\text{kg}_{\text{Enzym}}$ hergestellt werden (*ee* 99 %). Nach Produktisolierung durch einfache säureinduzierte Fällung und anschließender Trocknung wurden 92 % isolierte Ausbeute an reinem (*S*)-Naproxen gewonnen.

Abstract

Biocatalytic process design for the synthesis of enantiopure products is a promising and environmentally friendly alternative to conventional chemical synthesis routes and will increasingly be used in industry. The focus of this dissertation was the bioprocess development of an enzyme catalyzed synthesis of arylpropionates, such as Ibuprofen or Naproxen.

The enantioselective step of synthesis is, for this purpose, performed by the Arylmalonate Decarboxylase (AMDase), which catalyzes the enantioselective decarboxylation of aromatic dicarbonic acids in a simple one-step reaction. The challenge here was to increase enzymatic stability under process conditions. Through immobilization onto a robust acrylic carrier, a 170-fold increase of stability was achieved, as well as an observed increase in the half-life of the free enzyme from 1.2 hours to a half-life of about 8.6 days of the immobilized enzyme with improved productivity. Additionally, the successful immobilization of the cell lysate led to the decrease in time and money spent on the process –as the enzyme purification step was not necessary anymore– and reveals a more stable enzyme preparation for the bioprocess.

The kinetic characterization of the immobilized enzyme in respect of naproxen malonic acid conversion reveals a K_M of 22.1 ± 0.1 mM with an activity yield of about 40%. The slightly inhibiting effect of the product (K_i of 26.3 ± 1.4 mM) led to the selection of a batch mode for this bioprocess.

The preparative synthesis was realized in two stirred tank reactors. One, in a usual reactor where the immobilized enzyme is freely suspended in the reaction solution, and the other, in a rotating fixed bed reactor in which the enzyme was separated from the reaction mixture located in the stirrer element. In both stirred tank reactors, the synthesis of enantiopure (*S*)-naproxen (*ee* 99%) was realized in five repeated batch experiments with a productivity of $140 \text{ kg}_{(S)\text{-Naproxen}}/\text{kg}_{\text{AMDase-CLGIPL}}$. After product isolation, by an easy acid induced product precipitation and subsequent product-drying, a yield of 92% of enantiopure (*S*)-naproxen was achieved.

Abkürzungsverzeichnis

AMDase	Arylmalonat Decarboxylase
CSTR	Kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (engl. <i>continuous stirred tank reactor</i>)
DAD	Dioden Array-Detektor
DSP	Downstream Prozess
FBP	Flurbiprofen
FBPM	Flurbiprofenmalonsäure
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gas Chromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
Immo	Immobilisiertes Enzym
k_{cat}	Wechselzahl [s^{-1}]
k_{des}	Desaktivierungskonstante [h^{-1}]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante [mM]
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht [g/mol]
NA	Naproxen
NM	Naproxenmalonsäure
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
P	Produkt
PA	Phenyllessigsäure
PFR	Strömungsrohrreaktor (engl. <i>Plug flow reactor</i>)
PM	Phenylmalonsäure
RBR	Rotierender Festbettreaktor (engl. <i>rotating bed reactor</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilyldiazomethan
TTN	Total turnover number [-]
Unit (U)	Einheit der katalytischen Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
x	Ort
τ	Verweilzeit [h]
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit [h]

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Industrielle Biotechnologie.....	1
1.2	Das Zielprodukt: Arylpropionsäure-Derivate	1
1.3	Das Enzym der Wahl: Die Arylmalonat Decarboxylase	3
1.4	Bioprozessentwicklung	6
1.4.1	Rekombinante Herstellung und Gewinnung des Biokatalysators.....	7
1.4.2	Beeinflussende Parameter der Enzymperformance	8
1.4.3	Anwendungsformen und Formulierungen des Biokatalysators	12
1.4.4	Enzymkinetik und Inhibierungsarten.....	14
1.4.5	Reaktortypen.....	17
1.4.6	Analyse der Produktivität des Bioprozesses.....	19
1.5	Zielsetzung.....	21
2	Ergebnisse	24
2.1	Untersuchung der Rahmenbedingungen	24
2.2	Kinetische Charakterisierung der freien Enzymvarianten.....	29
2.2.1	Kinetische Charakterisierung der (<i>R</i>)-selektiven Wildtyp-AMDase.....	30
2.2.2	Kinetische Charakterisierung der (<i>S</i>)-selektive AMDase-CLGIPL.....	31
2.3	Stabilitätsuntersuchung unter Prozessbedingungen	35
2.4	Vergleich verschiedener Enzympräparationen	41
2.4.1	Immobilisierung der AMDase-CLGIPL-Mutante an EziG Träger	43
2.4.2	Optimierungsversuche mit Affinitätsträger	46
2.4.3	Vergleich der verbleibenden Aktivität in wiederholten Batch-Versuchen.....	47
2.5	Optimierungsversuche des kovalent immobilisierten Enzymes.....	50
2.5.1	Immobilisierung des Enzymes aus dem Zellysat	50
2.5.2	Beschichtung des immobilisierten Enzymes mit Polymeren	52
2.5.3	Einsatz von PEG ₆₀₀ in der Synthese mit immobilisierten Enzym.....	55
2.5.4	Temperaturabhängige Prozessstabilität des immobilisierten Enzymes.....	56
2.6	Charakterisierung der immobilisierten AMDase-CLGIPL.....	59
2.6.1	Kinetische Charakterisierung.....	59

2.6.2	Untersuchung auf mögliche externe Stofftransportlimitierungen.....	62
2.6.3	Wahl des geeigneten Reaktorkonzepts.....	64
2.7	Biokatalytische (S)-Flurbiprofen Synthese.....	65
2.7.1	Präparative Synthese von (S)-Flurbiprofen.....	67
2.8	Präparative (S)-Naproxen Synthese mit immobilisiertem Enzym.....	69
2.8.1	Produktisolation.....	73
3	Diskussion und Ausblick.....	77
3.1	Rahmenbedingungen des biotechnologischen Prozesses.....	77
3.2	Kinetische Charakterisierung der freien AMDase.....	78
3.3	Stabilitätsanalyse des freien Enzymes.....	82
3.4	Immobilisierung der AMDase.....	83
3.5	Charakterisierung der immobilisierten AMDase.....	85
3.6	Synthesen im präparativen Maßstab.....	90
3.7	Kritische Einschätzung des biokatalytischen Prozesses.....	92
3.7.1	Stabilität der aromatischen Malonsäure-Derivate.....	92
3.7.2	Möglichkeiten der weiteren Biokatalysator-Optimierung.....	93
3.7.3	Option der <i>in-line</i> Prozess Analytik.....	94
4	Fazit.....	97
5	Material und Methoden.....	98
5.1	Material.....	98
5.1.1	Chemikalien.....	98
5.1.2	Stämme und Plasmide.....	98
5.2	Methoden.....	98
5.2.1	Bereitstellung des Biokatalysators.....	98
5.2.2	Analytische Methoden.....	100
5.2.3	Untersuchung der Rahmenbedingungen für die Bioprozessentwicklung.....	105
5.2.4	Kinetische Charakterisierung des freien Enzymes.....	106
5.2.5	Stabilitätsuntersuchung des freien Enzymes.....	106
5.2.6	Vergleich verschiedener Enzympräparationen.....	107
5.2.7	Immobilisierung der AMDase-CLGIPL-Mutante aus dem Zelllysat.....	109

5.2.8	Wiederverwertbarkeit des immobilisierten Enzymes.....	109
5.2.9	Analyse des Einflusses von PEG ₆₀₀ auf das immobilisierte Enzym.....	109
5.2.10	Beschichtung des Immobilisats und Aktivitätsanalyse	110
5.2.11	Thermischen Stabilität der immobilisierten AMDase-CLGIPL	110
5.2.12	Kinetische Untersuchung des immobilisierten Enzyms.....	111
5.2.13	Untersuchung auf externe Stofftransportlimitierungen	111
5.2.14	Flurbiprofenmalonsäure Synthese in wiederholten Batch-Experimenten	112
5.2.15	Flurbiprofenmalonsäure Synthese im präparativen Maßstab.....	112
5.2.16	Präparative (S)-Naproxen Synthese in wiederholten Batch-Experimenten	112
6	Anhang.....	114
7	Literatur.....	116

1 Einleitung

1.1 Industrielle Biotechnologie

Die biokatalytische Prozessführung für enantiomerenreine Produkte stellt eine vielversprechende und umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen chemischen Synthesewegen dar und findet vermehrt Anwendung. Die enzymatische Synthese bietet viele Vorteile. Enzyme können aus erneuerbaren Quellen hergestellt werden, sind biologisch abbaubar und weisen eine natürliche hohe Selektivität auf. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der umweltfreundlichen Prozessführung, da die Reaktionen unter milden Bedingungen, wie neutralem pH-Wert und niedrigen Temperaturen ablaufen können. Enzyme werden in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt, wie der Einsatz als Futter- oder Lebensmittelzusatzstoff und die technische Enzymanwendung. Hierzu zählen z.B. die Verwendung von Proteasen in der Waschmittelindustrie oder von Lipasen für die organische Synthese (Jemli *et al.* 2016).

Insbesondere bei der Synthese von Feinchemikalien und Pharmaka werden vermehrt selektive Enzyme für die Herstellung von enantiomerenreinen Produkten eingesetzt (Wohlgemuth 2010). Momentan sind mehr als 50 % der industriell realisierten Biotransformationen im Bereich der pharmazeutischen Industrie lokalisiert. Hierbei handelt es sich zu einer Mehrheit um die Produktion von chiralen Molekülen (Straathof *et al.* 2002). Eine interessante Klasse von pharmazeutischen chiralen Molekülen sind α -Arylpropionsäure-Derivate, welche in folgendem Abschnitt 1.2 beschrieben werden.

1.2 Das Zielprodukt: Arylpropionsäure-Derivate

Die α -Arylpropionsäure-Derivate, kurz Profene, werden in der pharmazeutischen Industrie im großen Maßstab hergestellt, da viele Derivate als nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) verwendet werden. Die bekanntesten Vertreter der Profene sind Ibuprofen, Naproxen, Flurbiprofen und Ketoprofen, welche für die Anwendung als Schmerztherapeutikum im Großmaßstab hergestellt werden (Rao & Knaus 2008). Die NSAR Medikamente inhibieren die Cyclooxygenase I und II. Dieses Enzym katalysiert einen entscheidenden Schritt in der Prostaglandin Synthese, welche für die entzündungsauslösende Wirkung im Körper verantwortlich ist (Ulrich *et al.* 2006). Eine Herausforderung ist hierbei die Chiralität dieser Molekülklasse, da meist nur das (*S*)-Enantiomer die gewünschte Wirkung im Organismus hat (Eutomer) und die (*R*)-Form inaktiv ist und nur ein unerwünschtes Nebenprodukt darstellt (Distomer). In Abbildung 1 ist eine allgemeine Struktur der (*R*)- und (*S*)-Arylpropionsäure-Derivate dargestellt.

Es gibt ein Enzym, die 2-Arylpropionyl-Coenzym A (CoA) Epimerase, welche im Körper die Epimerisierung des (*R*)-Enantiomers zu dem (*S*)-Enantiomer von Ibuprofen katalysieren kann (Reichel *et al.* 1996). Dennoch können von dem (*R*)-Enantiomer auch unerwünschte Nebenreaktionen ausgelöst werden und die erforderliche höhere Dosis des Enantiomerengemisches stellt zudem eine erhöhte Belastung für den Organismus dar.



Abbildung 1: Allgemeine Struktur von (*R*)- und (*S*)-Arylpropionsäure-Derivaten.

Die Verwendung von Arylpropionsäuren als schmerzlindernde Medikamente wurde bereits in den 50^{er} und 60^{er} Jahren des 19. Jahrhunderts bei der Suche nach Medikamenten mit anti-rheumatischer Wirkung entdeckt. Diese Suche wurde von dem Unternehmen 'The Boots Pure Drug Company Ltd' beauftragt und von dem Wissenschaftler Stewart Adams durchgeführt (Adams *et al.* 1963; Adams *et al.* 1969). Die neue gefundene Wirkklasse wurde anschließend zum Patent angemeldet (Nicholson & Adams 1961; Nicholson & Adams 1963).

Für die chemische Synthese der optisch reinen Profene werden viele Ressourcen verbraucht, da zusätzlich eine Diastereomeren-Trennung erfolgen muss, deren Ausbeute 50 % nicht übersteigt und das ungewünschte Enantiomer über eine aufwendige Racemisierung wieder gewonnen werden muss. Enzyme stellen eine Möglichkeit dar, diese komplizierten Syntheserouten zu umgehen. Zum einen sind sie von Natur aus selektiv und ermöglichen das Arbeiten unter milden Bedingungen. Die bisherigen konventionellen Synthesen von Profenen beinhalten häufig Reaktionsschritte welche teilweise extreme Reaktionsbedingungen, wie hohe Temperaturen und Chemikalien, benötigen, wie in dem von Walker gestellten Patentanmeldung (Walker 1979). In einem enzymatisch katalysierten Prozess kann der selektive Schritt zum enantiomerenreinen Produkt in einem Schritt unter milden Bedingungen realisiert werden.

Die Arylmonat Decarboxylase, kurz AMDase, kann die selektive Synthese von enantiomerenreinen Arylpropionsäure-Derivaten in einer simplen Einschritt Decarboxylierungsreaktion mit bis zu 100 % Ausbeute synthetisieren (Abbildung 2) (Kourist *et al.* 2011). Die AMDase wird in folgendem Abschnitt 1.3 näher beschrieben.



Abbildung 2: Chemische versus enzymatische Retrosynthese von reinen (S)-Profenen.

1.3 Das Enzym der Wahl: Die Arylmalonat Decarboxylase

Das Enzym Arylmalonat Decarboxylase (AMDase, EC 4.1.1.76) wurde im Jahre 1990 von Miyamoto und Ohta bei der Suche nach Mikroorganismen entdeckt, welche auf Phenylmalonsäuren als Kohlenstoffquelle wachsen können (Miyamoto K. & Ohta H. 1990). Der Stamm wurde als Bakterium der Art *Bordetella bronchoseptica* (*Alcaligenes bronchisepticus*) identifiziert. Die natürliche Rolle der AMDase für den Metabolismus in *B. bronchoseptica* ist noch nicht vollständig geklärt (Miyamoto & Kourist 2016), mit der Analyse des Genoms konnten 212 Gene identifiziert werden, welche an dem Metabolismus von aromatischen Verbindungen beteiligt sind (Yoshida *et al.* 2015a).

Die AMDase wurde auf die asymmetrische Decarboxylierung von α-Aryl-α-methylmalonsäuren zu optisch aktiven α-Arylpropionsäuren analysiert (Miyamoto & Ohta 1991). Die Identifizierung des essentiellen Enzyms, welche für die gewünschte Decarboxylierung verantwortlich ist, erfolgte anschließend in einem Screening mit verschiedenen DNA Fragmenten, welche in Plasmide kloniert und in *E. coli* transformiert wurden. Das Screening auf die gewünschte Enzymaktivität erfolgte in einem Agarplattentest mit Phenylmalonsäure als Substrat. Mit Hilfe des pH Indikators Bromthymolblau konnten aktive Transformanden durch die Blaufärbung identifiziert werden (Wechsel von pH 6,0 gelb auf pH 7,6 blau). Das Gen wurde in einer Untersuchung der Sequenz als 720 Nukleotide großes DNA Fragment identifiziert. Das Gen der AMDase wurde zur besseren Expression und Charakterisierung des Enzymes in *E. coli* kloniert (Miyamoto & Ohta 1992a, 1992b). Die Wildtyp-AMDase besteht aus 240 Aminosäuren und liegt als wasserlösliches Monomer vor (Miyamoto & Ohta 1992b). Die Struktur der AMDase wurde 2008 von Okrasa *et al.* gelöst (Okrasa *et al.* 2008) und steht unter der Protein Data Bank Datei (PDB-Datei) 3DG9 zur Verfügung (Link: <https://www.rcsb.org/structure/3dg9>; abgerufen am 05.08.2018). Die Struktur der AMDase besteht aus zwei viersträngigen, parallelen β-Faltblättern, welche jeweils mit α-Helices umgeben sind, wie in Abbildung 3 dargestellt ist.

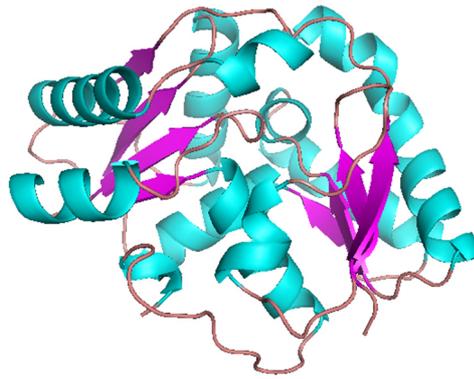


Abbildung 3: Struktur der Wildtyp-AMDase erstellt mit der PDB Datei 3DG9 (Okrasa *et al.* 2008).

In der Umgebung des aktiven Zentrums der Wildtyp-AMDase befindet sich eine Aryl-Bindetasche, eine kleine hydrophobe Tasche und eine Dioxyanion-Tasche (Miyachi *et al.* 2011). Die Dioxyanion-Tasche wurde als die Stelle identifiziert, welche für die katalytische Decarboxylierung essentiell ist. Der Reaktionsmechanismus (Abbildung 4) verläuft über ein planares Enolat-Intermediat, wobei ein Proton von dem Protonendonator Cystein an der Position 188 der Aminosäuresequenz der wtAMDase abstrahiert wird (Lind & Himoto 2014). In der Reaktion findet eine Inversion der Konfiguration an dem α -Kohlenstoff der Carbonylgruppe statt.

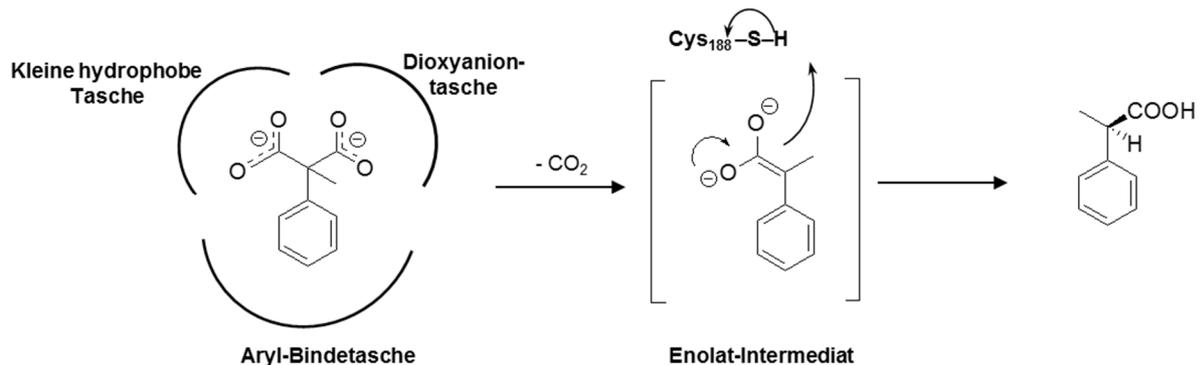


Abbildung 4: Mechanismus der Decarboxylierung durch die AMDase über ein Enolat-Intermediat.

Die AMDase wurde mit verschiedenen Enzymen aus Datenbanken verglichen, wobei Ähnlichkeiten mit Racemasen und Isomerasen gefunden werden konnten (Terao *et al.* 2006a; Terao *et al.* 2006b). Diese zeigen eine umgekehrte Enantioselektivität als die AMDase. Eine genaue Analyse der Aminosäurezusammensetzung der Enzyme deckte auf, dass die verglichenen (*S*)-selektiven Racemasen und Isomerasen an der essentiellen Position 188 im aktiven Zentrum jeweils ein Cystein aufweisen, wie auch die AMDase. Ein auffälliger Unterschied ist an der Position 74 der AMDase zu finden. Während die anderen Enzyme hier ein weiteres Cystein besitzen, trägt die AMDase an dieser Position ein Glycin. Dies ist eine

Erklärung für die unterschiedliche Enantioselektivität der Racemasen und Isomerasen, welche (*S*)-selektiv sind, gegenüber der AMDase, welche (*R*)-selektiv ist (Ijima *et al.* 2005). Durch gezieltes Proteindesign im aktiven Zentrum des Wildtyp-Enzyms konnte die (*R*)-Enantioselektivität zur gewünschten (*S*)-Präferenz verändert werden, wobei der Austausch der Aminosäuren der Positionen G74C und C188G essentiell für die Umkehr der Enantioselektivität ist. Die Aktivität der katalytischen Decarboxylierung der AMDase ist mit dem Einführen der Mutationen jedoch sehr stark abgefallen und besaß nur noch einen Bruchteil des Wildtyp-Enzyms (Ijima *et al.* 2005). Durch Random-Mutagenese und ein Screening, konnte eine Dreifachmutante G74C/C188G/S36N entdeckt werden, die nur einen etwas geringeren Verlust an Aktivität zeigte (Terao *et al.* 2006a). Durch gezielte Mutation an gewünschten Positionen der AMDase ist es möglich, eine Steigerung der Aktivität zu erreichen (Miyuchi *et al.* 2011). Ausgehend von der essentiellen Mutation für die (*S*)-Selektivität (G74C und C188G) konnte eine Enzymvariante durch Engineering der aktiven Tasche generiert werden, die eine 4.700-fache Aktivitätssteigerung in der Substratumsetzung (Naproxenmalonsäure) aufweist (Yoshida *et al.* 2015b). Die optimierte Enzymvariante besitzt sechs Mutationen (G74C/M159L/C188G/V43I/A125P/V156L), wobei alle im aktiven Zentrum lokalisiert vorliegen (Abbildung 5). Innerhalb der hier vorliegenden Dissertationsarbeit wird diese Enzymvariante als **AMDase-CLGIPL** bezeichnet

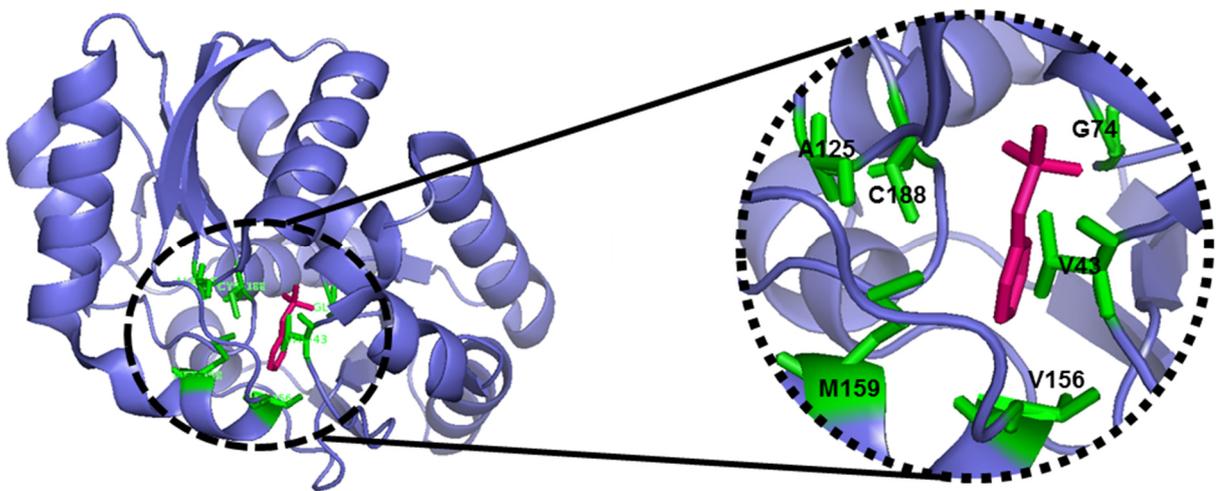


Abbildung 5: Mutationspositionen der (*S*)-selektiven AMDase-CLGIPL basierend auf die frei verfügbare PDB Datei 3IP8 (Okrasa *et al.* 2009) mit komplexiertem Benzylphosphonat im aktiven Zentrum (markiert in Magenta).

Die AMDase ist ein potentieller Kandidat mit welchem in biotechnologischen Verfahren im großen Maßstab, optisch reine Arylpropionsäuren hergestellt werden können. Die aktivitätsgesteigerte AMDase-CLGIPL-Mutante ermöglicht die effiziente und selektive Synthese von enantiomerenreinen (*S*)-Arylpropionsäuren (Abbildung 6).

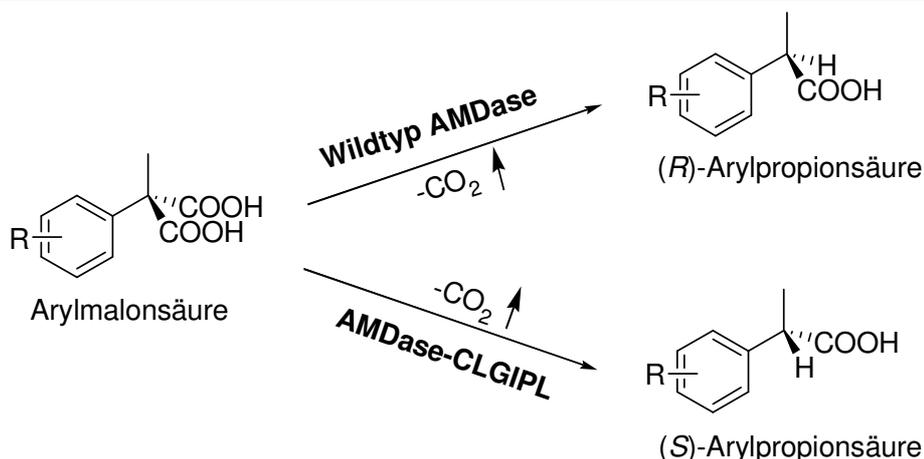


Abbildung 6: Reaktion der Wildtyp-AMDase und der AMDase-CLGIPL-Mutante zu den jeweiligen (R)- und (S)-Arylpropionsäuren.

Die enzymatisch katalysierte Reaktion hat den Vorteil, dass die AMDase als monomeres und cofaktorfrees Enzym die C-C Bindung selektiv spaltet. Bisher sind nur drei cofaktorfrie Decarboxylasen beschrieben: die Orotidine-5'-monophosphat Decarboxylase, die Phenolsäure Decarboxylase und die Arylmalonat Decarboxylase (Miyamoto & Kourist 2016).

Die Bioprozesseentwicklung bringt einige Fragestellungen und Herausforderungen mit sich, wie z.B. die Einsatzform des Biokatalysators oder die Wahl des richtigen Reaktorkonzepts und wird in den folgenden Abschnitten 1.4 bis 1.4.5 näher beschrieben.

1.4 Bioprozessentwicklung

Die Realisierbarkeit der Synthese von interessanten Zielprodukten mittels Enzymkatalyse hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zunächst erfolgt die Wahl einer vielversprechenden Reaktion und eines geeigneten Enzym (Tufvesson *et al.* 2010). Abbildung 7 zeigt schematisch das allgemeine Vorgehen einer Bioprozessentwicklung für die Biotransformation zu einem gewünschten Zielprodukt. Mit dem Entdecken der Arylmalonat Decarboxylase ist der erste Schritt für die Bioprozessentwicklung zur Synthese von optisch reinen Profenen als Zielprodukt dieser Arbeit vollbracht. Für das gewählte Enzym muss zunächst eine effiziente Herstellung etabliert werden (**Abschnitt 1.4.1**). Als nächster Schritt ist es erforderlich, das gewählte Reaktionssystem in Hinsicht auf die optimalen Reaktionsbedingungen zu analysieren. Das ausgewählte Enzym hat einen optimalen Bereich, in welchem die Biokatalyse effektiv ausgeführt werden kann. Hierfür müssen die Rahmenbedingungen des gewählten Reaktionssystems, wie der optimale pH-Wert, die Konzentrationen der Reaktanden und die Temperatur analysiert werden. Diese legen das optimale Prozessfenster fest, unter welchem die Reaktion unter geeigneten Bedingungen realisiert werden kann (**Abschnitt 1.4.2**). Ein

wichtiger Parameter ist hierbei auch die enzymatische Stabilität unter den gewählten Prozessbedingungen, da Enzyme durch verschiedene Einflüssen denaturieren und hierdurch die Aktivität verlieren können. Neben den grundlegenden Untersuchungen der optimalen Reaktionsbedingungen, ist es erforderlich eine Wahl zu treffen, in welchem enzymatischen System (gereinigtes Enzym, immobilisiert etc.) die Reaktion durchgeführt werden soll (**Abschnitt 1.4.3**). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Enzymkinetik der Zielreaktion (**Abschnitt 1.4.4**), um die optimalen Konzentrationen und die Wahl des geeignetsten Reaktorkonzepts bestimmen zu können (**Abschnitt 1.4.5**) (Ringborg & Woodley 2016).

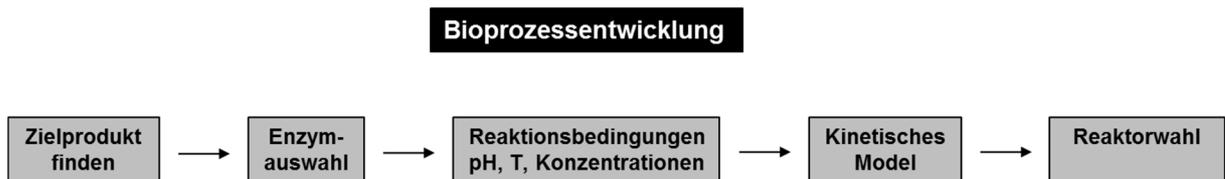


Abbildung 7: Bioprozessentwicklung für die Synthese einer ausgewählten Zielreaktion.

1.4.1 Rekombinante Herstellung und Gewinnung des Biokatalysators

Nach Wahl eines gewünschten Zielenzymes für einen Bioprozess wird eine effiziente Produktion des Biokatalysators angestrebt, da die Prozesskosten stark von der Biokatalysatorproduktion abhängen. Die Entwicklung der Enzymproduktion kann folgendermaßen unterteilt werden (Sarrouh 2012):

- I. Auswahl eines Produktionsstammes
- II. Konstruktion eines überproduzierenden Stammes mittels Gentechnik
- III. Optimierung der Kultivierungsbedingungen
- IV. Enzymisolation

Auswahl eines Produktionsstammes: Für die Herstellung der Enzyme gibt es verschiedene mikrobielle oder eukaryotische Organismen, welche für die Expression verwendet werden können. Welcher Wirt für die Produktion geeignet ist hängt hierbei von dem Zielenzym und dessen Struktur bzw. Modifizierungen ab. Die am häufigsten verwendeten Mikroorganismen für die Produktion sind *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Aufgrund der einfachen Handhabung werden Enzyme oftmals mit *E. coli* Stämmen produziert. Die bakterielle Produktion ist jedoch nicht in jedem Fall geeignet, da z.B. heterologe Proteine mit Modifikationen wie Glykosylierungen oder Lipidierungen dazu neigen Einschlusskörperchen (engl.: *Inclusion Bodies*) zu bilden oder aber die Faltung nicht korrekt ausgeführt wird. Hier ist

die Produktion in einem eukaryotischen Wirt wie *S. cerevisiae* zu bevorzugen (Porro *et al.* 2005).

Konstruktion eines überproduzierenden Stammes mittels Gentechnik: Neben der Wahl des Wirtes muss dieser genetisch modifiziert werden, damit eine Produktion des Zielenzymes ermöglicht wird. Hierbei wird ein Vektor mit Gen des Zielproteins, in den Wirtsorganismus eingebracht. Neben einer geeigneten Antibiotikaresistenz sind effizient arbeitende Promotoren wichtig, um eine hohe Expressionsrate zu gewährleisten.

Optimierung der Kultivierungsbedingungen: Für die Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen und die Herstellung des Biokatalysators müssen möglichst optimale Wachstumsbedingungen gewählt werden, wobei für die Fermentation hohen Zelldichten (50-100g Zelllockengewicht pro Liter) mit bis zu 30 % (w/w) des exprimierten Zielproteins angestrebt werden (Tufvesson *et al.* 2010).

Enzymisolation: Für die Charakterisierung des Enzymes ist es einfacher mit einem gereinigtem Präparat zu arbeiten, da hier keine Nebenreaktionen auftreten können. Die Isolation ist jedoch aufwendig und stellt eine Kostenerhöhung des Prozesses dar und wird für den Endprozess möglichst vermieden. Eine Vereinfachung der Proteinisolation kann durch das Anbringen sogenannter Tags an dem Zielprotein erreicht werden. Hierbei werden die Affinitäten z.B. von chelatbildenden Peptidresten, wie mit einem Hexahistidin-Tag bei der Nickel-Affinitätschromatographie, genutzt (Terpe 2003).

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete AMDase wurde die Enzymproduktion bereits optimiert. Die besten Ergebnisse wurden mit der Enzymherstellung mit dem pET28a Vektor und dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) erhalten. Die Reinigung des hergestellten Enzymes ist hierbei durch einen Hexahistidin-Tag mit einer Nickel-Affinitätschromatographie einfach realisierbar (Gaßmeyer 2015). Diese optimierte Enzymproduktion wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit übernommen und für die Bereitstellung des Biokatalysators angewendet.

1.4.2 Beeinflussende Parameter der Enzymperformance

Die Effektivität des biokatalytischen Prozessschritts hängt von dem Zusammenspiel der enzymatischen Aktivität, Spezifität und Stabilität unter den gewählten Reaktionsbedingungen ab (Abbildung 8). Die Bedingungen bei denen die höchsten Aktivitäten erreicht werden können, sind nicht unbedingt die, bei welchem die enzymatische Stabilität bzw. Spezifität

optimal gegeben sind. Zwischen den Parametern muss ein Kompromissbereich gefunden werden, in dem die Reaktion möglichst effizient ausgeführt werden kann.

Die enzymatische Struktur wird durch eine Vielzahl verschiedener Wechselwirkungen, wie ionische und hydrophobe Bindungen, gebildet. Wobei die Struktur, insbesondere in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums, einen essentiellen Einfluss auf die enzymatische Spezifität und Aktivität hat. Demensprechend haben Faktoren, wie pH Wert oder Temperatur einen Einfluss auf die enzymatische Umsatzleistung. Typischerweise haben Enzyme einen optimalen pH- und Temperaturbereich in welchem die Reaktion am effizientesten ausgeführt werden kann. Die Umsatzraten steigen mit zunehmenden Temperaturen zunächst an und durchlaufen einen optimalen Temperaturbereich. Bei weiterer Temperaturerhöhung ist oftmals eine Erniedrigung der enzymatischen Aktivität zu beobachten (Daniel & Danson 2013). Proteine bestehen aus verschiedenen Aminosäureresten, welche verschiedene Polaritäten und Eigenschaften aufweisen. Dementsprechend besitzen Enzyme ebenfalls einen optimalen pH Bereich.

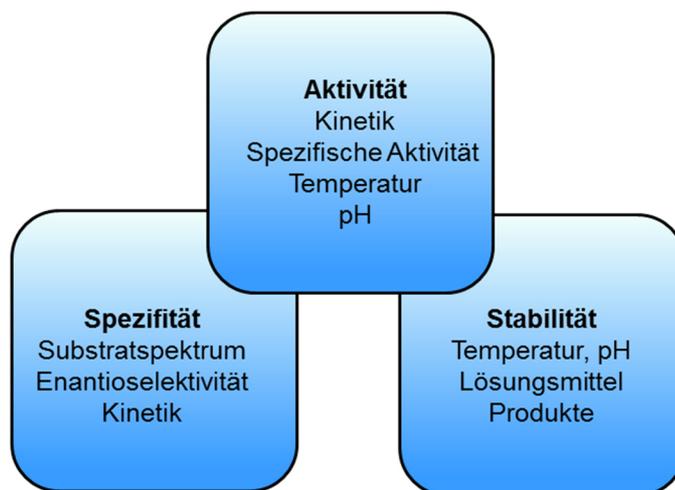


Abbildung 8: Enzymatische Parameter für die Prozessentwicklung.

Die Enzym-Performance ist von der Aufrechterhaltung der enzymatischen Struktur abhängig, jedoch kann diese durch verschiedene Faktoren verändert und das Enzym dadurch inaktiviert werden. Bei der Enzymdesaktivierung entfaltet die tertiäre gefaltete Enzymstruktur (thermodynamische Stabilität), wodurch die katalytische Aktivität verloren geht (kinetische Stabilität) ((Polizzi *et al.* 2007). Die inaktive ungefaltete Struktur kann entweder reversibel zurückgefaltet werden oder denaturiert vollständig. Hierbei kann sich z.B. ein Random Coil ausbilden, bei welchem die Struktur zufällig ungeordnet ist oder die Peptidkette wird weiter zersetzt. In beiden Fällen geht Aktivität irreversibel verloren (Iyer & Ananthanarayan 2008). Die Inaktivierung kann auf verschiedene Weise verursacht werden, wie beispielsweise durch

Einleitung

Hitze oder mechanische Kräfte. In Tabelle 1 befinden sich häufige Denaturierungsursachen und deren proteinogene Angriffsstelle (Chmiel 2011).

Tabelle 1: Häufige Ursachen der Protein Denaturierung und deren Angriffsorte (Chmiel 2011).

Denaturierung durch	Angriffsort	Proteinform
Physikalisch		
Hitze	Wasserstoffbrücken	hochgradig ungeordnet/ Aggregate
Kälte	hydrophobe Bindungen solvatisierte Gruppen	Aggregate/ Monomere
Mechanisch	solvatisierte Gruppen eingeschlossene Volumina	hochgradig ungeordnet/ Monomere
Strahlung	funktionelle Gruppen (z. B. cySH, Peptidbindungen)	Aggregate
Chemisch		
Säuren	verborgene ungeladene Gruppen (z. B. his, Peptidbindungen)	vollständig denaturiert
Laugen	verborgene ungeladene Gruppen (z. B. tyr, cySH, cySH ₂)	vollständig denaturiert
Salze	polare und nicht-polare Gruppen	hochgradig ungeordnet
Organische Lösungsmittel	unpolare Gruppen	hochgeordnete Peptidkette mit großen helikalen Bereichen
Detergenzien	hydrophobe Bereiche (alle Detergenzien) und geladene Gruppen (ionische Detergenzien)	unvollständig ungeordnet, große helikale Bereiche
Biologische		
Proteasen	Peptidbindung	Oligopeptide, Aminosäuren

Da die Stabilität einen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der biokatalytischen Reaktion hat, sollte diese unter den gewählten Bedingungen möglichst hoch sein. Zur Ermittlung der enzymatischen Stabilität kann die Halbwertszeit $\tau_{1/2}$, bei welchem noch 50 % der anfänglichen Aktivität vorhanden sind, verwendet werden. Diese kann mit Hilfe der Bestimmung der Desaktivierung des Enzymes über die Prozessdauer analysiert werden. Der Verlust der Aktivität folgt häufig einem exponentiellen Abfall, wie beispielhaft in Abbildung 9 gezeigt. Die

Werte der Desaktivierung können mit Hilfe von Annäherungen der experimentellen Daten mit einem Fit ermittelt werden (Liese & Hilterhaus 2013; Rogers & Bommarius 2010).

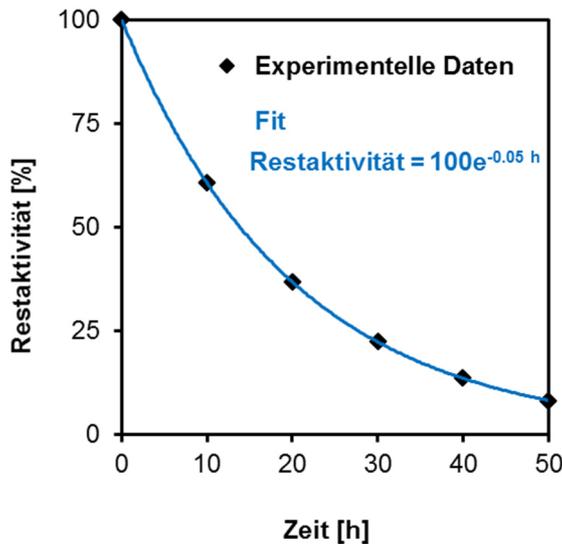


Abbildung 9: Exponentieller Verlauf der enzymatischen Aktivitätsabnahme über die Zeit.

Aus der abfallenden enzymatischen Restaktivität können die Parameter zur Beschreibung der enzymatischen Stabilität ermittelt werden. Bei der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung kann die Desaktivierung im Exponenten abgelesen werden (Gleichung 1):

$$\text{Restaktivität} = A_0 \left[\frac{U}{mg} \right] * e^{k_{des}[h^{-1}] * x}$$

Gleichung 1

A_0 [U/mg_{Enzym}] Anfangsaktivität (Prozessstart)
 k_{des} [h⁻¹] Desaktivierungskonstante

Die Halbwertszeit kann durch folgende Gleichung 2 ermittelt werden:

$$t_{1/2}[h] = \frac{\ln 2}{k_{des}[h^{-1}]}$$

Gleichung 2

Die Stabilität variiert stark bei verschiedenen Enzymen mit Halbwertszeiten von beispielsweise 0,16 h für Subtilisin S41 aus *Antarctic Bacillus* TA41 (Miyazaki *et al.* 2000) oder 48 h für eine thermostabile Lipase aus *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 (Royter *et al.* 2009). Der Grund der starken Stabilitätsunterschiede ist –neben den Einflüsse von außen– die Enzymstruktur selbst und diese hängt von der Aminosäurezusammensetzung ab. Dementsprechend ist es möglich die Stabilität durch Enzym Engineering, durch gezielte Aminosäureaustausche, zu steigern. Hierbei sind die destabilisierenden Aminosäurereste meist weit entfernt vom aktiven Zentrum oder auf der Oberfläche lokalisiert, während die Optimierung der Aktivität und Selektivität, ein Engineering im Bereich der aktiven Tasche benötigen (Morley & Kazlauskas 2005). Neben der enzymatischen Struktur spielt ebenfalls die

Art der Anwendungsform des Biokatalysators eine wichtige Rolle für die Stabilität und Realisierbarkeit des Bioprozesses und wird in folgendem Abschnitt 1.4.3 näher beschrieben.

1.4.3 Anwendungsformen und Formulierungen des Biokatalysators

Der Einsatz des Biokatalysators in den Prozessen kann mit verschiedenen enzymatischen Präparationen erfolgen. Das Enzym kann als (i) Ganzzell-Biokatalysator in dem mikrobiellen Wirt, (ii) in dem Zellysats oder auch als (iii) aufgereinigtes Enzym eingesetzt werden (Woodley 2006), wie schematisch in (Abbildung 10) gezeigt. Die Kosten für die verschiedenen Anwendungsformen steigen jedoch stark mit der Komplexität der hierfür benötigten Aufarbeitungsschritte. Während die Kosten für den Einsatz mit ganzen Zellen, in welchen das Enzym exprimiert wurde, bei ca. 100 € pro kg liegen, verdoppelt bereits das Aufschließen der Zellen, für die Verwendung des Zellysats, die Kosten. Die Enzymaufreinigung, z.B. chromatographisch, lässt den Preis für den Bioprozess um das 10-fache gegenüber der Verwendung der ganzen Zellen ansteigen, was unter anderem an dem benötigten Säulenmaterial und den verwendeten Reagenzien liegt (Tufvesson *et al.* 2011).

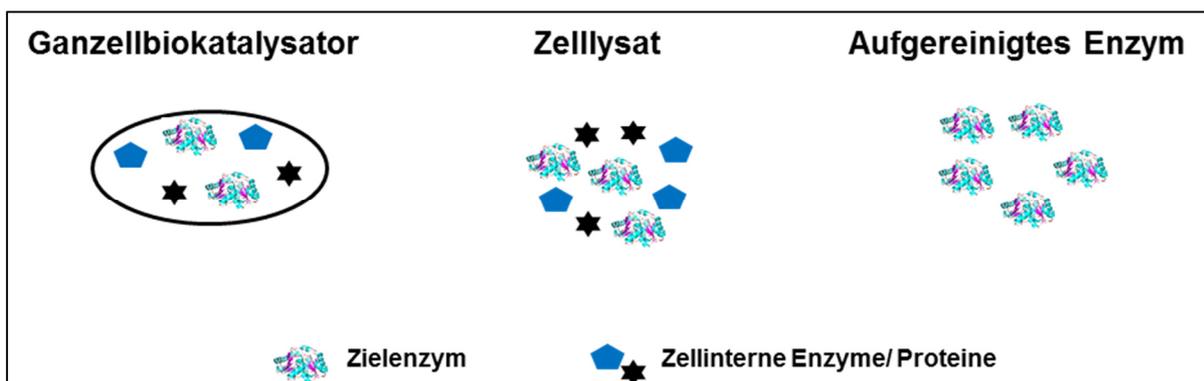


Abbildung 10: Anwendungsmöglichkeiten des Biokatalysators.

Diese Einordnung der möglichen Biokatalysator-Anwendungsformen, kann noch weiter unterteilt werden, wie z.B. durch Immobilisierung der verschiedenen Präparationen als weitere Formulierung. Das Ziel für die Bioprozessentwicklung ist es den Zeitaufwand und die Kosten möglichst gering zu halten und mit der einfachsten biokatalytischen Anwendung zu arbeiten. Die einfachste und kostengünstigste Möglichkeit, wie oben erwähnt, ist der Einsatz von ganzzellbiokatalytischen Systemen. Jedoch sind diese Systeme nicht in jedem Fall für den angestrebten Prozess geeignet. Der mikrobielle Wirt bringt einige Nachteile mit sich, wie teilweise eine geringe Lösungsmitteltoleranz, der Sensitivität zu hohen Konzentrationen oder die Möglichkeit von unerwünschten Nebenreaktionen, katalysiert durch mikrobielle Proteine.

Zudem sind viele Enzyme cytosolisch, wodurch die Zellwand der Mikroorganismen eine Barriere, insbesondere bei der Umsetzung von sperrigen Reaktanden, darstellt.

Ist der Prozess nicht mit dem Enzym als Ganzzellbiokatalysator realisierbar, wie es teilweise bei hochreinen pharmazeutischen Präparaten erforderlich ist, dann ist zur Kostenreduktion ein möglichst stabiler und nach Möglichkeit einfach rezyklierbarer Biokatalysator erforderlich (Pollard & Woodley 2007). Der Biokatalysator kann z.B. durch eine Membran von der Reaktionslösung separiert werden, was eine Rezyklierung ermöglicht oder das Enzym kann zur erleichterten Wiederverwendung und enzymatischen Stabilisierung an robuste Trägermaterialien immobilisiert werden (Sheldon & van Pelt 2013). Dies erleichtert die Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators für eine erneute Synthese und führt zu einer höheren Reinheit des Endproduktes in der Aufarbeitung im Downstream Prozess (DSP), da dieses frei von enzymatischen Resten aus der Biokatalyse ist (Klibanov 1983).

Die Immobilisierung des Enzymes kann auf verschiedene Wege erreicht werden. Die häufigsten Immobilisierungsmethoden sind die Anbindung an einen festen Träger, der enzymatische Einschluss in eine Matrix oder die Immobilisierung des Enzymes durch eine Quervernetzung durch sogenannte CLEAS (Quervernetzte Enzym Aggregate, engl.: *Crossed linked enzyme aggregates*) (Hanefeld *et al.* 2009). Die verschiedenen Methoden sind in folgender Abbildung 11 schematisch dargestellt.

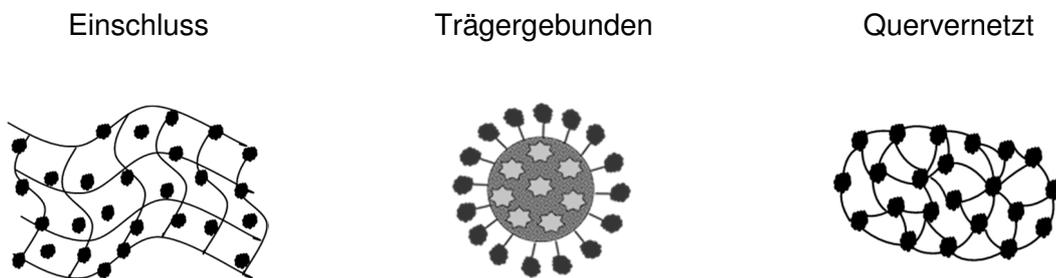


Abbildung 11: Biokatalysator Immobilisierungsvarianten.

Die Immobilisierung an feste Trägermaterialien kann ebenfalls auf verschiedene Weise realisiert werden (Abbildung 12). Hierbei kann zunächst zwischen reversibler und irreversibler Anbindung unterschieden werden. Bei der irreversiblen Immobilisierung wird das Enzym über spezifische kovalente Bindung der Aminosäureseitenketten (Lysine, Cysteine, Asparaginsäure oder Glutaminsäure) über stabile Verbindungen (Amide, Thioether oder Carbamate) an das Träger Material angebunden (Mohamad *et al.* 2015). Bei der reversiblen Anbindung ist die üblichste Immobilisierungsvariante die Adsorption durch ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen (Guisan 2006). Eine weitere Methode ist über Disulfidbindungen mit Cystein Seitenketten des Enzyms (Simons *et al.* 2013). Die Anbindung des Enzymes über eine

Komplexverbindung an Metallionen-Affinitätsträger, wie sie z.B. bei der Aufreinigung mit His₆ Tag angehängten Proteinen zum Einsatz kommt, ist ebenfalls eine weitere reversible Anbindungsmöglichkeit (Engelmark Cassimjee *et al.* 2014).

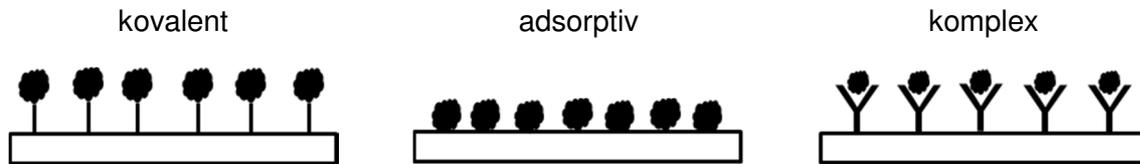


Abbildung 12: Anbindungstypen der Immobilisierung an Träger.

Neben dem Anbindungstyp ist ebenfalls die Beschaffenheit des Trägers, wie die Hydrophobizität der Oberfläche, die Größe der Poren und die Größe des Trägers ein wichtiges Auswahlkriterium für die ideale Wahl für den angestrebten Prozess (Datta *et al.* 2013). Neben der Wahl der geeigneten Biokatalysator Anwendungsform und einer hohen Stabilität ist die Enzymkinetik ein essentieller Part für die Bioprozessentwicklung und wird in folgendem Abschnitt 1.4.4 beschrieben.

1.4.4 Enzymkinetik und Inhibierungsarten

Die Kinetik einer enzymatischen Reaktion wurde erstmals von Michaelis-Menten im Jahre 1913 eingeführt (Michaelis & Menten 1913). Die Enzymkinetik beschreibt den Zusammenhang der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Ein typischer Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ist in Abbildung 13 gezeigt.

Die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Substratkonzentration zu und erreicht ab einer bestimmten Konzentration einen maximalen Wert (v_{max}) der nicht weiter überschritten wird. Hier sind alle aktiven Zentren der Enzyme mit Substrat gesättigt und die Geschwindigkeit hängt nur von der Umsetzungsgeschwindigkeit der Reaktion ab. Die Substratkonzentration bei welcher die halbmaximale Aktivität erreicht ist ($v_{max}/2$) beschreibt die Affinität des Enzymes zum betrachteten Substrat und wird als Michaelis-Menten-Konstante (K_M) bezeichnet. Je niedriger der Wert für K_M ist, desto schneller wird die maximale Umsatzrate erreicht und desto höher ist dementsprechend die Affinität des Enzymes zum Substrat.

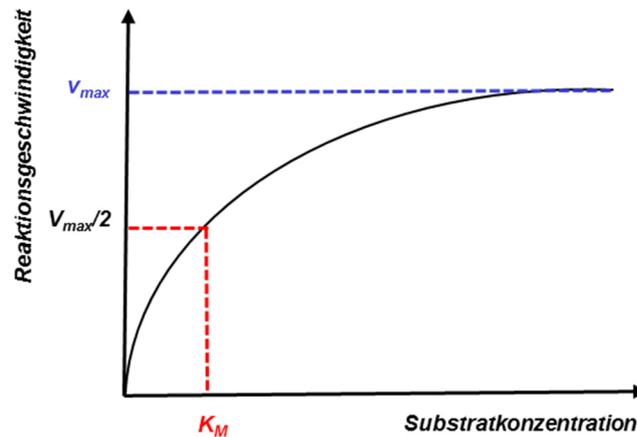


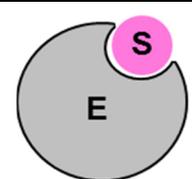
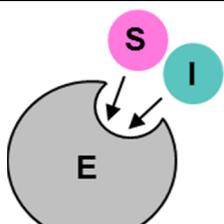
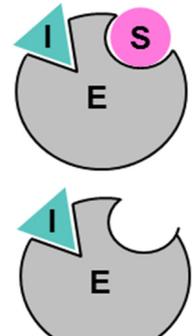
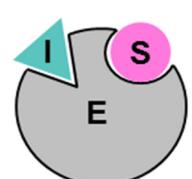
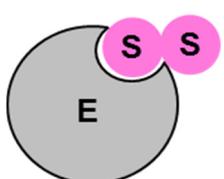
Abbildung 13: Typischer Verlauf der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration.

Neben dem Sättigungsverhalten einer enzymatisch katalysierten Reaktion besteht die Möglichkeit, dass die Reaktion durch Inhibitoren an der maximalen Umsetzung gehemmt werden kann. Diese können andere Substanzen sein, welche nicht an der eigentlichen Reaktion beteiligt sind, aber auch das Substrat oder die gebildeten Produkte selbst. Die Hemmung der Reaktion hat einen Einfluss auf die Kinetik der Reaktion und kann reversibel oder aber auch irreversibel sein.

In folgender Tabelle 2 sind die häufigsten Inhibitortypen mit dem Einfluss auf das Michaelis-Menten Verhalten zusammengefasst. Einer der häufigsten Inhibitortypen ist die kompetitive Inhibition, wobei das Substrat hier meist eine ähnliche Struktur wie der Inhibitor aufweist. Hierbei steht der Inhibitor mit dem Substrat in direkter Konkurrenz um die aktive Tasche des Enzymes. Die maximale Umsatzrate v_{max} kann dennoch bei einem Überschuss an Substrat erreicht werden, da hierbei der Inhibitor zunehmend verdrängt wird. Ein weiterer Inhibitortyp ist die nichtkompetitive Inhibierung. Hier bindet der Inhibitor nicht an der aktiven Tasche des Enzymes, sondern an anderer Position, wobei der Inhibitor sowohl am Enzym-Substrat Komplex, als auch an dem Enzym ohne Substrat anbinden kann. Die Auswirkung ist eine Verringerung der maximalen Umsatzrate, wobei der Wert für K_M unverändert bleibt. Bei der unkompetitiven Inhibierung kann der Inhibitor hingegen nur an dem Enzym-Substrat Komplex anbinden und verhindert so die Umsetzung zum Produkt. v_{max} ist durch die Inhibierung verringert, wobei der Wert für K_M durch diesen Inhibitortyp zu geringeren Konzentrationen verschoben ist und die Affinität des Enzymes scheinbar höher ist. Neben der Inhibierung durch andere Moleküle beziehungsweise durch das Produkt besteht zudem die Möglichkeit, dass die Reaktion durch einen Überschuss an Substrat an der Reaktion gehemmt ist. Dies ist vor allem durch die Blockierung der aktiven enzymatischen Tasche an überschüssigen Substrat zu erklären, welcher das Eintreten/Austreten an Reaktanden behindert. Bei diesem Spezialtyp der unkompetitiven Inhibierung steigt die Geschwindigkeit

ebenfalls zunächst mit Erhöhung der Substrat Konzentration an, erreicht dann einen maximalen Wert und fällt bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration allerdings wieder ab.

Tabelle 2: Verschiedene Inhibitortypen und die Auswirkung auf die kinetischen Parameter.

<p>Ohne Inhibierung</p> $v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_{M,S} + [S]}$		<ul style="list-style-type: none"> • Normaler ungehemmter Umsatz zum Produkt
<p>Kompetitive Inhibierung</p> $v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_{M,S} \times (1 + \frac{[I]}{K_{i,I}}) + [S]}$		<ul style="list-style-type: none"> • Konkurrenz um aktives Zentrum • v_{max} unverändert • K_M zu höheren Werten verschoben
<p>Nichtkompetitive Inhibierung</p> $v = \frac{v_{max} \times [S]}{(K_{M,S} + [S]) \times (1 + \frac{[I]}{K_{i,I}})}$		<ul style="list-style-type: none"> • Inhibitor bindet an Enzym oder Enzym-Substrat Komplex • v_{max} erniedrigt • K_M unverändert
<p>Unkompetitive Inhibierung</p> $v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_{M,S} + [S] \times (1 + \frac{[I]}{K_{i,I}})}$		<ul style="list-style-type: none"> • Inhibitor bindet nur an Enzym-Substrat Komplex • v_{max} erniedrigt • K_M erniedrigt
<p>Substratüberschussinhibierung</p> $v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_{M,S} + [S] \times (1 + \frac{[S]}{K_{i,S}})}$		<ul style="list-style-type: none"> • Substrat ist inhibierend • Spezialtyp unkompetitive Inhibierung • K_M erniedrigt • v_{max} erniedrigt und sinkt bei weiterer Substrat Erhöhung

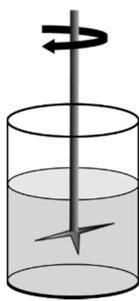
Die Analyse der enzymatischen Kinetik ist wichtig, um eine richtige Wahl eines Reaktorkonzepts für die optimale Umsetzung der Biokatalyse zu treffen und wird in folgendem Abschnitt 1.4.5 ausgeführt.

1.4.5 Reaktortypen

Für die Biokatalyse stehen grundlegend drei Reaktortypen zur Verfügung, die sich in ihrem Aufbau und in den Konzentrationsverläufen während der Reaktion unterscheiden (Abbildung 14).

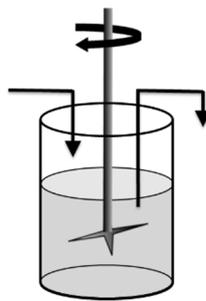
Rührkesselreaktor

(STR)



Kontinuierlicher Rührkesselreaktor

(CSTR)

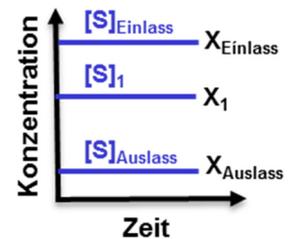
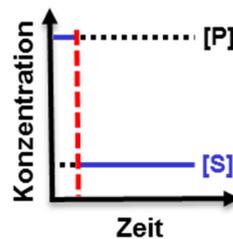
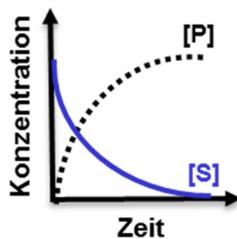


Strömungsreaktor

(PFR)



Konzentrationsverläufe über die Zeit



Konzentrationsverläufe über den Ort

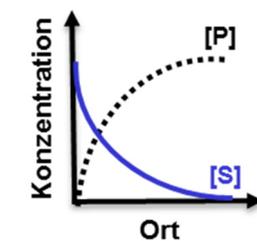
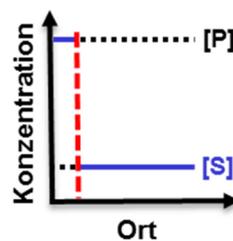
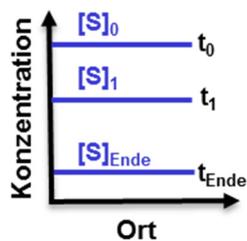


Abbildung 14: Übersicht der verschiedenen idealen Reaktortypen mit Konzentrationsverläufen über die Zeit und über den Ort.

Die Konzentrationsprofile der Substrate und Produkte sind in den verschiedenen gezeigten idealen Reaktortypen unterschiedlich. Signifikant bei den kontinuierlich betriebenen Reaktoren (CSTR und PFR) ist das konstante Konzentrationsprofil in Abhängigkeit von der Zeit bei Vorliegen eines Gleichgewichtszustandes (*Steady State*) im Reaktor. Während die Konzentrationen im PFR unmittelbar nach Durchfließen konstant verbleiben, muss im CSTR zum Erreichen des *steady state* eine Anlaufphase in Kauf genommen werden, bis die Ein- und Auslasskonzentrationen konstante Werte angenommen haben (in Abbildung 14 rot markiert). Zur Gewährleistung des Gleichgewichtszustandes wird eine Zeit von mindestens fünf Verweilzeiten angenommen bis die Produktlösung nach durchtreten des CSTR aufgefangen werden kann. Eine Verweilzeit ist hierbei definiert als (Gleichung 3):

$$\tau [\text{h}] = \frac{V[\text{L}]}{F \left[\frac{\text{L}}{\text{h}} \right]}$$

Gleichung 3

Mit:

τ [h] Verweilzeit

V [L] Volumen

F [L/h] Flussrate

Während in den kontinuierlichen Reaktortypen die Konzentrationsprofile linear verlaufen, kann bei dem Rührkesselreaktor im Satzbetrieb ein typischer Verlauf mit Anstieg der Produktkonzentration und entsprechender Abnahme der Substratkonzentration beobachtet werden. Bei den Konzentrationsverläufen über den Ort des Reaktors ist in dem Rührkesselreaktor sowohl im kontinuierlichen Betrieb als auch im Satzmodus ein linearer Konzentrationsverlauf vorhanden. Bei dem PFR gibt es hingegen einen Konzentrationsgradienten über den Verlauf des Säulenvolumens. Im Einlass ist nur das Substrat vorhanden und wird (idealerweise) im Verlauf des Flusses über das Säulenbett vollständig zum Produkt umgesetzt.

Diese grundlegenden idealen Hauptreaktortypen können in einer Vielzahl von Varianten eingesetzt werden, wie beispielsweise mit mehreren Batch-Reaktoren in Kaskadenreaktionen, mit rotierenden Festbettreaktoren mit separiertem Enzym oder Enzymmembranreaktoren, wo das lösliche Enzym von der Reaktionslösung abgetrennt durch eine Membran vorliegt. Der Batch-Betrieb im Rührkesselreaktor ist wegen seines simplen Aufbaus und der einfachen Handhabung das meist verwendete Reaktorkonzept. Ein Nachteil hier ist jedoch die niedrige volumetrische Produktivität und das der Biokatalysator, speziell im Fall des Einsatzes von Immobilisaten, der mechanischen Belastung durch das Rühren ausgesetzt ist und hierdurch beschädigt werden kann (Hilterhaus *et al.* 2008).

Die Wahl, welcher Reaktor letztendlich für die Biokatalyse zum Einsatz kommt, hängt von den Kosten, dem Platz, Massentransfer, der Kinetik, der Handhabbarkeit und der Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators ab. Bei einer Substratüberschussinhibierung würde sich beispielsweise ein CSTR gut eignen, da hier die Substratkonzentration gering ist. Bei einer Produktinhibierung hingegen wäre dieser Reaktortyp denkbar ungeeignet, weil die Reaktion unter Auslauf Bedingungen mit hohen Produkttitern verläuft. Hier sind für die Synthese der PFR oder der STR die geeignete Wahl als Reaktorkonzepts (Andrić *et al.* 2010).

1.4.6 Analyse der Produktivität des Bioprozesses

Alle Schritte zur Realisierung des gesamten Prozesses unterliegen kritischen Parametern die es zu beachten gilt, um einen möglichst effizienten Prozess zu gestalten. Für die Fermentation sollte eine hohe Zelldichte mit einer hohen Expression des Zielproteins erreicht werden. Zudem sind die Kosten für das Wachstumsmedium minimal zu halten. Bei der Isolierung des Enzyms müssen die gewonnene Aktivität des Enzymes und die Materialkosten berücksichtigt werden. Bei der Biokatalysatorpräparation, wie z.B. der Immobilisierung, müssen die Kosten für den Träger und die erhaltene Aktivität beachtet werden. Bei dem Hauptprozessschritt –der Biokatalyse zum Zielprodukt– sind die kritischen Parameter die volumetrische Produktivität, die Produktkonzentration und der Biokatalysatorverbrauch für die Produktion. Als letzten Prozessschritt sollte eine möglichst kostengünstige Produktaufarbeitung erreicht werden (Tufvesson *et al.* 2010).

Ein Parameter, welcher für die Anwendbarkeit des Enzymes verwendet werden kann, ist die *total turnover number* (TTN). Dies ist eine dimensionslose Kennzahl, welche die Gesamtzahl an Molekülen angibt, welche von einem Enzym in der Gesamtlebensdauer unter Berücksichtigung der enzymatischen Desaktivierung umgesetzt werden können. Die Berechnung kann mit Hilfe der Werte der katalytischen Aktivität und der Desaktivierung nach Gleichung 4 erfolgen:

$$TTN [-] = \frac{k_{cat} [h^{-1}]}{k_{des} [h^{-1}]}$$

Gleichung 4

Mit:

$k_{cat} [h^{-1}]$ Wechselzahl

$k_{des} [h^{-1}]$ Desaktivierungskonstante

Typische TTN-Werte für repräsentative Biokatalysatoren liegen zwischen $1,15 \times 10^4$ für die Glucose Dehydrogenase V227A Mutante aus *Bacillus subtilis* und $2,71 \times 10^7$ für Subtilisin 3-2G7 aus *Antarctic Bacillus* TA41 (Rogers & Bommarius 2010).

Neben der TTN stellt die Produktivität einer angestrebten Biotransformation einen weiteren wichtigen Faktor zur Ermittlung der Prozessrealisierbarkeit dar. Diese beschreibt das Mengenverhältnis des gebildeten Zielproduktes pro eingesetzter Enzymmenge ($\text{kg}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{Enzym}}$). Die Menge an Biokatalysator, welcher für die Synthese zum Einsatz kommen kann, hängt stark von dem Zielprodukt und dessen Marktwert ab. Für die Produktion von Bulkchemikalien mit einem geringen Verkaufswert kann nur wenig Enzym eingesetzt werden, um eine geeignete Produktivität zu erreichen, welche mit den chemischen Herstellungsverfahren mithalten kann. Im pharmazeutischen Bereich sind die Produktpreise, mit teilweise über $100 \text{ €/kg}_{\text{Produkt}}$, sehr viel höher, was die Investition in die Bioprozessentwicklung als umweltfreundliche Herstellungsalternative sehr viel attraktiver macht (Tufvesson *et al.* 2011). In Abbildung 15 ist eine Übersicht verschiedener Chemikalienkategorien (Bulk bis Pharma) den verschiedenen Produktivitätsbereichen zugeordnet, in welchen der Bioprozess in einem kosteneffektiven Rahmen realisiert werden kann.

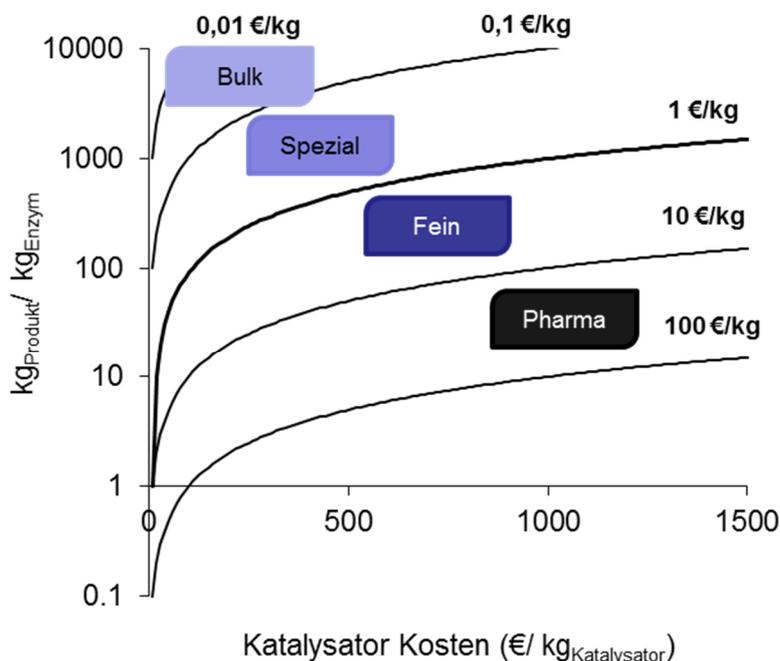


Abbildung 15: Effekt der Biokatalysator Kosten und möglichen Kostenverteilungen für die erforderlichen Biokatalysator Produktivitäten im Bereich der Bulk-,Spezial-, Fein- und Pharmachemikalien Produktion mit immobilisiertem Enzym. Modifiziert nach (Tufvesson *et al.* 2011).

Je nachdem welche enzymatische Präparation gewählt wurde, ist es erforderlich eine entsprechend hohe Produktivität zu erreichen. Im Bereich der biokatalytischen Herstellung von Pharmaka, wozu die Zielproduktklasse der α -Arylpropionsäurederivate zählt, liegen die gewünschten Produktivitäten bei (Tufvesson *et al.* 2011):

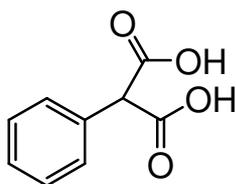
(i) Ganzzellbiokatalysator:	10–35	$\text{kg}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{Zellrockengewicht}}$
(ii) Aufgereinigtes Enzym:	100–250	$\text{kg}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{freies Enzym}}$
(iii) Immobilisiertes Enzym:	50–100	$\text{kg}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{immobilisiertes Enzym}}$

Welche Produktivitäten am Ende der Bioprozessentwicklung erreicht werden müssen, entscheidet letztendlich wie der Prozess realisiert werden kann und wird hier im Rahmen dieser Dissertation detailliert präsentiert.

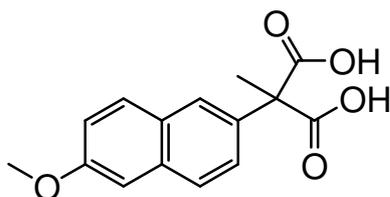
1.5 Zielsetzung

Die biokatalytische Herstellung von enantiomerenreinen Produkten ist eine vielversprechende Alternative gegenüber herkömmlichen chemischen Syntheseverfahren. Mit dem Enzym der Arylmalonat Decarboxylase ist der Grundstein für die Möglichkeit der enantiomerenreinen Arylpropionsäuresynthese gelegt. Diese sind für die pharmazeutische Industrie von großer Bedeutung, da sie im Großmaßstab als Schmerzmittel eingesetzt werden. Ziel dieser Arbeit ist es einen umweltfreundlichen biokatalytischen Prozess für die Synthese von Profenen mittels des Enzymes Arylmalonat Decarboxylase (AMDase) zu entwickeln. Die Forschung ist dem DBU-geförderten Projekt AZ30818-32 mit dem Projektthema *Asymmetrische Synthese von Profenen* zugeordnet. Hierbei ist ein Projektpartner, die Chiracon GmbH (Luckenwalde, Deutschland), für die Bereitstellung der nicht kommerziell erhältlichen Substrate Naproxenmalonsäure und Flurbiprofenmalonsäure verantwortlich (Abbildung 16). Ein weiterer Partner, die Arbeitsgruppe von Prof. Robert Kourist (Ruhr Universität Bochum, Deutschland), ist für die Bereitstellung der AMDase-Varianten, sowie das Enzym-Engineering zuständig. Neben den bereitgestellten Substraten wurde die Reaktion zudem, insbesondere für Screeningzwecke in Hinsicht auf Reaktionsbedingungen, mit dem kommerziell verfügbaren Modellsubstrat Phenylmalonsäure analysiert.

**Phenylmalonsäure
(Modellsubstrat)**



Naproxenmalonsäure



Flurbiprofenmalonsäure

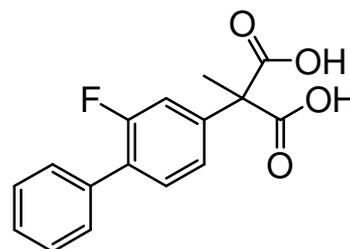


Abbildung 16: Verwendete Substrate für die Bioprozessentwicklung der der AMDasekatalysierten Synthese von Arylpropionsäuren. Das Modellsubstrat Phenylmalonsäure ist kommerziell erhältlich. Die Substrate Naproxenmalonsäure und Flurbiprofenmalonsäure wurden von der Chiracon (Luckenwalde, Deutschland) bereitgestellt.

Der Fokus der vorliegenden Promotionsarbeit, des dritten Projektpartners in dem DBU geförderten Projekt, ist die Bioprozessentwicklung der enzymatisch katalysierten Synthese der Arylpropionsäuren. Hierbei soll insbesondere eine hohe enzymatische Produktivität erreicht und die Synthese auf möglichst simplen und effektiven Weg realisiert werden. Der Wechsel von herkömmlichen chemischen Syntheserouten zur enzymkatalysierten Variante bringt hierbei ebenfalls Herausforderungen mit sich, wie die enzymatische Stabilität unter Prozessbedingungen oder das Erreichen eines vollen Umsatzes zum gewünschten Zielprodukt.

Für die Bioprozessentwicklung (Abbildung 17) sollen zunächst die optimalen Rahmenbedingungen, wie pH-Wert und Temperatur definiert werden, unter welchen die Reaktion möglichst effizient realisiert werden kann.

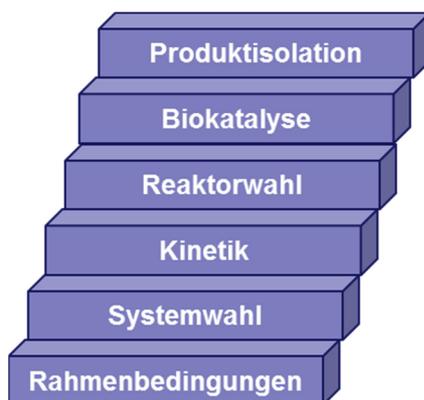


Abbildung 17: Vorgehen der Bioprozessentwicklung.

Neben der Aktivitätsuntersuchung ist hierbei ebenso die Stabilität unter den gewählten Prozessbedingungen zu beachten. Aufbauend auf die grundlegenden Untersuchungen soll eine enzymatische Präparation identifiziert werden mit welcher die Synthese möglichst stabil

durchgeführt werden kann. Eine Möglichkeit der Stabilisierung des Enzymes kann durch die Anbindung an Trägermaterialien erreicht werden und soll detaillierter untersucht werden. Nach Festsetzen des gewählten Systems, ist es essentiell die kinetischen Daten der Umsetzung zu bestimmen, um das optimale Reaktorkonzept für die Synthese der (S)-Arylpropionsäuren zu identifizieren. Neben der Reaktorwahl soll darüber hinaus die Synthese der Arylpropionsäuren im entwickelten Bioprozess im präparativen Maßstab durchgeführt und die Produkte isoliert und auf die Qualität untersucht werden.

2 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit der Bioprozessentwicklung der AMDase katalysierten Arylpropionsäure-Synthese dargestellt und ausführlich beschrieben. Die Daten wurden mit der (*R*)-enantioselektiven Wildtyp-AMDase und der (*S*)-enantioselektiven AMDase-CLGIPL-Mutante generiert. Die Analysen erfolgten mit dem Substrat der Modellreaktion Phenylmalonsäure (PM) oder mit den Substraten Naproxenmalonsäure (NM) und Flurbiprofenmalonsäure.

Das gewählte Reaktionssystem wurde auf die optimalen Bedingungen mit dem Einsatz des freien aufgereinigten Enzymes untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Bezug auf den Einfluss der Temperatur, den pH-Wert und den Konzentrationen der Reaktanden, sowie der Stabilität des freien Enzymes im Prozess (**Abschnitt 2.1 bis Abschnitt 2.3**). Daraufaufgehend wurden verschiedene Trägermaterialien für eine Enzym-Immobilisierung untersucht, um eine geeignete Enzympräparation zu identifizieren (**Abschnitt 2.4**). Die ausgewählte Enzympräparation wurde anschließend weiter auf mögliche Optimierungen, wie z.B. der weiteren Beschichtung mit Polymeren, untersucht (**Abschnitt 2.5**). In **Abschnitt 0** sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung des immobilisierten Enzymes zur Modellentwicklung und Wahl des geeigneten Reaktorkonzepts dargestellt. Abschließend ist die Synthese im präparativen Maßstab mit dem entwickelten Bioprozess für (*S*)-Flurbiprofen (**Abschnitt 2.7**) und (*S*)-Naproxen (**Abschnitt 2.8**) gezeigt.

2.1 Untersuchung der Rahmenbedingungen

Enzyme besitzen einen optimalen Bereich in welchem die Umsetzungen am effektivsten realisiert werden kann. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Aktivitäten unter Variation der Reaktionsbedingungen untersucht.

Zunächst wurde die enzymatische Aktivität des Wildtyp-Enzyms in Abhängigkeit von dem pH-Wert der Reaktionslösung bei einer konstanten Temperatur von 30 °C untersucht. Die Aktivität wurde in einem Bereich von pH 5 bis pH 10 analysiert (Abbildung 18) und die Reaktion in der Phenylmalonsäure Umsetzung untersucht. Die Analyse zeigte die höchsten Aktivitäten in einem pH-Bereich zwischen 6 bis 8. Hierbei war ein maximaler Umsatz mit einem pH-Wert von 7 zu beobachten. Für die weitere reaktionstechnische Charakterisierung unter Variation der Temperatur wurde das Wildtyp-Enzym bei einem festgesetzten pH-Wert von 7 in der Umsetzung von Phenylmalonsäure bei Temperaturen zwischen 25 und 55 °C untersucht. Zur Verdeutlichung des Temperatureinflusses auf die Enzymaktivität ist hierbei als Ergebnis die prozentuale Umsetzung des Substrates über den Reaktionsverlauf dargestellt (Abbildung 19).

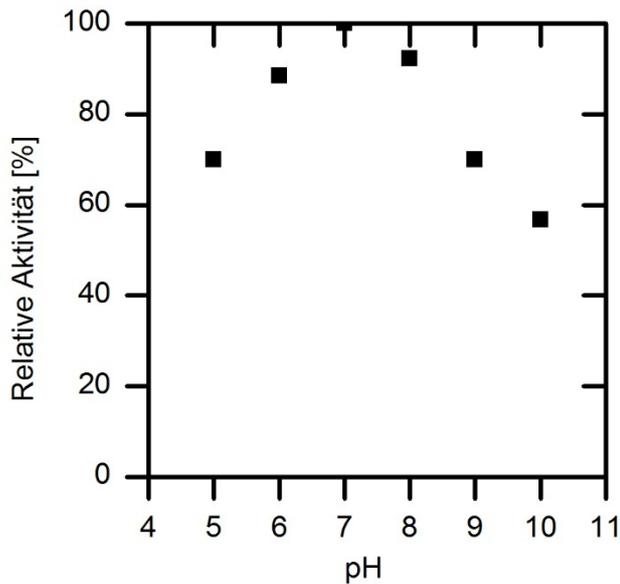


Abbildung 18: Einfluss des pH-Wertes auf die Wildtyp-AMDase katalysierte Umsetzung von Phenylmalonsäure. Reaktionsbedingungen: $V = 0,5 \text{ mL}$, $C_{\text{Start,PM}} = 20 \text{ mM}$, $C_{\text{Tris-Puffer}} = 50 \text{ mM}$, $U_{\text{Schüttler}} = 500 \text{ rpm}$, $C_{\text{Enzym}} = 2 \text{ mg/L}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

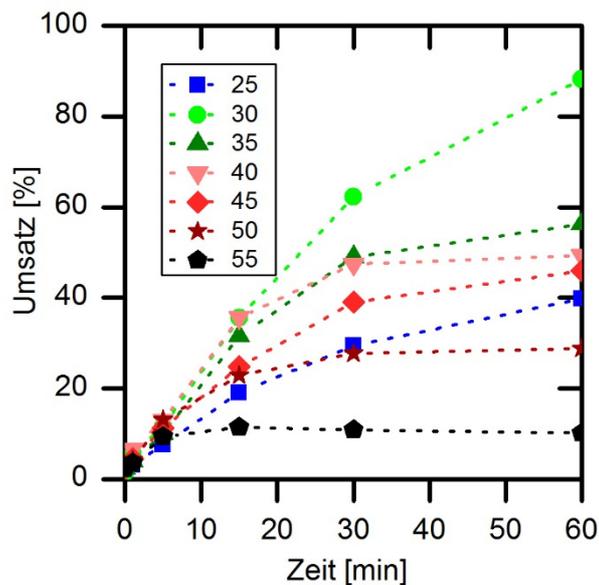


Abbildung 19: Einfluss der Temperatur auf die Wildtyp-AMDase katalysierte Synthese von Phenyllessigsäure. (A) Einfluss auf den Umsatz und (B) Einfluss auf die relative Anfangsaktivität. Reaktionsbedingungen: $V = 0,5 \text{ mL}$, $C_{\text{Start,PM}} = 20 \text{ mM}$, $C_{\text{Tris-Puffer}} = 50 \text{ mM}$, $U_{\text{Schüttler}} = 500 \text{ rpm}$, $C_{\text{Enzym}} = 2 \text{ mg/L}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Reaktionen mit den verschiedenen Temperaturen wurden jeweils über einen Zeitraum von 60 min erfasst (Abbildung 19). Hierbei sind in den Umsetzungen zum Produkt deutliche Unterschiede feststellbar. Der höchste Umsatz konnte mit einer Temperatur von 30 °C erreicht werden. Innerhalb der Reaktionszeit von 60 min sind mit 30 °C über 90 % des Substrates zum Produkt umgesetzt worden. Die anderen Temperaturen weisen niedrigere Umsätze auf. Mit Temperaturen oberhalb von 30 °C war ein Abflachen des Umsatzverlaufes zu beobachten, welcher auf eine Enzymdesaktivierung hindeutet. Bei einer geringeren Temperatur von 25 °C

war keine Temperatur verursachte Umsatzminderung feststellbar, jedoch ist die Aktivität hierbei sehr viel geringer.

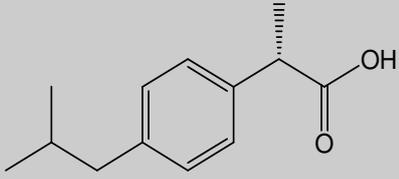
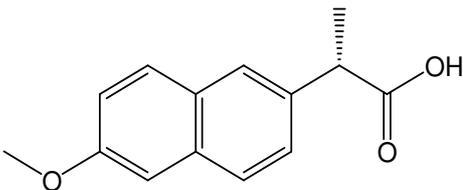
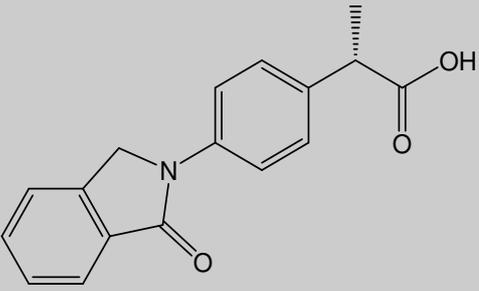
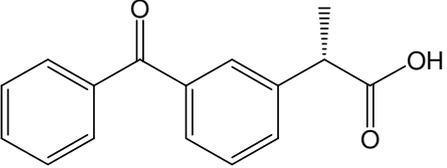
Es ist feststellbar, dass die Umsätze stark temperaturabhängig sind und die Enzymaktivität durch Erhöhung der Temperatur im Reaktionsverlauf deutlich verloren geht. Die Wildtyp-AMDase weist die höchsten spezifischen Anfangsaktivitäten mit einer Temperatur von 40 °C auf (Abb. 28, B), jedoch sind die erzielten Umsätze mit Temperaturen von 35 °C bzw. 30 °C signifikant höher. Das Resultat der Aktivitätsuntersuchung zeigte, dass der Prozess unter ökonomisch milden Bedingungen bei Temperaturen zwischen 30 bis 40 °C am effizientesten realisiert werden kann. Mit Reaktionstemperaturen von 45 °C oder höher ist ein vollständiger Aktivitätsverlust über die Reaktionszeit zu beobachten. Dieser Aktivitätsverlust liegt in der temperaturabhängigen Enzymdesaktivierung begründet und wird im Abschnitt 2.3 detaillierter beschrieben. Neben den enzymatischen Rahmenparametern spielt ebenfalls die Löslichkeit der verwendeten Substrate und Produkte eine signifikante Rolle und wird im nachfolgenden Abschnitt kurz ausgeführt.

Untersuchung der Substratlöslichkeit

Viele Pharmaka haben im wässrigen Medium eine sehr geringe Löslichkeit. Auch Arylpropionsäure-Derivate, wie Naproxen, sind bekannt eine geringe Löslichkeit im wässrigen Medien zu besitzen (Savjani *et al.* 2012). Dies schränkt bei der Einnahme dieser Medikamente die Bioverfügbarkeit im Körper stark ein. Auch für den biokatalytischen Prozess ist die Löslichkeit ein relevanter Faktor, da hierdurch die maximal erreichbare Produktivität bestimmt wird. Die Löslichkeit der freien Säuren von einigen relevanten Arylpropionsäure-Derivaten in wässriger Lösung liegen unter 1 mM (Tabelle 3). Für Naproxen ist die Wasserlöslichkeit mit 0,07 mM in der Literatur zu finden, dies entspricht unter 0,02 g/L (Fini *et al.* 1995) und der Prozess im wässrigen Medium könnte unter diesen geringen Konzentrationen nur sehr ineffizient realisiert werden. In der Salzform sind die Arylpropionsäure-Derivate um ein vielfaches besser löslich als die freien Säuren. Für Naproxen kann in der Literatur hierbei als Natriumsalz eine über 5000-fach bessere Löslichkeit als die freie Säure gefunden werden (Tabelle 3, (Fini *et al.* 1995)).

Ergebnisse

Tabelle 3: Löslichkeit einiger relevanter NSAIDs in der freien Säureform und in der Na-Salzform (Fini *et al.* 1995).

NSAID	Molekulargewicht [g/mol]	Freie Säure [mM] (g/L)	Na-Salzform [mM] (g/L)
<p style="text-align: center;">(S)-Ibuprofen</p> 	206,27	0,38 (0,078)	185 (38,2)
<p style="text-align: center;">(S)-Naproxen</p> 	230,26	0,07 (0,016)	350 (80,6)
<p style="text-align: center;">(S)-Indoprofen</p> 	281,32	0,015 (0,004)	17 (4,78)
<p style="text-align: center;">(S)-Ketoprofen</p> 	254,2	0,7 (0,18)	21 (5,3)

Die Arylpropionsäuren sind in der hier betrachteten Reaktion das Produkt der biokatalytischen Decarboxylierung. Die entsprechenden Substrat –die aromatischen Dimalonsäurederivate– sind derzeit nicht kommerziell erhältlich und Literaturdaten bezüglich der Löslichkeit nicht verfügbar. Das Produkt und das Substrat unterscheiden sich durch eine zweite Carboxylgruppe des Substrates. Die Löslichkeit des Substrates ist vermutlich ähnlich gering wie die Löslichkeit des Produktes und stellt somit einen limitierenden Faktor dar. Eine Möglichkeit die Löslichkeit zu steigern ist der Einsatz von Additiven, wie zum Beispiel oberflächenaktive Substanzen, wie Tenside oder der Zusatz von organischen Lösungsmitteln als „Cosolvent“. Diese können die Wechselwirkung mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen ändern und so zu einer Verbesserung der Löslichkeit führen. Für die

Bioprozessentwicklung ist jedoch jeder Zusatz mit einer Erhöhung der Kosten verbunden. Zudem bedarf es teilweise einer komplexeren Produktaufarbeitung im *Downstream* Prozess. Hierbei müssen die Additive durch Separierungsverfahren, wie Verdampfen der Lösungsmittel oder chromatographisch abgetrennt werden. Demzufolge ist es am günstigsten wenn Additive nach Möglichkeit vermieden werden können.

Die Löslichkeit der Arylpropionsäure-Derivate ist stark vom pH-Wert abhängig, wie beispielsweise in (Shaw *et al.* 2005) gezeigt ist. Hier wurde die vom pH-Wert abhängige Löslichkeit von Ibuprofen in einem Bereich zwischen pH 1,2 bis pH 11 analysiert. Die Löslichkeit steigt von 0,06 g/L bei pH-Wert 1,2 auf über 27 g/L bei pH 11, wobei der pH-Wert durch das Lösen der Arylpropionsäure zu einem niedrigeren Wert von pH 7 verschoben wurde. Die Löslichkeit ist also stark vom pH-Wert abhängig und zudem führt die Substratlösung zu einer pH-Wert-Verschiebung. Die Justierung des pH-Wertes der Substratlösung für die Anwendung in der Biokatalyse ist demnach essentiell.

Die Löslichkeit von dem Substrat Naproxenmalonsäure wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die maximale Löslichkeit mit einem finalen pH-Wert von 8 analysiert. Hierbei wurde der pH-Wert der Naproxenmalonsäure-Reaktionslösung mit einer 1 M Natriumhydroxid-Lösung justiert, wobei die Säure in das leichter lösliche Natriumsalz der Naproxenmalonsäure überführt wird. Der lösliche Überstand wurde auf die maximale Konzentration analysiert. Es konnten $201,9 \pm 8,7$ mM Naproxenmalonsäure in Lösung gebracht werden, wobei das Gemisch einen leicht gelblich-beigen Farbton angenommen hat, wie in Abbildung 20 am Beispiel einer 100 mM Lösung gezeigt ist. Da die Herstellung der 200 mM Reaktionslösung sehr zeitintensiv ist und die etwas viskose, hochkonzentrierte Lösung zudem schwierig in der Handhabung ist, wurde für die Generierung der experimentellen Daten mit Reaktionslösungen in einem niedrigeren Konzentrationsbereich (bis 120 mM Naproxenmalonsäure) gearbeitet.

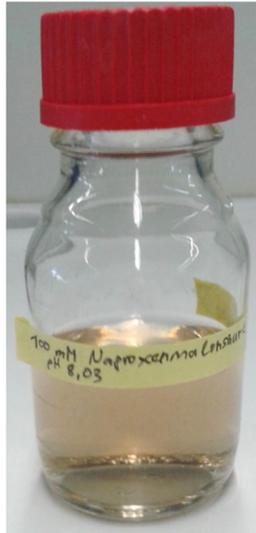


Abbildung 20: Naproxenmalonsäure-
Lösung im Wasser (100 mM, pH 8)

-
- Der Bioprozess kann mit einer maximalen Produktkonzentration von 200 mM Naproxen realisiert werden.
 - Die Biokatalyse kann unter milden Bedingungen mit pH Werten von 6–9 und Temperaturen von 30–40 °C realisiert werden.
 - Für das weitere experimentelle Vorgehen wurde ein pH Wert von 7–8 und eine Temperatur von 30 °C gewählt mit maximalen Substratkonzentrationen von 120 mM Naproxenmalonsäure.
-

2.2 Kinetische Charakterisierung der freien Enzymvarianten¹

Ein wichtiger Aspekt in der Bioprozessentwicklung ist die enzymatische Kinetik in der Umsetzung des Substrates zu dem gewünschten Zielprodukt. Enzyme weisen ein typisches Substrat-Sättigungsverhalten auf. Je nach Kinetik ist für die Realisierung der Reaktion ein anderes Reaktorkonzept geeignet. Die Resultate der kinetischen Analysen des freien Enzymes sind nachfolgend dargestellt und ausgeführt.

¹ Die in dieser Arbeit verwendeten Enzymvarianten der Wildtyp-AMDase und der AMDase-CLGIPL, wurden von Prof. Dr. Robert Kourist bereitgestellt (Ruhr- Universität Bochum, Deutschland).

2.2.1 Kinetische Charakterisierung der (*R*)-selektiven Wildtyp-AMDase

Für die kinetische Charakterisierung des freien Enzymes wurde die (*R*)-selektive Wildtyp-AMDase (wtAMDase) in der Umsetzung von Phenylmalonsäure (PM) und Naproxenmalonsäure (NM) untersucht (Abbildung 21, Tabelle 4).

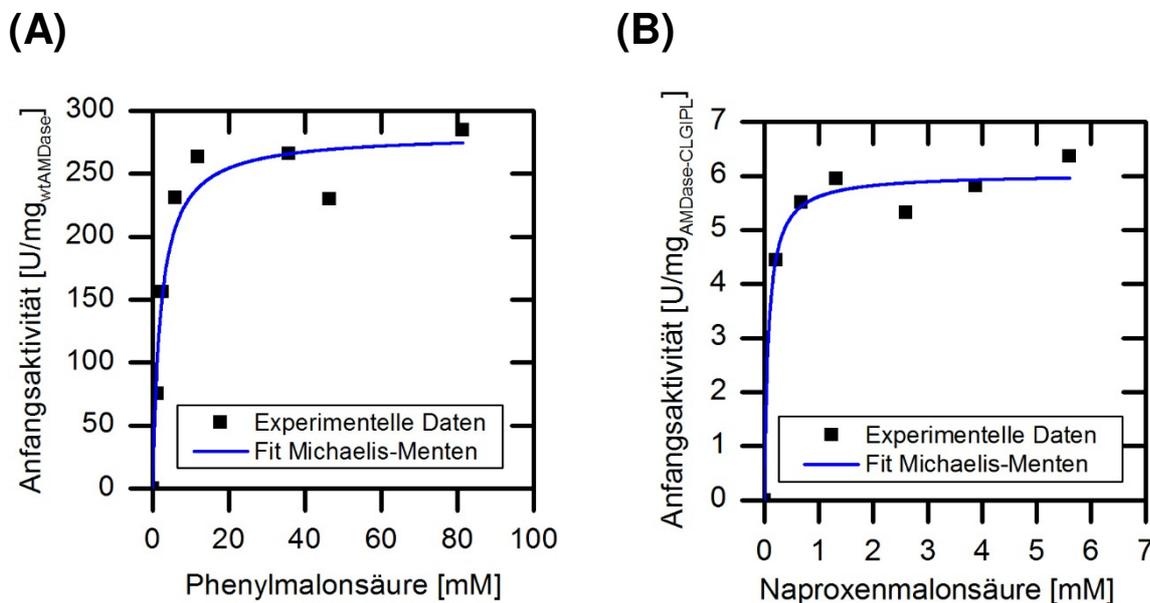


Abbildung 21: Kinetische Analyse der freien aufgereinigten Wildtyp-AMDase in der Umsetzung von Phenylmalonsäure (PM) und Naproxenmalonsäure (NM). Reaktionsbedingungen: $V = 0,5 \text{ mL}$, $c_{\text{Tris-Puffer}} = 50 \text{ mM}$, $U_{\text{Schüttler}} = 500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 7$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ und (A): $[\text{PM}] = 0\text{--}80 \text{ mM}$ ($0,08 \text{ } \mu\text{M}$ wtAMDase); (B): $[\text{NM}] = 0\text{--}18 \text{ mM}$ ($0,4 \text{ } \mu\text{M}$ wtAMDase). Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe eines Michaelis-Menten Fit (nach der ein Substrat -ein Produkt Kinetik) mit Origin 8.5.1 ermittelt.

Tabelle 4: Kinetische Parameter der Wildtyp-AMDase in der Umsetzung von Phenylmalonsäure und Naproxenmalonsäure.

Substrat	v_{max} [U/mg]	K_{M} [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [LmM ⁻¹ S ⁻¹]
Phenylmalonsäure	$281,7 \pm 17,5$	$2,15 \pm 0,67$	117,4	54,6
Naproxenmalonsäure	$28,85 \pm 2,06$	$0,32 \pm 0,15$	12,0	37,6

Die Analysen der spezifischen Anfangsaktivitäten der Wildtyp-AMDase zeigen für beide Substrate ein Sättigungsverhalten und erreichen maximale Umsetzungsraten. Hierbei sind die maximalen Aktivitäten in der Phenylmalonsäure-Umsetzung mit $282 \text{ U/mg}_{\text{wtAMDase}}$ ca. 10-fach höher als die $29 \text{ U/mg}_{\text{wtAMDase}}$, welche in den Umsetzungen von Naproxenmalonsäure ermittelt werden konnte. Während die Aktivität in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure geringer ist, konnte eine sehr viel geringere Michaelis-Menten-Konstante mit $0,3 \text{ mM}$ ermittelt werden.

Das Wildtyp-Enzym weist demnach eine deutlich höhere Affinität in der Naproxenmalonsäure Umsetzung auf.

2.2.2 Kinetische Charakterisierung der (S)-selektive AMDase-CLGIPL

Die (S)-selektive AMDase-CLGIPL-Mutante (Yoshida *et al.* 2015b), wurde ebenfalls in Hinsicht auf das Sättigungsverhalten in der Umsetzung von Phenylmalonsäure und Naproxenmalonsäure untersucht (Abbildung 22, Tabelle 5).

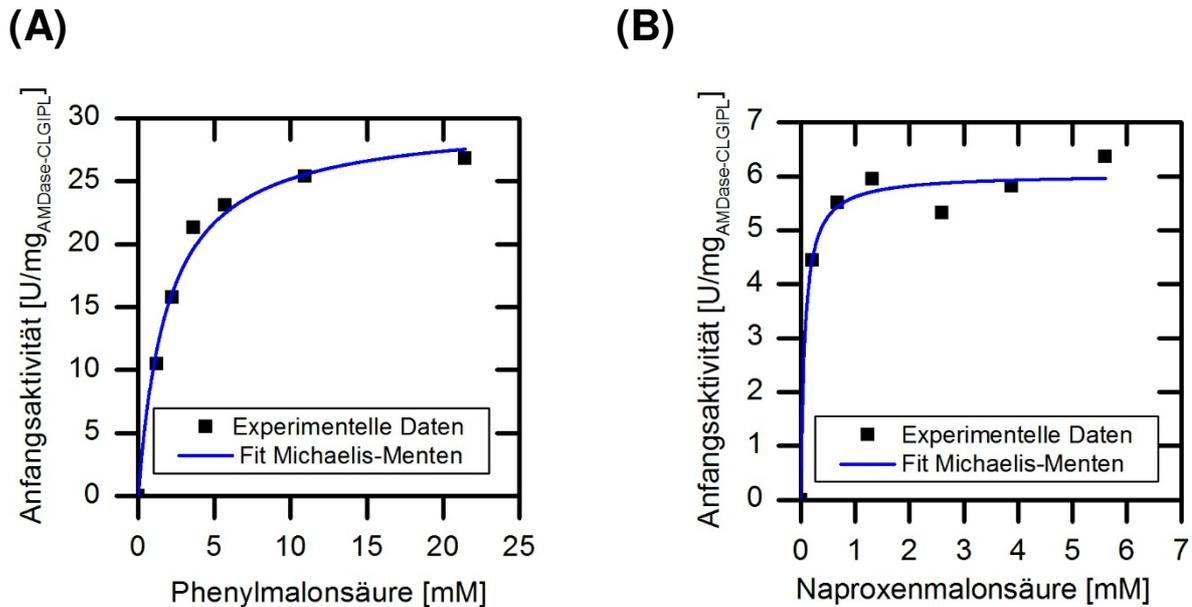


Abbildung 22: Kinetische Analyse der freien, aufgereinigten AMDase-CLGIPL-Mutante in der Umsetzung von Phenylmalonsäure (PM) und Naproxenmalonsäure (NM). Reaktionsbedingungen: $V = 0,5 \text{ mL}$, $c_{\text{Tris-Puffer}} = 50 \text{ mM}$, $U_{\text{Schüttler}} = 500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 7$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ und (A): $[\text{PM}] = 0\text{--}21 \text{ mM}$ ($0,4 \text{ } \mu\text{M}$ AMDase-CLGIPL) und $[\text{NM}] = 0\text{--}6 \text{ mM}$ ($0,4 \text{ } \mu\text{M}$ AMDase-CLGIPL). Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe eines Michaelis-Menten Fit (nach der ein Substrat-ein Produkt Kinetik) mit Origin 8.5.1 ermittelt.

Tabelle 5: Kinetische Parameter der AMDase-CLGIPL-Mutante in der Umsetzung von Phenylmalonsäure und Naproxenmalonsäure.

Substrat	v_{max} [U/mg]	K_{M} [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [LmM ⁻¹ S ⁻¹]
Phenylmalonsäure	$29,98 \pm 1,5$	$1,91 \pm 0,29$	12,5	6,5
Naproxenmalonsäure	$6,04 \pm 0,21$	$0,075 \pm 0,027$	2,5	33,6

Die AMDase-CLGIPL-Variante zeigte im Rahmen der kinetischen Analyse in der Umsetzung der Phenylmalonsäure eine maximale Aktivität von $30 \text{ U/mg}_{\text{AMDase-CLGIPL}}$ mit einem K_{M} -Wert von $1,9 \text{ mM}$. In der Charakterisierung der Naproxenmalonsäure-Umsetzung konnte eine maximale

Aktivität von 6 U/mg_{AMDase-CLGIPL} mit einem geringen K_M -Wert von 0,08 mM ermittelt werden. Die maximale Aktivität der Enzym-Mutante ist für die Phenylmalonsäure höher (hier: 5-fach, Tabelle 5), wie es auch bei dem Wildtyp ermittelt werden konnte (hier: 10-fach, Tabelle 4). Die Affinität ist hierbei für die Naproxenmalonsäure 25-fach höher als für die Phenylmalonsäure. Einen Wert, an welchem sich die Effizienz der katalytischen Reaktion abschätzen lässt, ist das Verhältnis von der katalytischen Aktivität und der Affinität (k_{cat}/K_M). Da die Mutante einen sehr niedrigen Wert in der Michaelis-Menten-Konstante aufweist, konnte für die Umsetzung der Naproxenmalonsäure eine höhere Effizienz der Reaktion ermittelt werden (5-fach, Tabelle 5). Neben dem Substrat-Sättigungsverhalten können zudem noch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Kinetik der Reaktion ausüben, wie Inhibierungen durch das gebildete Produkt oder auch durch einen Überschuss des Substrates. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit für Naproxen mit der freien AMDase-CLGIPL-Mutante in der Naproxenmalonsäure-Umsetzung untersucht und die Resultate sind im folgenden Kapitel dargestellt.

Untersuchung der AMDase-CLGIPL-Mutante auf kompetitive Produktinhibierung

Die Wildtyp-AMDase zeigte in Studien von Obata und Mitarbeitern bei der Anwesenheit des Produktes Phenyllessigsäure einen signifikanten Verlust der Aktivität in der Phenylmalonsäure-Umsetzung. Mit einem Zusatz von 10 mM Phenyllessigsäure wurde hierbei die enzymatische Aktivität ungefähr halbiert (Obata & Nakasako 2010). Zur weiteren kinetischen Charakterisierung wurde die freie AMDase-CLGIPL-Mutante auf eine mögliche Produktinhibierung durch Naproxen untersucht. Die Analyse erfolgte für die Naproxenmalonsäure-Umsetzung in einer Substratkonzentration von 6 mM mit 0–15 mM Naproxen. Mit steigender Naproxenkonzentration ist ein leichter Abfall der maximalen spezifischen Aktivitäten zu beobachten. Die kinetischen Daten zur Produktinhibierung wurden mit Hilfe eines Fit mit dem Excel-Solver zur kompetitiven Produktinhibierung ermittelt und sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

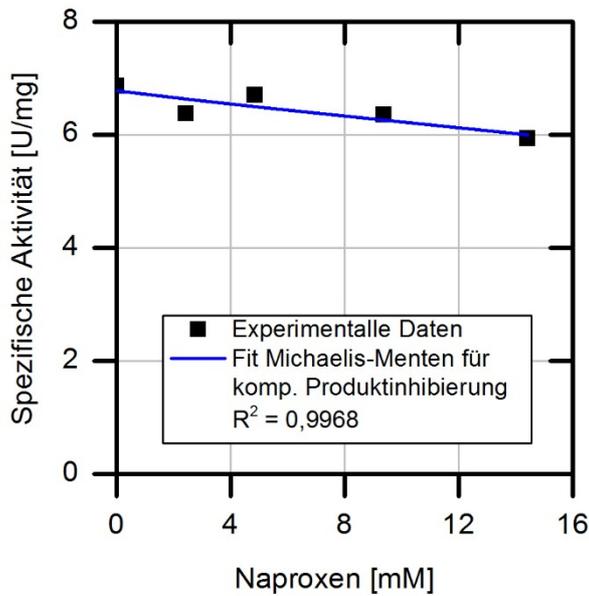


Abbildung 23: Untersuchung der kompetitiven Produktinhibierung von Naproxen der freien AMDase-CLGIPL in der Naproxenmalonsäure Umsetzung. Reaktionsbedingungen: $V = 0,5 \text{ mL}$, $U_{\text{Schüttler}} = 500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{\text{NM}} = 6 \text{ mM}$ und $C_{\text{Naproxen}} = 0\text{--}15 \text{ mM}$.

Gleichung 5

$$v = \frac{v_{\max} \left[\frac{U}{mg} \right] \times S [mM]}{K_{M,S} [mM] \times \left(1 + \frac{P [mM]}{K_{i,P} [mM]} \right) + S [mM]}$$

$$v = \frac{6,85 \pm 0,02 \left[\frac{U}{mg} \right] \times NM [mM]}{0,12 \pm 0,0003 [mM] \times \left(1 + \frac{NA [mM]}{2,4 \pm 0,008 [mM]} \right) + NM [mM]}$$

Mit:
 v [U/mg] Reaktionsgeschwindigkeit
 v_{\max} [U/mg] Maximale Aktivität
 S [mM] Substratkonzentration
 K_M [mM] Michaelis-Menten-Konstante
 K_i [mM] Inhibitor-Konstante
 P [mM] Produktkonzentration

Die Anpassung erfolgte, basierend auf der Gleichung für kompetitive Produktinhibierung mit dem Excel-Solver. Bei der Reaktion der AMDase-CLGIPL-Mutante konnte eine kompetitive Inhibitor-Konstante K_i von 2,2 mM ermittelt werden. Die Inhibitor-Konstante für das Naproxen ist dementsprechend 20-fach höher als die Michaelis-Menten-Konstante, welche in dem betrachteten Experiment mit $K_M = 0,12 \text{ mM}$ Naproxenmalonsäure ermittelt werden konnte. Mit dem Verhältnis zwischen der Michaelis-Menten-Konstante und der Inhibitor-Konstante kann bestimmt werden, ob der Prozess effizient durchgeführt werden kann ohne das Produkt kontinuierlich aus dem Reaktionsgemisch entfernen zu müssen. Dafür muss das Verhältnis unterhalb von 1 liegen (Lee & Whitesides 1986; Liese *et al.* 1996). Bei der Analyse des

Naproxen Einflusses konnte ein Verhältnis von $K_M/K_i = 0,05$ bestimmt werden. Das Produkt braucht demzufolge nicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden, um eine effiziente Synthese zu gewährleisten. Neben der Inhibierung durch das gebildete Produkt kann die Synthese ebenfalls durch das überschüssige Substrat gehemmt werden, was im folgenden Abschnitt detaillierter beschrieben ist.

Untersuchung der AMDase-CLGIPL-Mutante auf Substratüberschussinhibierung

In dem zuvor analysierten Substrat-Bereich bis 6 mM Naproxenmalonsäure war keine Substratüberschussinhibierung feststellbar (Abbildung 24). Da der Prozess allerdings mit möglichst hohen Produkttitern realisiert werden soll, wurde die Umsetzung der AMDase-Variante zudem noch auf eine mögliche Substratüberschussinhibierung untersucht. Die Kinetik der AMDase-CLGIPL-Mutante wurde in einem Naproxenmalonsäure-Konzentrationsbereich von 0–100 mM untersucht und die spezifischen Anfangsaktivitäten ermittelt (Abbildung 24).

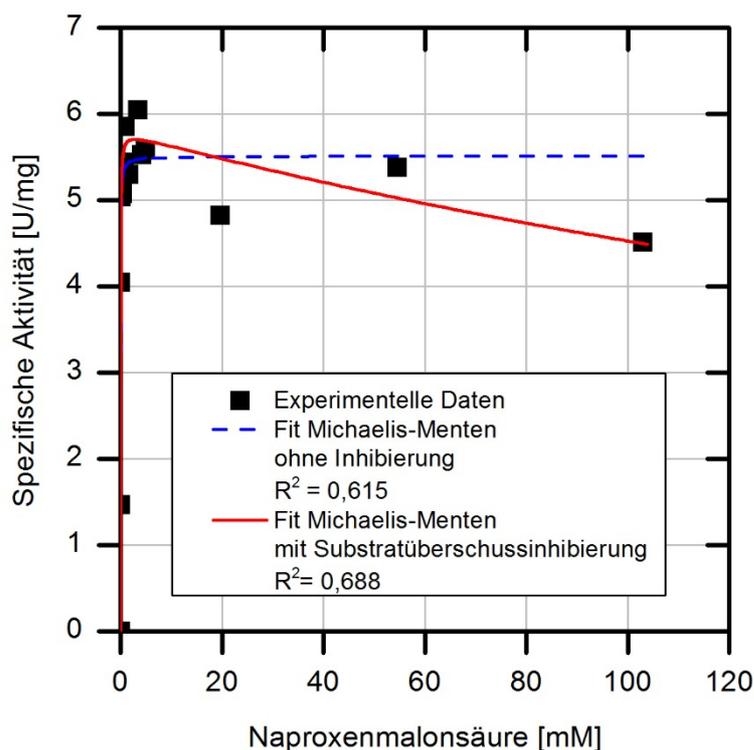


Abbildung 24: Kinetische Untersuchung der freien AMDase-CLGIPL auf eine Substratüberschussinhibierung. Reaktionsbedingungen: $V = 0,5$ mL, $U_{\text{Schüttler}} = 500$ rpm, pH 8, $T = 30$ °C, $c_{\text{NM}} = 0\text{--}100$ mM und $c_{\text{AMDase-CLGIPL}} = 20$ mg/L.

Die erhaltenen experimentellen Daten wurden mit Hilfe des Excel-Solver auf eine mögliche Substratüberschussinhibierung untersucht und mit einem Fit ohne Inhibierung verglichen. Das Ergebnis zeigte einen kleineren Fehler für die Anpassung der experimentellen Daten zum Fit

mit einer Substratüberschussinhibierung. Der Fit lieferte eine Substratüberschussinhibitor-Konstante $K_{i,S}$ von 358,2 mM Naproxenmalonsäure. Die enzymatische Reaktion ist nur schwach durch einen Überschuss an Naproxenmalonsäure inhibiert, wobei die Aktivität erst bei einer Konzentration von 358,2 mM Naproxenmalonsäure halbiert wäre. Dieser Wert ist jedoch nicht erreichbar, da Naproxenmalonsäure bei pH 8 eine geringere maximale Löslichkeit von 200 mM aufweist. Die erhaltenen kinetischen Daten sind in der folgenden Gleichung 6 zusammengefasst.

Gleichung 6

$$v = \frac{v_{max} \left[\frac{U}{mg} \right] \times S [mM]}{K_{M,S} [mM] + S [mM] \times \left(1 + \frac{S [mM]}{K_{i,S} [mM]} \right)}$$

$$v = \frac{5,8 \pm 1,8 \left[\frac{U}{mg} \right] \times NM [mM]}{0,021 \pm 0,007_{,NM} [mM] + NM [mM] \times \left(1 + \frac{NM [mM]}{358,2 \pm 111,7_{NM} [mM]} \right)}$$

Mit:	
v [U/mg]	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max} [U/mg]	Maximale Aktivität
S [mM]	Substratkonzentration
K_M [mM]	Michaelis-Menten-Konstante
K_i [mM]	Inhibitor-Konstante
P [mM]	Produktkonzentration

Neben der enzymatischen Kinetik ist die Stabilität des Enzymes unter den gewählten Prozessbedingungen für die Effizienz der Reaktion ausschlaggebend und wird im nachfolgenden Abschnitt 2.3 dargestellt.

- Die kinetische Charakterisierung des aufgereinigten Enzymes zeigte eine hohe Affinität der AMDase-CLGIPL gegenüber der Naproxenmalonsäure.
- Die Analyse auf mögliche Inhibierungen ergab eine leichte Produkt und Substratüberschussinhibierung
- Ein Substrat-Feed oder eine *in situ* Produktabtrennung sind nicht erforderlich, da die Inhibierungen geringfügig sind.

2.3 Stabilitätsuntersuchung unter Prozessbedingungen

Das Enzym der Wahl, die AMDase, ist in Bezug auf die Aminosäure-Zusammensetzung ein instabiles Enzym (Instabilitätsindex 43,2; ExPASy ProtParam Tool, (Guruprsad *et al.* 1990)). Für eine effiziente Synthese ist die Stabilität ein signifikant wichtiger Faktor. Die hohe

thermische Instabilität der AMDase konnte bereits bei der Temperaturanalyse der Reaktion beobachtet werden (Abschnitt 2.1) und wurde nachfolgend detaillierter untersucht. Hierbei wurde die Stabilität im Zusammenhang möglicher stabilisierender Substanzen und unter verschiedenen Temperaturen analysiert.

Stabilitätsuntersuchung mit Zusätzen von PEG₆₀₀

Neben dem „Enzyme Engineering“ und einer Immobilisierung auf einem Trägermaterial kann eine Erhöhung der Stabilität ebenfalls durch verschiedene Additive erreicht werden. Insbesondere können Substanzen, die einen Einfluss auf die Solvent-Eigenschaften ausüben, einen Einfluss auf die enzymatische Stabilität bewirken. Beispielsweise ist für den Zusatz von Polyethylenglycol eine stabilisierende Wirkung auf Enzyme bekannt (Iyer & Ananthanarayan 2008). Polyethylenglycol (PEG) gibt es in verschiedenen Kettenlängen mit Molekulargewichten von 200 bis 36.000 g/mol. Die kürzerkettigen Polymere bis 600 g/mol liegen bei Raumtemperatur als Flüssigkeiten vor, während Polymere höherer Molekulargewichte bei Raumtemperatur als Feststoffe vorliegen. Durch die starken Wasserstoffbrückenbindungen im wässrigen Medium ist PEG, unabhängig von der Kettenlänge, vollständig im Wasser löslich (Soltanpour & Jouyban 2010).

Für die Stabilitätsanalyse wurde das Wildtyp-Enzym unter Prozessbedingungen (Schütteln mit einer Temperatur von 30 °C) ohne das Substrat inkubiert. Die Stabilitätsanalyse vom Wildtyp-Enzym wurde ohne Zusätze und mit der Zugabe von 5, 10 und 20 % (v/v) PEG₆₀₀ untersucht. Das Wildtyp-Enzym wurde unter Schütteln bei 30 °C ohne Substrat inkubiert und auf die verbleibende Aktivität in der Phenylmalonsäure Umsetzung untersucht (Abbildung 25).

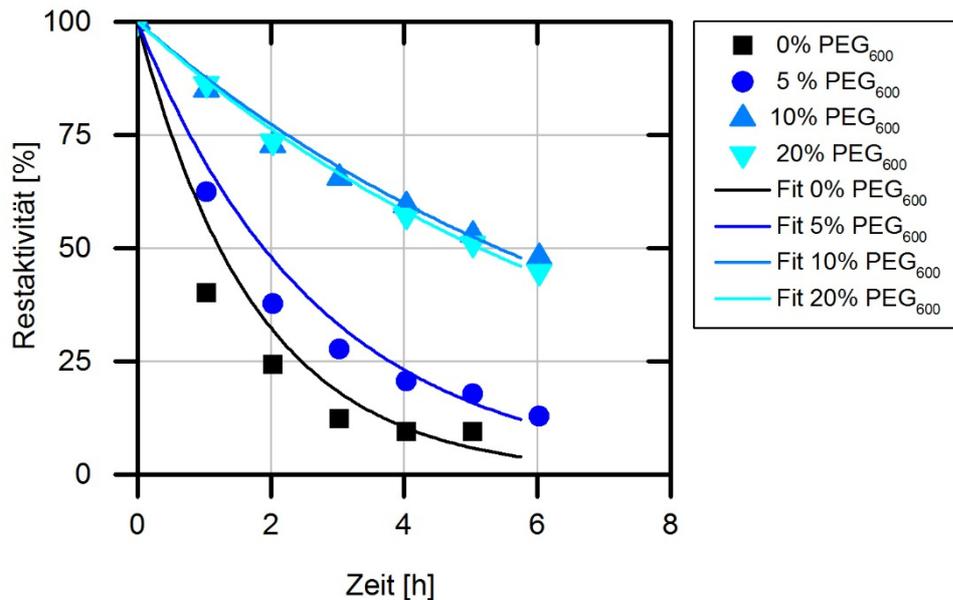


Abbildung 25: Relative Restaktivität der freien aufgereinigten Wildtyp-AMDase unter Prozessbedingungen mit verschiedenen Anteilen des Additivs PEG₆₀₀. Bedingungen: V = 100 mL, U_{Schüttler} = 200 rpm, pH 7, T= 30 °C, C_{AMDase} = 2 mg/L und PEG600 = 0–20 % (v/v). Aktivitätsuntersuchung: V = 0,5 mL, U_{Schüttler} = 500 rpm, pH 7, T= 30 °C, C_{PM, Start} = 20 mM.

Die enzymatischen Aktivitäten wurden in einem Zeitfenster von 6 h untersucht. Zur Berechnung der Stabilitätsparameter (Desaktivierungskonstante k_{Des} , Halbwertszeit $\tau_{1/2}$) wurden die berechneten Restaktivitäten gegen die Zeit aufgetragen. Die Ermittlung erfolgte mit Hilfe eines Desaktivierungsfits, wie in der Einleitung unter Abschnitt 1.4.2 beschrieben. Die Untersuchung zeigte, dass die AMDase unter den gewählten Prozessbedingungen eine geringe Stabilität aufweist. Das freie Enzym hat ohne Zusätze eine Halbwertszeit von $\tau_{1/2} = 1,23$ h. Der Zusatz von PEG₆₀₀ in der Reaktionslösung führte zu einer Erhöhung der Stabilität mit einem Anstieg der Halbwertszeit zu 1,89 h mit 5 % (v/v) von PEG₆₀₀ und über 5 h mit Anteilen von 10 bzw. 20 % (v/v) PEG₆₀₀. Die Stabilitäten mit 10 und 20 % (v/v) PEG₆₀₀ unterscheiden sich nur geringfügig und mit 20 % (v/v) PEG₆₀₀ konnte zudem eine etwas kürzere Halbwertszeit von 5,1 h gegenüber 5,4 h mit 10 % (v/v) PEG₆₀₀ ermittelt werden. Dies lässt vermuten, dass der Zusatz nur bis zu einem bestimmten Anteil eine stabilisierende Wirkung auf die AMDase hat und darüber hinaus keine weitere Optimierung bewirkt. Alle berechneten Werte sind in der nachstehenden Tabelle 6 zusammen gefasst.

Ergebnisse

Tabelle 6: Stabilitätsparameter der Wildtyp-AMDase mit verschiedenen Zugaben des Additivs PEG₆₀₀ in der Phenylmalonsäure-Umsetzung.

PEG ₆₀₀ [%]	V ₀ [U/mg]	k _{Des} [h ⁻¹]	k _{cat} [s ⁻¹]	τ _{1/2} [h]	TTN [-]
0	265,9	0,563	110,8	1,23	709
5	300,4	0,366	125,2	1,89	1.231
10	310,2	0,128	129,3	5,42	3.635
20	329,1	0,135	137,1	5,13	3.657

Neben dem stabilisierenden Effekt des PEG₆₀₀ konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Enzym-Aktivität beobachtet werden. Die Aktivitäten der AMDase steigen unter Zugabe des Additivs PEG₆₀₀ leicht an. Mit 20 % (v/v) PEG₆₀₀ im Reaktionsgemisch sind ca. 20 % mehr Aktivität gegenüber den Vergleichsexperimenten ohne Zusätze erreicht worden. Demnach bewirkt der Zusatz einen positiven Effekt auf die Stabilität und die Aktivität aus.

Temperaturabhängige Stabilitätsuntersuchung

Zur temperaturabhängigen Untersuchung der Stabilität wurde die aufgereinigte AMDase-CLGIPL-Mutante in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure untersucht. Die Reaktion wurde bei drei verschiedenen Temperaturen (22, 25 und 30 °C) durchgeführt und der Verlauf der Produktbildung über die Zeit detektiert. In allen drei Versuchsansätzen wurde die gleiche Enzymmenge und Substratkonzentration verwendet. Bei allen drei Temperaturen konnte eine komplette enzymatische Desaktivierung ohne weitere Produktbildungen beobachtet werden (Abbildung 26, A). Die höchsten Umsätze konnten mit einer Temperatur von 25 °C mit 85,5 % bestimmt werden. Die anderen Ergebnisse zeigten etwas geringere Werte mit 81 % als Endumsatz für 22 °C und 73 % mit 30 °C.

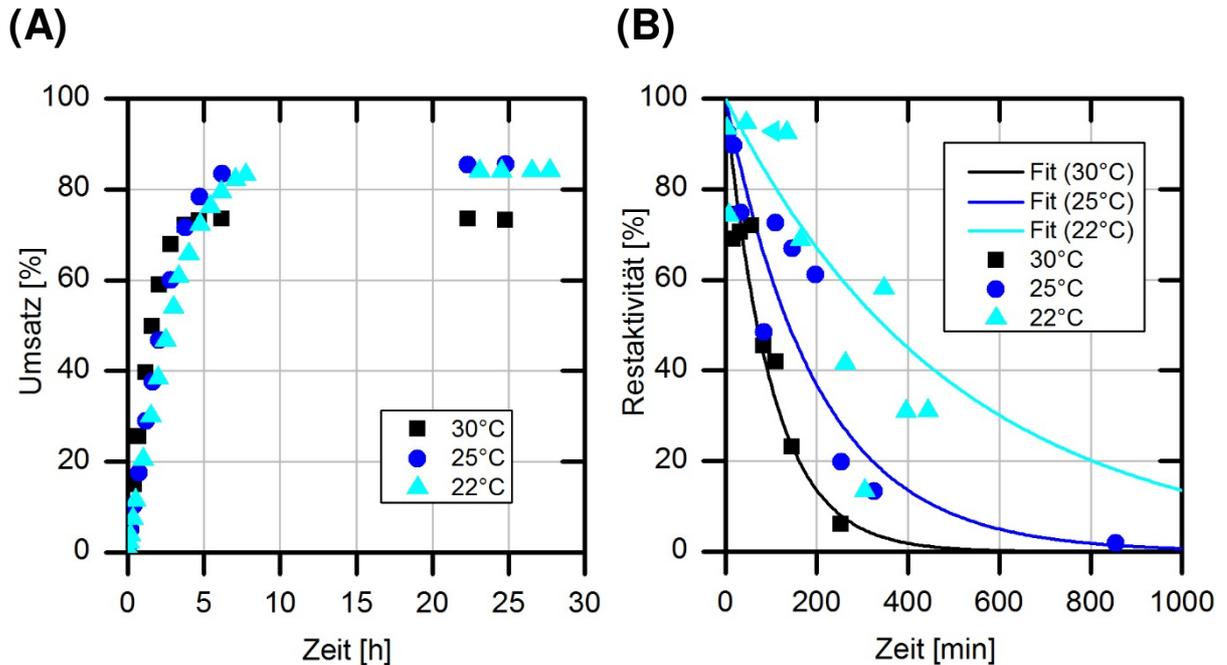


Abbildung 26: Umsatzkurven (A) und die Restaktivitäten (B) der Naproxen-Bildung bei verschiedenen Temperaturen. Reaktionsbedingungen: $V = 1 \text{ mL}$, $U_{\text{Schüttler}} = 500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $C_{\text{NM, Start}} = 120 \text{ mM}$. $C_{\text{AMDase-CLGIPL}} = 100 \text{ mg/L}$ und $T = 22, 25 \text{ und } 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zur Analyse der Stabilitätsparameter sind die enzymatischen Restaktivitäten gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 26, B). Bei der Auftragung als Funktion der Zeit können die Stabilitätsparameter der betrachteten Reaktion ermittelt werden (Tabelle 7).

Die Halbwertszeit der freien AMDase-CLGIPL mit einer Reaktionsführung von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ konnte mit $1,2 \text{ h}$ ermittelt werden. Dies ist die gleiche Halbwertszeit, wie sie bereits für das Wildtyp-Enzym in der Phenylmalonsäure-Umsetzung bestimmt werden konnte. Demzufolge hat die Art des Substrates für dieses betrachtete System keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass die sechs eingeführten Mutationen der AMDase im aktiven Zentrum keinen Einfluss auf die Stabilität ausüben.

Mit der Absenkung der Temperatur auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $22 \text{ }^\circ\text{C}$ konnte eine Verlängerung der Halbwertszeit auf $2,3 \text{ h}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) bzw. $5,8 \text{ h}$ ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) erreicht werden. Theoretisch können die höchsten TTN-Werte, welche durch diesen Fit ermittelt wurden, mit einer Temperaturerniedrigung von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $22 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht werden. Diese sind allerdings nur als Annäherungen zu betrachten. Zum vollständigen Erreichen der TTN würde der Prozess mit $22 \text{ }^\circ\text{C}$ über 38 Stunden benötigen (Annahme: im Desaktivierungsfitt sind nur noch $0,1 \%$ Restaktivität vorhanden, da der Fit die Achse nicht schneidet). Der Versuch zeigte jedoch, dass in der Praxis die vollständig Desaktivierung des Enzymes für alle gewählten Temperaturen zuvor schon eintrat.

Ergebnisse

Tabelle 7: Stabilitätsparameter der freien AMDase-CLGIPL in der Naproxenmalonsäure-Umsetzung mit unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur [°C]	k_{cat} [min ⁻¹]	k_{des} [min ⁻¹]	$\tau_{1/2}$ [h]	TTN [-]	Dauer [h]*
22	91,2	0,002	5,8	45579	38,4
25	138,0	0,005	2,3	27600	23
30	246,9	0,01	1,2	24692	11,5

* Prozessdauer zum Erreichen der TTN mit der Annahme von 0,1 % Restaktivität.

Die katalytische Aktivität hat einen Einfluss auf die Effizienz der Reaktion. Mit einem Herabsenken der Temperatur sinkt ebenfalls die katalytische Aktivität. Bei einer Reaktionsführung mit 22 °C zeigt die AMDase-CLGIPL-Mutante eine 63 % geringere katalytische Aktivität, verglichen mit einer Reaktionsführung bei 30 °C und bei 25 °C konnten 44 % geringere Aktivitäten ermittelt werden. Demzufolge müssen für diese Reaktionsführungen längere Reaktionszeiten oder der Einsatz höherer Enzymmengen in Betracht gezogen werden.

Die Stabilitätsuntersuchung zeigte, dass das freie Enzym relativ instabil unter den untersuchten Prozessbedingungen ist. Durch Temperaturerniedrigung und PEG₆₀₀ Zusätze konnten höhere Stabilitäten erzielt werden. Die Halbwertszeiten sind mit Werten unter 6 h dennoch relativ gering. Zur enzymatischen Stabilisierung wurden dementsprechend weitere stabilitätssteigernde Versuche durchgeführt. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse verschiedener Enzympräparationen dargestellt.

-
- Die enzymatische Stabilität ist unter den gewählten Prozessbedingungen mit $\tau_{1/2}$ von 1,2 h gering.
 - Eine Verlängerung der Halbwertszeit auf über 5 h konnte durch den Zusatz von 10 % (v/v) PEG₆₀₀ und einer Temperaturerniedrigung auf 22 °C erreicht werden, welche jedoch die katalytische Aktivität um 63 % verringert.
-

2.4 Vergleich verschiedener Enzympräparationen²

Die Stabilität des freien Enzyms ist, wie im vorherigen Abschnitt 2.3 beschrieben, sehr gering. Der Einsatz des Biokatalysators kann in verschiedenen Präparationen des Enzymes erfolgen, wie z.B. durch die Anbindung an feste Trägermaterialien. Für diese Arbeit wurde die Immobilisierung an feste Träger gewählt, da diese Form drei signifikante Vorteile für die Bioprozessgestaltung hat:

- (i) Enzymatische Stabilisierung
- (ii) leichte Abtrennung in dem Prozess
- (iii) einfache Wiederverwendung des Biokatalysators

Für eine Steigerung der enzymatischen Stabilität wurde das Enzym an verschiedene Trägermaterialien angebunden. Hierfür wurden zunächst zur Immobilisierung der Wildtyp-AMDase verschiedene Träger gewählt um die Machbarkeit einer Anbindung in aktiver enzymatischer Form zu analysieren. Die Materialien unterscheiden sich in der Oberflächenbeschaffenheit, dem Anbindungstyp, dem Partikel- und Porendurchmesser. Diese Parameter können die Effizienz der Immobilisierung und die Aktivität des Enzymes beeinflussen. Es wurden insgesamt sieben verschiedene Träger untersucht: Amino C2 Acrylat, Sepabeads™ EC-EP und EC-HA, EziG™ 1 und 2 mit Co(II) Beladung, Trisoperl™ und Trisoperl™ Amino. Detaillierte Informationen zu den verschiedenen Trägermaterialien sind im Abschnitt 5.2.6 in Tabelle 21 aufgeführt.

Das Zielenzym für diese Studie, die Arylmalonatdecarboxylase, hat auf der Oberfläche zwei potentielle Lysin Reste. Diese sind nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums und eignen sich demnach gut für die Anbindung an einem Träger. Das verwendete Wildtyp-Enzym und die (S)-selektive Variante besitzen zudem einen His₆-Tag am N-terminalen Ende, welcher sich zur Immobilisierung an komplexierenden Trägern eignet. In folgender Abbildung 27 sind die potentiellen Anbindungspositionen der AMDase grün dargestellt.

² Anteile dieses Kapitels wurden publiziert in Aßmann *et al.* (2017a):

Aßmann M., Mügge C., Gaßmeyer S., Enoki J., Hilterhaus L., Kourist R., Liese A. and Kara S., Improvement of the process stability of arylmalonate decarboxylase by immobilization for biocatalytic profen synthesis. (2017), *Front. Microbiol.*, 8:448, 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00448.

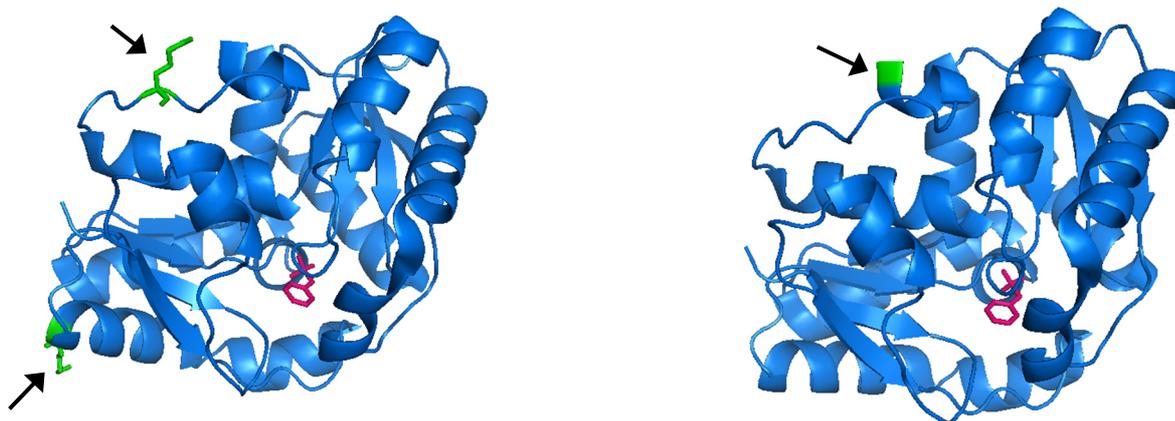


Abbildung 27: Struktur der Wildtyp-AMDase in Komplex mit Benzylphosphonat im aktiven Zentrum (markiert in Magenta) (Okrasa *et al.* 2009). Links: Lysin Reste sind in grün markiert; rechts: die Position des N-Terminus ist in grün markiert (Position des His₆-Tag).

Für die Immobilisierung *via* Komplexbildung steht nur eine Position am N-terminalen His₆-tag zur Verfügung. Für ein erstes Screening der verschiedenen Trägermaterialien wurde die aufgereinigte Wildtyp-AMDase verwendet und diese in Hinsicht auf die Umsetzung des Modellsubstrates Phenylmalonsäure untersucht. In Abbildung 28 befindet sich ein Vergleich der Träger in Hinsicht auf die enzymatische Beladung und der erhaltenen Aktivitäten in der Wiederverwendung.

Im Vergleich der Träger zeigen der Amino C2 Acrylat und die Sepabeads EC-HA die höchsten enzymatischen Beladungen mit $\sim 80 \text{ mg}_{\text{Enzym}}/\text{g}_{\text{Träger}}$. Dies geht einher mit der hohen Dichte an Funktionalitäten mit $1760 \text{ } \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{Träger}}$ des Amino C2 Acrylat und $>700 \text{ } \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{carrier}}$ für die Sepabeads EC-HA erklärt werden. Das Enzym konnte an allen gescreenten Trägern erfolgreich angebinden werden, wobei Aktivitäten von $5,1 \text{ U}/\text{mg}_{\text{Immo}}$ (Amino C2 Acrylat) bis $22,6 \text{ U}/\text{mg}_{\text{Immo}}$ (EziG1 Co(II)) gemessen wurden.

In Hinsicht auf die verschiedenen Anbindungstypen (adsorptiv, komplex, kovalent) zeigte die immobilisierte Wildtyp-AMDase mit der kovalenter Anbindung an den Träger die geringsten Aktivitäten. Jedoch wurde hier ein geringer Aktivitätsverlust beobachtet. In den wiederholten Batch-Versuchen konnte zudem eine erhöhte Aktivität im wiederholten Einsatz des Immobilisates beobachtet werden. Dies kann mehrere Ursachen haben. Eine Erklärung ist, dass der trockene Träger durch den ersten Einsatz in den Poren durch die Reaktionslösung äquillibriert wird, wobei sich die Oberflächenpolarität ändert. Eine weitere Erklärung ist eine mögliche Substratakkumulation innerhalb der Poren. Ein Inkubationstest der Phenylmalonsäure mit den Trägern zeigte eine Adsorption von 4 % für den EziG1 Co(II) Träger und 8 % mit dem Amino C2 Träger. Demnach wird ein Anteil an/in dem Träger zurückgehalten, welcher dann in Folgeanwendungen zu einer höheren Konzentration und hierdurch höher berechneten Aktivitäten führen kann. Da jedoch das adsorptive Verhalten des Substrates in

Bezug auf die jeweiligen Träger als konstant angenommen wird, kann dieses Phänomen insbesondere zwischen der ersten und zweiten Anwendung des Trägers beobachtet werden.

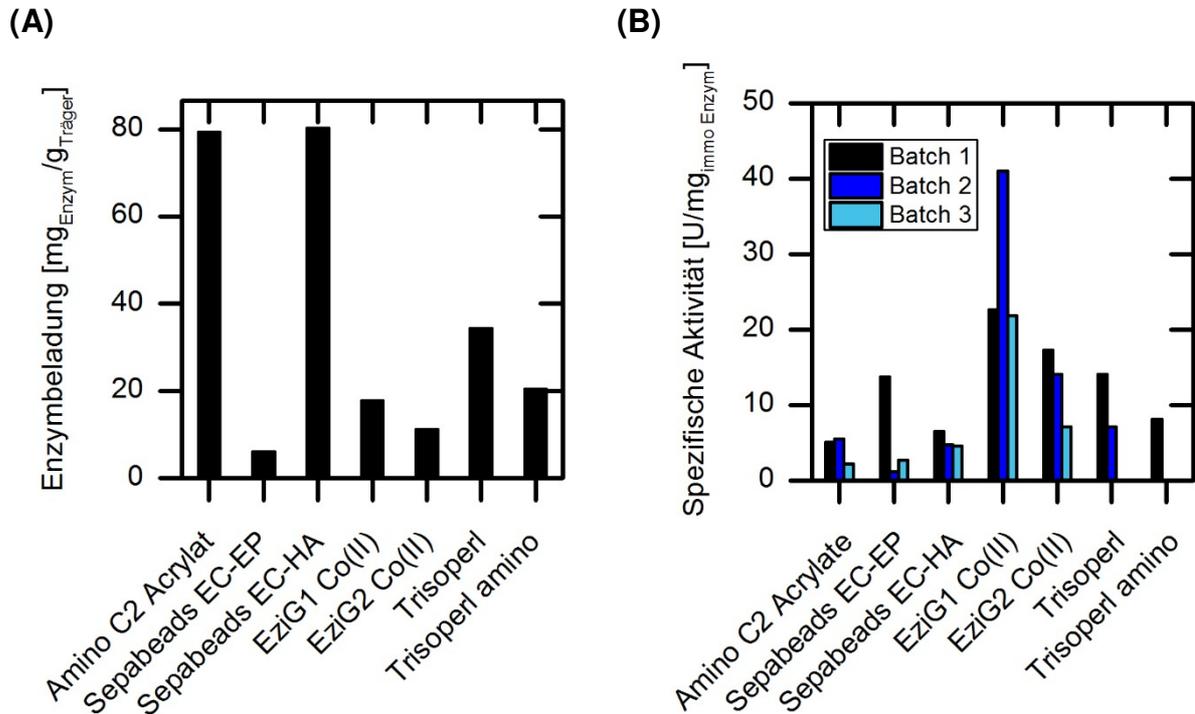


Abbildung 28: Untersuchung verschiedener Träger in Hinsicht auf die Enzymbeladung (A) und spezifische Enzym Aktivität in wiederholten Batch-Versuchen (B) mit immobilisierter Wildtyp-AMDase. Reaktionsbedingungen für (B): $V = 100 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 200 \text{ rpm}$, $\text{pH } 7$, $c_{\text{Tris-Puffer}} = 45 \text{ mM}$, $c_{\text{PM, Start}} = 20 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 200-500 mg Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger gefiltert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die höchste katalytische Aktivität konnte auf dem porösen Glasträger EziG™ Co(II) type 1 und 2 gefunden werden. Hierbei ist ein Vorteil, dass diese Immobilisierungsart die Aufreinigung und Immobilisierung in einem Schritt ermöglicht (Engelmark Cassimjee *et al.* 2014). Dieser Träger wurde zunächst für weitere Immobilisierung Experimente gewählt (Abschnitt 2.4.1).

2.4.1 Immobilisierung der AMDase-CLGIPL-Mutante an EziG Träger

Weitere Untersuchungen der Immobilisierung wurden mit der AMDase-CLGIPL-Mutanten durchgeführt. Da der EziG Träger in den ersten Screenings der verschiedenen Träger die besten Ergebnisse in Bezug auf die Aktivität lieferte, wurden zur weiteren Untersuchung sechs verschiedene EziG Träger untersucht. Diese unterscheiden sich zum einen in der Art des

komplexbildenden Metallions (Co(II) oder Fe(III)) und in der Hydrophobizität der Trägeroberfläche (Typ 1: hydrophil; 2: hydrophob; 3: semi-hydrophil).

Die Eignung der verschiedenen EziG Trägermaterialien für die Immobilisierung der AMDase-CLGIPL-Mutanten wurde in Hinsicht auf die Enzymbeladung und die spezifische Aktivität untersucht (Abbildung 29). Es wurde eine Enzymbeladung (im Bereich von 80 bis 120 mg_{Enzym}/g_{Träger}) gemessen. Die enzymatische Aktivität war bis zu 5-fach höher in der Anwendung, wenn sie als Eisen(III)komplex vorlagen. Die wiederholten Batch-Versuche zeigten jedoch einen deutlichen Aktivitätsverlust aller untersuchten EziG Träger mit Verlusten von 75 % (EziG2 Co(II)) bis zu 89 % (EziG1 FE). In einem dritten Wiederverwendung wurde ein zusätzlicher Aktivitätsverlust beobachtet: 59 % (EziG1 Co(II)) bis 82 % (EziG1 Fe(III)) bezogen auf die Aktivität des zweiten Batches. Der hohe Aktivitätsverlust kann mit einem Verlust an gebundenen Protein erklärt werden, welcher durch die schwächere koordinative Anbindung verloren gehen kann. Eine weitere Faktor können lokale pH Veränderungen im porösen Material sein, ausgelöst durch die Bildung von Phenyllessigsäure aus Phenylmalonsäure. Eine starke pH Veränderung im Reaktionsmedium nach den Batch-Verläufen konnte jedoch nicht beobachtet werden (Anstieg von max. pH 0,5).

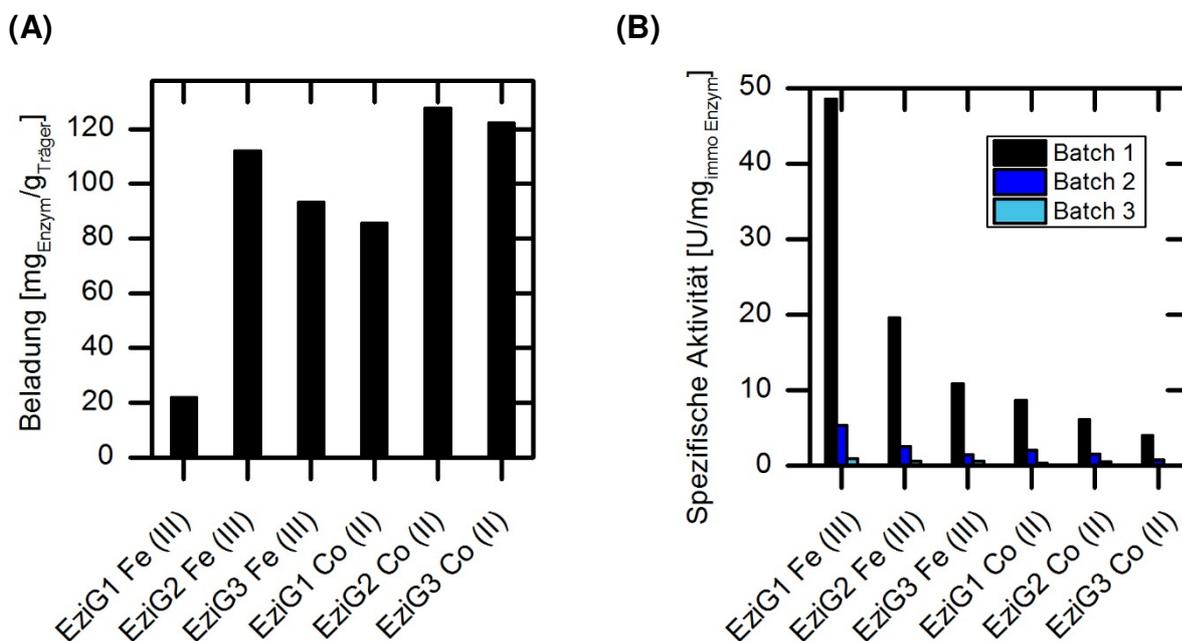


Abbildung 29: Untersuchung verschiedenen Typen von EziGTM porösen Glas Trägern in Hinsicht auf die Enzymbeladung (A) und spezifische Aktivität in wiederholten Batch-Experimenten (B) in der Phenylmalonsäure Umsetzung katalysiert durch die immobilisierte aufgereinigte (S)-selektive AMDase-CLGIPL.

Reaktionsbedingungen für (B): V = 50 mL, U_{Rührer} = 400 rpm, pH 8, c_{Tris-Puffer} = 45 mM, c_{PM, Start} = 20 mM, T = 30 °C, 2 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger durch Zentrifugation separiert und bei 4 °C gelagert.

Die Verwendung eines EziG Träger hat den Vorteil, dass Aufreinigung und Immobilisierung in einem Schritt durchgeführt werden können. Die vorangegangenen Versuche zur Trägersauswahl wurden mit dem immobilisierten aufgereinigten Enzym angefertigt. Im Folgenden wurde analysiert, ob das aufgereinigte, immobilisierte Enzym mit dem Immobilisat aus dem Zellysate vergleichbare Ergebnisse erzielte. Hierbei wurde der EziG3 Fe(III) Träger zu einem mit der aufgereinigten AMDase-CLGIPL-Mutante und dem Zellysate inkubiert. Die Träger wurden anschließend auf die spezifische Aktivität pro Gramm eingesetzter Präparation in zwei wiederholten Batch-Experimenten untersucht (Abbildung 30). Die Analyse zeigte mit dem immobilisierten Zellysate eine 60 % geringere Aktivität als in dem Vergleichsexperiment mit dem immobilisierten aufgereinigten Enzym erzielt wurde. Ein erneuter Einsatz der beiden Präparate zeigte in diesem Experiment ebenfalls einen hohen Aktivitätsverlust in der Wiederverwendung. Mit dem aufgereinigten, immobilisierten Enzym ist in der zweiten Anwendung nur noch 17 % der anfänglichen Aktivität zu beobachten und mit dem immobilisiertem Enzym aus dem Zellysate konnte nur noch 4 % der anfänglichen Aktivität detektiert werden.

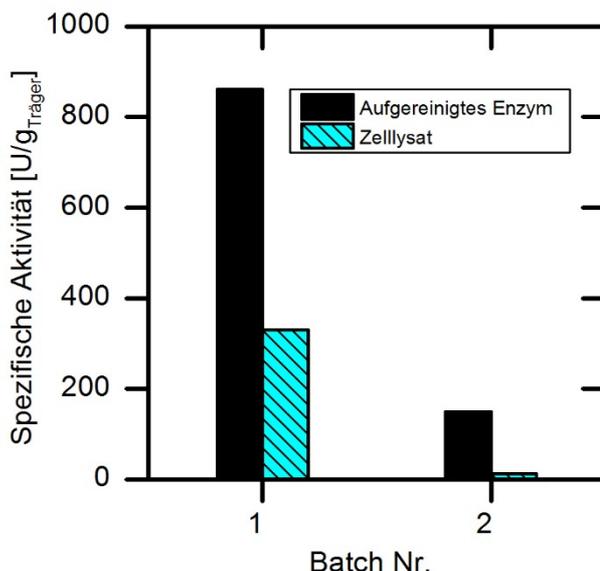


Abbildung 30: Spezifische Anfangsaktivitäten der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante an EziG3 Fe(III) immobilisiert mit dem aufgereinigten Enzym und mit der Immobilisierung aus dem Zellysate.

Reaktionsbedingungen: $V = 50 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 400 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $C_{\text{PM, Start}} = 25 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger durch Zentrifugation separiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die Aktivität ist mit der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutanten aus dem Zellysate deutlich geringer als mit dem aufgereinigten Enzym. Bei der Anbindung über die Komplexierung werden speziell die N-terminalen His₆-Tags der AMDase angebunden. Die deutlich geringere Aktivität kann durch mehrere Ursachen hervorgerufen werden: Die vorhandenen Bindepositionen können durch die im Zellysate anwesenden Proteine blockiert werden und/oder es kann im Verlauf der Immobilisierung zur Desaktivierung des Zielproteins kommen.

Zur weiteren Analyse wurde der Affinitätsträger EziG3 Fe(III) weiter analysiert (Abschnitt 2.4.2).

2.4.2 Optimierungsversuche mit Affinitätsträger

Die Analysen der Immobilisierung mit dem Affinitätsträger zeigten vielversprechende Ergebnisse mit hohen Aktivitäten. Jedoch ist der Aktivitätsverlust in der wiederholten Anwendung des Trägers hoch und die Immobilisierung des Zelllysats an den Affinitätsträger zeigte deutlich niedrigere Aktivitäten als mit dem aufgereinigten Enzym. Zur weiteren Analyse wurde der Einfluss von Protease-Inhibitoren und die Immobilisierungsdauer auf die Aktivität untersucht (Abbildung 31).

Die Immobilisierung aus dem Zelllysats kann von dem Abbau des Zielenzym durch zellinterne Proteasen beeinflusst sein. Um zu analysieren, ob Proteasen einen Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung des Zelllysats hervorgerufen haben, wurde die Immobilisierung in einem parallelen Ansatz einmal mit Zufügen eines Protease-Hemmers und ohne diesen Zusatzstoff durchgeführt. Hierbei konnte ein Anstieg der spezifischen Aktivität pro Gramm Präparat von 40 U/g_{Träger} erreicht werden, was wiederum auf einen Abbau des Zielproteins im Immobilisierungsprozess von zellinternen Proteasen im Zelllysats schließen lässt.

Eine Reduktion der Immobilisierungsdauer auf 1 h führte ebenfalls zu einer höheren Aktivität von 180 U/g_{Träger} gegenüber 98 U/g_{Träger} in dem Vergleichsexperiment mit der Immobilisierungsdauer von 16 h.

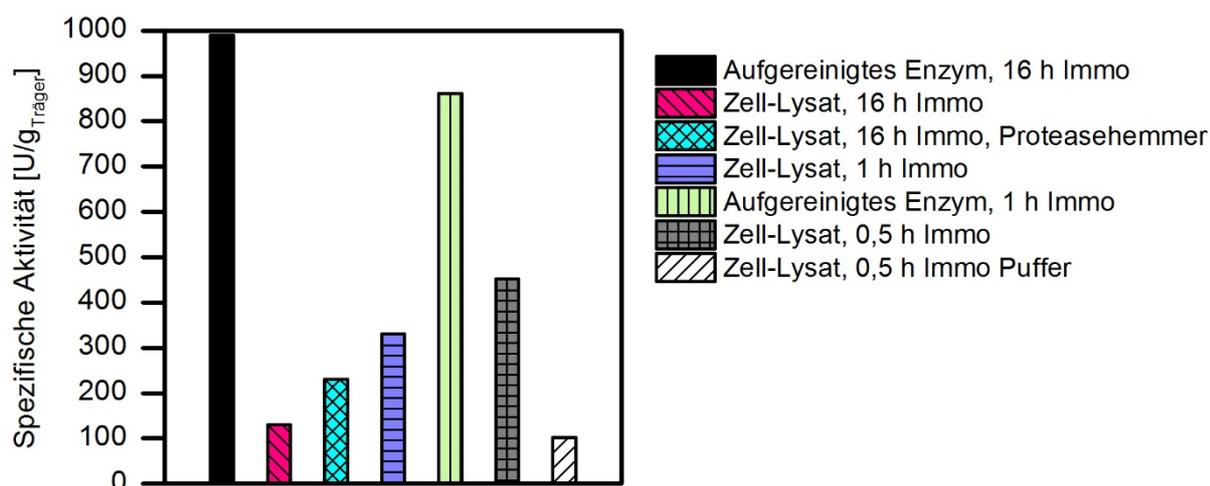


Abbildung 31: Vergleich der spezifischen Aktivität der immobilisierten aufgereinigten und AMDase-CLGIPL-Mutanten aus dem Zelllysats an EziG3 Fe(III) Träger in der Phenylmalonsäure Umsetzung.

Reaktionsbedingungen: V = 50 mL, U_{Rührer} = 400 rpm, pH 8, c_{PM, Start} = 25 mM, T = 30 °C, 2 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger durch Zentrifugation separiert und bei 4 °C gelagert.

Ein weiteres Experiment mit dem aufgereinigtem Enzym mit Reduktion der Immobilisierungsdauer auf 1 h zeigte 51 % geringere Aktivität des Immobilisates im Vergleich zu einer Immobilisierung über eine Immobilisierungszeit von 16 h. Dabei kann man davon ausgehen, dass die Immobilisierungszeit nicht ausreichte, um das Enzym an alle funktionellen Gruppen des Trägers anzubinden. Für das immobilisierte Zelllysate mit einer Verkürzung der Immobilisierungszeit auf 1 h konnte hingegen eine Verdopplung der Aktivität gegenüber dem Vergleichsexperiment mit einer 16 h Immobilisierung beobachtet werden. Dieses Resultat bestätigt, dass das Zielenzym im Zelllysate durch Proteasen zersetzt wird.

Bei einer weiteren Verkürzung der Immobilisierungszeit des Zelllysates auf 0,5 h stieg die Aktivität auf 316 U/g_{Träger}. Eine wiederholte Anwendung dieses Immobilisates zeigte jedoch lediglich 14 U/g_{Träger}, was einem Aktivitätsverlust von 97 % entspricht. Immobilisierungsversuche unter Einsatz von Puffern im Immobilisierungsmedium und/oder dem Reaktionspuffer ergaben ebenfalls keine Verbesserung der Aktivitäten.

In einer wiederholten Anwendung der komplexbildenden immobilisierten Enzyme konnte für die Präparation mit aufgereinigtem Enzym, unabhängig von der Immobilisierungszeit, eine Restaktivität von 17 % detektiert werden. Die Restaktivität des immobilisierten Zelllysates in einer wiederholten Anwendung lag bei 4 % gegenüber der ersten Anwendung. Demnach ist die Aktivität des komplex immobilisierten Enzymes aus dem Zelllysate gegenüber dem aufgereinigtem Enzym geringer und in der Wiederverwendung ist ein höherer Aktivitätsverlust detektierbar.

2.4.3 Vergleich der verbleibenden Aktivität in wiederholten Batch-Versuchen

Die Wiederverwendbarkeit des immobilisierten Enzymes ist der entscheidende Parameter um den zusätzlichen Kostenfaktor zu kompensieren. Zwei Präparate wurden hierfür ausgewählt um die immobilisierte AMDase-CLGIPL-Mutante bei der Umsetzung von Phenylmalonsäure zu analysieren. Hierfür wurde der EziG1 Co(II) Träger gewählt, welcher in den ersten Screening der Trägermaterialien die besten Resultate zeigte. Zum Vergleich wurde ein Träger mit kovalenter Anbindung gewählt (Amino C2 Acrylat). Beide Träger wurden in 100 mL Rührkesselreaktoren auf die verbleibende Aktivität des Immobilisates untersucht (Abbildung 32).

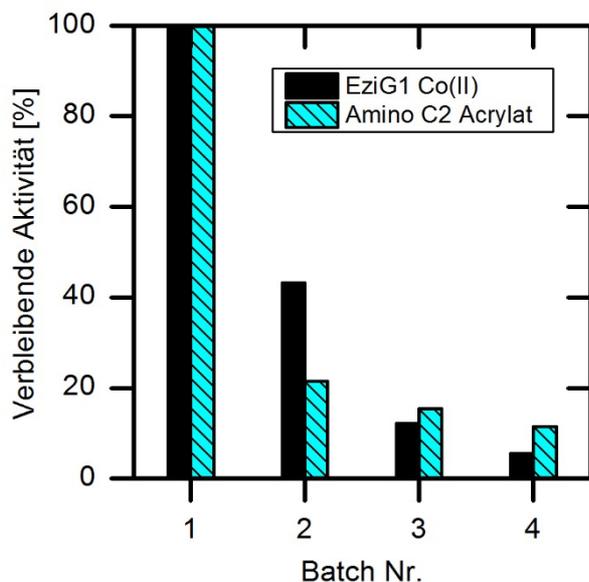


Abbildung 32: Aktivität der immobilisierten aufgereinigten AMDase-CLGIPL an EziG1 Co(II) und Amino C2 Acrylatträger in wiederholten Batch-Versuchen.

Reaktionsbedingungen: $V = 100 \text{ mL}$,
 $U_{\text{Rührer}} = 400 \text{ rpm}$, $\text{pH } 7$, $c_{\text{PM, Start}} = 20 \text{ mM}$,
 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

In beiden Ansätzen zeigte die Analyse einen hohen Aktivitätsverlust bei der zweiten Anwendung. Dies könnte an dem unspezifisch adsorptiv angebondenen Enzym liegen, welches nach der ersten Anwendung mit abgespült wurde. In den nachfolgenden Anwendungen (2.–4. Batch) ist bei dem komplex immobilisierten Enzym in jeder Rezyklierung ungefähr eine Halbierung der enzymatischen Aktivität zu beobachten. Der Aktivitätsverlust bei dem kovalent immobilisierten Enzym war um 20-30 % geringer als bei dem komplex immobilisiertem Enzym ab dem zweiten Batch.

Die geringen Aktivitäten der komplexen Immobilisierung aus dem Zelllysat und die hohen Aktivitätsverluste in der erneuten Anwendung zeigen deutlich, dass diese Präparation für den angestrebten Prozess nicht geeignet ist. Für die nachfolgende Prozessentwicklung wurde die kovalente Immobilisierung an dem Träger Amino C2 Acrylat gewählt, um ein möglichst stabiles fest angebondenes Enzym zu generieren.

Die aufgereinigte immobilisierte AMDase-CLGIPL-Mutante wurde weiter in der Umsetzung von einer höheren Konzentration (100 mM) der Naproxenmalonsäure analysiert (Abbildung 33).

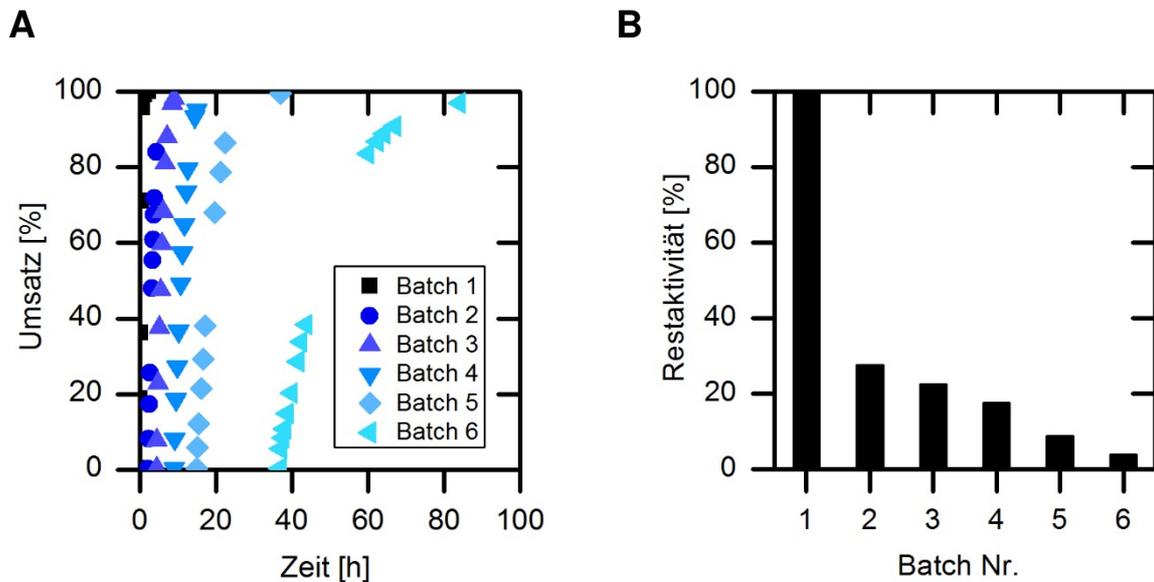


Abbildung 33: Umsetzung von Naproxenmalonsäure katalysiert durch die immobilisierte AMDase-CLGIPL-Mutante an Amino C2 Acrylat in wiederholten Batch-Experimenten (A) und die enzymatische Restaktivitäten (B). Reaktionsbedingungen: $V = 1,5 \text{ mL}$, $U_{\text{Schüttler}} = 1500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $c_{\text{NM, Start}} = 100 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $66,7 \text{ g/L}$ Träger mit immobilisiertem Enzym, Beladung: $80,7 \text{ mg}_{\text{Enzym}}/\text{g}_{\text{Träger}}$. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Das Immobilisat konnte für die Naproxen-Synthese in sechs wiederholten Anwendungen eingesetzt werden. Dabei konnten hohe Aktivitätsverluste von 72 % vom ersten zum zweiten Batch detektiert werden. Dies kann durch ein mögliches Abspülen von nicht koordinativ gebundenen Enzym erklärt werden. Der Aktivitätsverlust in den darauffolgenden Anwendungen weist geringere Werte auf. Unabhängig von dem Substrat bzw. der Konzentration ist in den wiederholten Anwendungen des immobilisierten Enzymes ein vergleichbarer Aktivitätsverlust detektierbar. Da für den Bioprozess letztendlich ein möglichst stabiles Präparat angestrebt wird, sind Optimierungen erforderlich. Im folgenden Abschnitt 2.5 sind weitere Optimierungsversuche für die immobilisierte AMDase an Amino C2 Acrylat beschrieben.

- Das Enzym konnte erfolgreich immobilisiert werden. Die komplexe Immobilisierung zeigte hohe Aktivitäten, jedoch starke Aktivitätsverluste in den wiederholten Anwendungen.
- Für weitere Experimente wurde ein kovalent angebundenes Enzym an Acrylatträger gewählt.

2.5 Optimierungsversuche des kovalent immobilisierten Enzymes³

Mit der Immobilisierung des freien aufgereinigten Enzymes konnte eine deutliche Stabilitätssteigerung erreicht werden. Das Ziel der nachfolgenden Experimente ist es die Anwendung des immobilisierten Enzymes weiter für die Prozessanwendung zu optimieren.

2.5.1 Immobilisierung des Enzymes aus dem Zellysate

Eine der zeitintensivsten und mit hohen Kosten verbundenen Schritte für die biokatalytische Produktion von Profenen stellt die Bereitstellung des Biokatalysators für die Synthese dar. Die Kosten für die Enzymproduktion ist einer der essentiellen Parameter der einen Einfluss auf die Rentabilität des biokatalytischen Verfahrens hat. Die enzymatische Aufreinigung stellt hierbei eine Erhöhung der Kosten um das über 10-fache gegenüber dem Einsatz als Ganzzell-Biokatalysator dar (Tufvesson *et al.* 2011). Bei manchen ausgewählten Prozessen kann das Enzym nicht als Ganzzell-Biokatalysator eingesetzt werden, da durch zellinterne Proteine ebenfalls unerwünschte Nebenreaktionen auftreten können. Das Ziel ist es mit der einfachsten Form des Biokatalysators zu arbeiten, um möglichst Prozesskosten einzusparen (Pollard & Woodley 2007).

Die Immobilisierung des aufgereinigten Enzymes konnte erfolgreich in aktiver und stabilisierter Form gezeigt werden. Um den Schritt der enzymatischen Aufreinigung zu umgehen, wurde für die Immobilisierung in Folgeexperimenten zunächst die Immobilisierung vergleichend sowohl mit dem aufgereinigten Enzym und mit dem Zellysate durchgeführt. In wiederholten Batch-Versuchen wurden Aktivität und Stabilität der Immobilisate bei der Umsetzung von Phenylmalonsäure analysiert. (Abbildung 34).

Mit dem immobilisierten Zellysate konnten 30 % der katalytischen Aktivität pro Gramm Präparation erreicht werden. Die spezifische Aktivität des immobilisierten aufgereinigten Enzymes ist in einer vierten wiederholten Anwendung von anfänglichen 130 U/g_{Träger} auf 40 U/g_{Träger} gesunken. Dies entspricht einem 70 %igen Aktivitätsverlust. In der Anwendung des immobilisierten Zellysates konnte ein wesentlich geringerer Aktivitätsverlust von 40 % ermittelt werden (42 auf 25 U/g_{Träger}). Die immobilisierte AMDase-CLGIPL-Mutante an dem Amino C2 Acrylatträger scheint in einer co-immobilisierten Form mit umgebenden Proteinen aus dem Zellysate eine höhere Stabilität aufzuweisen. Dieser Effekt kann möglicherweise durch die

³ Anteile dieses Kapitels wurden publiziert in Aßmann *et al.* (2017a):

Aßmann M., Mügge C., Gaßmeyer S., Enoki J., Hilterhaus L., Kourist R., Liese A. and Kara S., Improvement of the process stability of arylmalonate decarboxylase by immobilization for biocatalytic profen synthesis. (2017), *Front. Microbiol.*, 8:448, 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00448.

veränderten Oberflächeneigenschaften des Enzymes durch die anderen umgebenden Proteine verursacht werden. Dieser stabilisierende Effekt von umgebenden Proteinen im Immobilisierungsprozess wird teilweise genutzt um stabile Enzympräparationen herzustellen, wie z.B. bei der Co-Immobilisierung von BSA als Helferprotein in der Herstellung von quervernetzten Enzymaggregaten (CLEA, engl.: *cross-linked enzyme aggregates*) (Ahumada *et al.* 2015).

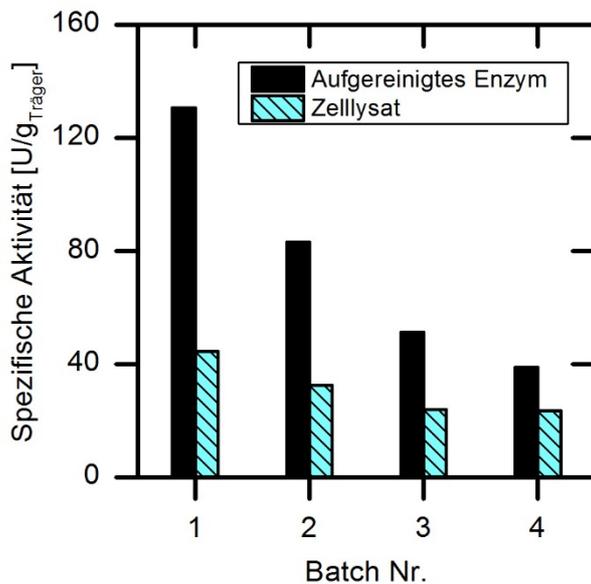


Abbildung 34: Vergleich der Aktivitäten der (S)-selektiven AMDase-CLGILP-Mutante immobilisiert aus dem Zellysat und mit dem aufgereinigten Enzym im Vergleich. Reaktionsbedingungen: $V = 50 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $C_{\text{PM, Start}} = 25 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur genaueren Analyse der Proteinverteilung im Zellysat und des Expressionslevels des Zielproteins der AMDase-CLGIPL wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abbildung 35). Die Untersuchung vor und nach der Immobilisierung zeigte, dass die gesamte Proteinmenge des Zellysats gleichbleibend im Immobilisierungsprozess war. Die Immobilisierung über den Glutartaldehyd aktivierten Träger bindet gleichmäßig das Proteingemisch. Die Aktivitätsanalyse ergab, dass 30 % des gesamten Zellysats aus der AMDase-CLGIPL-Mutanten besteht, welches mit der Expressionsanalyse gut übereinstimmt.

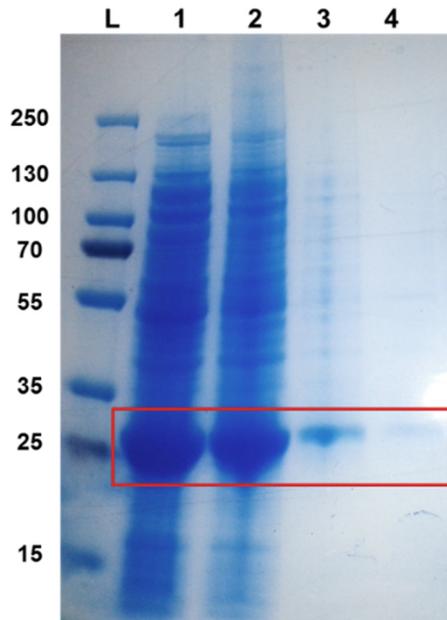


Abbildung 35: SDS-PAGE von dem Zelllysate der exprimierten AMDase vor und nach der Immobilisierung. L (Marker): Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; 1: Zelllysate (39 µg Protein/Spur); 2: Zelllysate nach Immobilisierung (14 µg Protein/Spur); 3: Waschschrift mit Wasser (3 µg Protein/ Spur); 4: Waschschrift mit 0,5 M NaCl (0.3 µg Protein/Spur). AMDase: 25 kDa.

Die Immobilisierung des Enzymes unter Verwendung des Zelllysats in aktiver Form kann an den Acrylatträger gut realisiert werden. Zudem zeigte dieses Immobilisat einen geringeren Aktivitätsverlust in der Wiederverwendung. Diese Präparation wurde für weitere Optimierungsversuche verwendet.

2.5.2 Beschichtung des immobilisierten Enzymes mit Polymeren

Die enzymatische Stabilität der AMDase-CLGIPL konnte erfolgreich mit der kovalenten Anbindung an den Acrylatträger gesteigert werden. Eine weitere Möglichkeit das immobilisierte Enzym auf dem Trägermaterial zu stabilisieren stellt die Beschichtung mit verschiedenen geladenen Polymeren dar (Bozzini *et al.* 2013). Diese Methode kann als Einfach- oder Mehrfachbeschichtung (sog Layer-by-Layer Methode) angewendet werden. Bei letzterem wird die Beschichtung abwechselnd mit positiven und negativ geladenen Polymeren realisiert, wie schematisch in Abbildung 36 gezeigt ist.

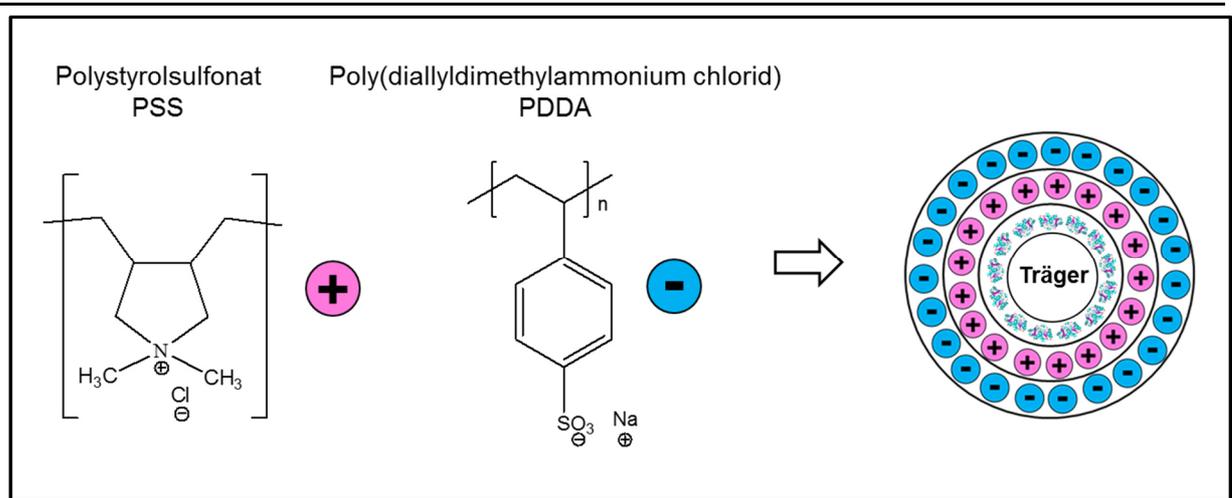


Abbildung 36: Beschichtung des immobilisierten Enzymes auf dem Träger mit ionischen Polymeren mit der Layer-by-Layer-Methode.

Für die Beschichtung wurde sowohl das Polystyrolsulfonat (PSS) als auch das Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDMA) eingesetzt. Zunächst erfolgte eine Analyse der enzymatischen Aktivität des immobilisierten Enzymes mit einer einfachen Beschichtung. Die einfach beschichteten Immobilisate wurden in Batch-Experimenten (1 mL Volumen) auf die spezifischen Aktivitäten in fünf wiederholten Anwendungen untersucht (Abbildung 37). Die spezifische Aktivität des beschichteten Immobilisates zeigte eine Verringerung der Aktivität durch die Beschichtung der Präparationen für das positiv und negativ beschichtete Präparat gegenüber einem Vergleichsexperiment mit unbeschichteten Immobilisat. In den wiederholten Batch-Experimenten ist kein signifikanter Unterschied zwischen den positiven und negativ geladenen Polymeren zu sehen. Innerhalb von fünf Wiederholungsversuchen zeigte der unbeschichtete Träger in den ersten vier Anwendungen höhere Aktivitäten als die beschichteten Träger. In einer fünften Anwendung konnte für den mit dem positiv geladenen PDMA beschichteten Träger gegenüber den unbeschichteten und PSS beschichteten Träger eine geringfügig höhere Aktivität mit $5 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$ gemessen werden. Wobei die Aktivität in den wiederholten Anwendungen von unter $20 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$ auf über $30 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$ in einer fünften Anwendung angestiegen ist. Dieser Anstieg wurde ebenfalls für das negativ beschichtete Immobilisat beobachtet der mit $5 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$ jedoch schwächer ausgeprägt ist.

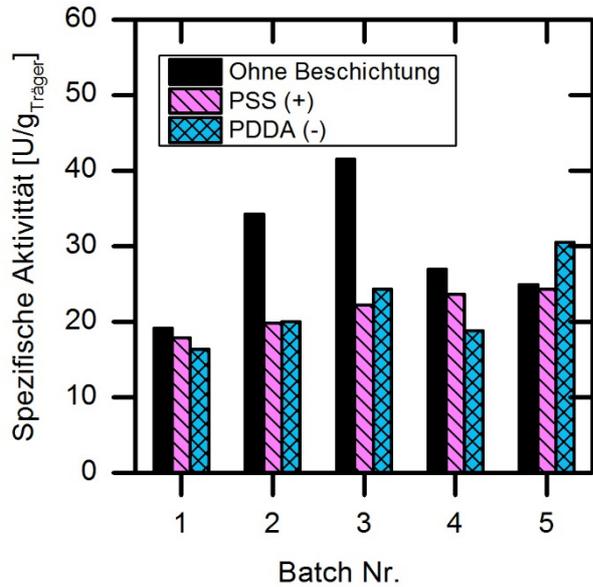


Abbildung 37: Wiederholte Batch-Versuche mit beschichteten immobilisierten AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysät an Amino C2 Acrylat mit einfacher PSS oder PDDA Beschichtung.

Reaktionsbedingungen: $V = 1 \text{ mL}$,
 $U_{\text{Schüttler}} = 1500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $C_{\text{NM, Start}} = 25 \text{ mM}$,
 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur weiteren Analyse der Polymerbeschichtung wurde das immobilisierte Enzym zudem noch auf eine mögliche Mehrfachbeschichtung untersucht. Hierbei wurde das Immobilisat mit einer fünffachen Beschichtung versehen, um die Auswirkung in wiederholten Batch-Versuchen zu untersuchen (Abbildung 38). Das Immobilisat wurde hierbei abwechselnd mit positivem und negativ geladenem Polymer beschichtet. Die spezifische Aktivität des Immobilisates war mit einer mehrfachen Beschichtung geringer als mit unbeschichteten Träger in Vergleichsexperimenten zeigten. Die Aktivitäten sind mit mehrfacher Polymerschicht etwas geringer als mit einfacher Beschichtung. Wobei auch hier ein tendenzieller Anstieg der Aktivitäten in der wiederholten Anwendung beobachtet werden konnte.

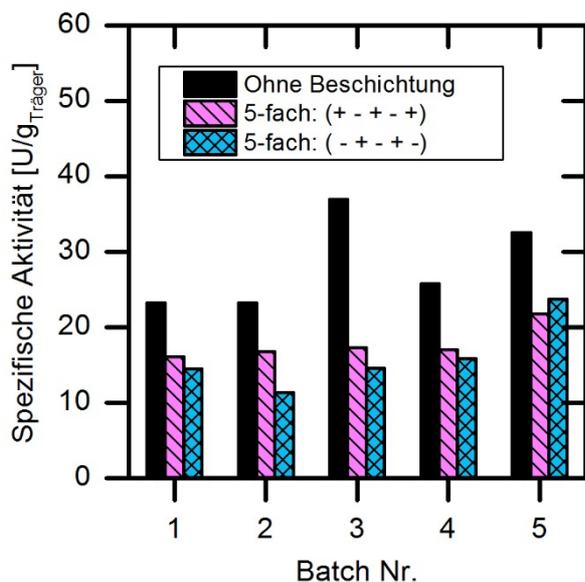


Abbildung 38: Wiederholte Batch-Versuche mit beschichteten immobilisierten AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysät an Amino C2 Acrylat mit fünffacher Beschichtung des Trägers. Reaktionsbedingungen: $V = 1 \text{ mL}$,
 $U_{\text{Schüttler}} = 1500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$, $C_{\text{NM, Start}} = 25 \text{ mM}$,
 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Eine mögliche Erklärung für die Aktivitätserhöhung in der Wiederverwendung der polymerüberzogenen Träger kann eine Blockierung des porösen Trägermaterials durch Polymere sein. Dies schränkt die freie Zugänglichkeit zu dem immobilisierten Enzym ein, wodurch die Aktivität verringert wird. Zwischen den erneuten Anwendungen wird in den Waschschritten Polymermaterial mit abgetragen. Dies könnte dazu beitragen dass unzugängliche, zuvor verstopfte, Poren wieder freigelegt werden.

Da die Beschichtung ein Herabsenken der Aktivität verursacht und zudem kein signifikanter Einfluss auf die Stabilität beobachtet werden konnte, wurden weitere Optimierungen mit dem unbeschichteten Immobilisat durchgeführt.

2.5.3 Einsatz von PEG₆₀₀ in der Synthese mit immobilisierten Enzym

In Experimenten mit freiem Enzym konnte ein stabilisierender Effekt unter Einsatz von PEG₆₀₀ gefunden werden (Abschnitt 2.3). In folgenden Experimenten wurde der Einfluss von 10 % (v/v) PEG₆₀₀ auf das immobilisierte Enzym auf Acrylaträger analysiert und mit Hinblick auf die spezifischen Aktivitäten pro Menge an eingesetztem Träger-Material untersucht (Abbildung 39).

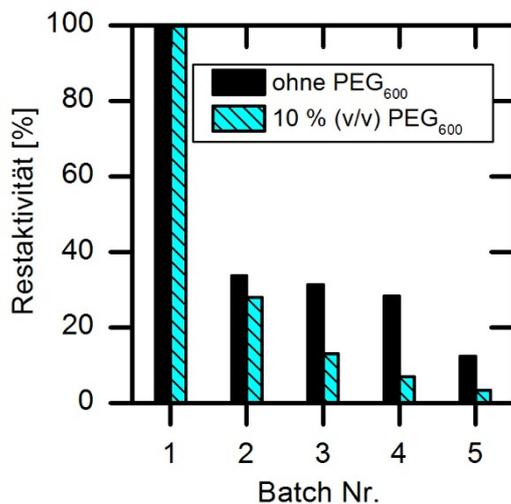


Abbildung 39: Einsatz von Polyethylenglycol in der Reaktionslösung mit immobilisierter AMDase-CLGIPL-Mutante aus dem Zelllysate an Amino C2 Acrylat in der Phenylmalonsäure Umsetzung.

Reaktionsbedingungen: V = 50 mL, U_{Rührer} = 400 rpm, pH 8, c_{PM, Start} = 25 mM, T = 30 °C, 0 % oder 10 % (v/v) PEG₆₀₀, 10 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den wiederholten Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert und bei 4 °C gelagert.

Die Analyse mit und ohne den Einsatz von 10 % (v/v) PEG₆₀₀ beim Umsatz von Phenylmalonsäure ergab eine geringere Aktivität des immobilisierten Enzymes bei Einsatz des Zusatzstoffs. Ohne Zusätze konnte eine spezifische Aktivität von 38 U/g_{Träger} detektiert werden, wohingegen mit Zugabe von 10 % (v/v) PEG₆₀₀ die Aktivität bei 33 U/g_{Träger} liegt. Bei der Wiederverwendung konnte ein noch stärkerer Aktivitätsverlust in den Batch-Versuchen mit PEG₆₀₀ beobachtet werden. Ohne Zusätze kann bei der fünften Anwendung des Immobilisats noch eine Restaktivität von 12 U/g_{Träger} gemessen werden, während die Restaktivität mit 10 % (v/v) PEG₆₀₀ nur noch bei 1 U/g_{Träger} liegt. Eine mögliche Ursache könnte das Verstopfen

der Poren des Trägermaterials mit dem Polymer sein, welches zuvor bereits bei der Polymerbeschichtung beobachtet werden konnte. Hierbei wird die Zugänglichkeit zu dem auch im Inneren des Trägers immobilisierten Enzymes zunehmend eingeschränkt. Zusammenfassend hat PEG₆₀₀ einen negativen Einfluss auf die Aktivität und die Wiederverwendbarkeit des immobilisierten Enzyms. Für Folgeexperimente wurde entsprechend ein Reaktionsgemisch ohne weitere Zusätze gewählt.

2.5.4 Temperaturabhängige Prozessstabilität des immobilisierten Enzymes

Wie bereits für das freie Enzym gezeigt wurde, kann die Temperatur ein wichtiger Faktor für die enzymatische Stabilität sein (Abschnitt 2.3). Die Prozessstabilität des an dem Acrylatträger immobilisierten Enzymes wurde mit Hilfe von Experimenten im kleinen Maßstab (1 mL) für vier verschiedenen Temperaturen untersucht (15, 25, 30 und 35 °C). Das immobilisierte Enzym aus dem Zelllysate wurde unter Schütteln bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und die verbleibende Aktivität während dem Umsatz von Naproxenmalonsäure gemessen.

Die spezifischen Aktivitäten wurden über einen Zeitraum von 13 Tagen, mit den Temperaturen von 15 °C und 25 °C (Abbildung 40) und über einen Zeitraum von 23 Tagen mit 30 und 35 °C (Abbildung 41) analysiert.

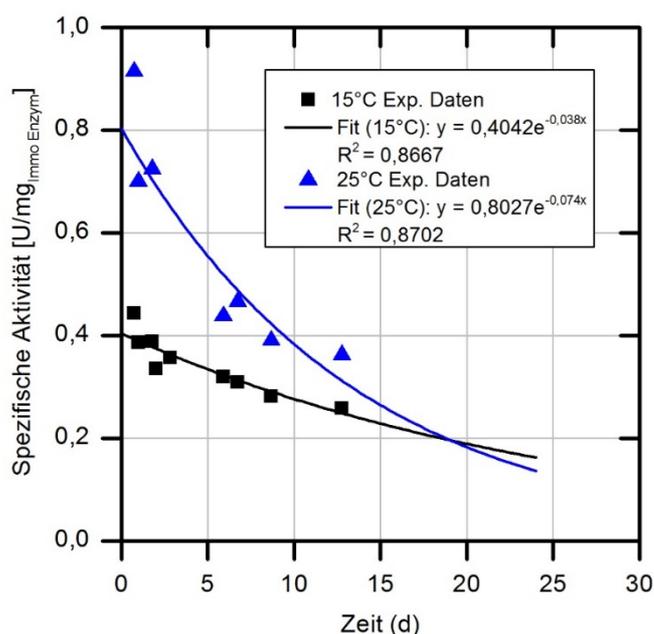


Abbildung 40: Spezifische Aktivitäten der immobilisierten AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysate an Amino C2 Acrylat unter Prozessbedingungen bei 15 und 25 °C. Reaktionsbedingungen: V = 1 mL, U_{Schüttler} = 900 rpm, pH 8 (justiert mit 1 M NaOH), c_{NM, Start} = 25 mM, T = 15 und 25 °C, 100 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den Messungen der Anfangsaktivität wurde der Träger weiter unter Prozessbedingungen mit der jeweiligen Temperatur in H₂O, pH 8 mit 900 rpm inkubiert.

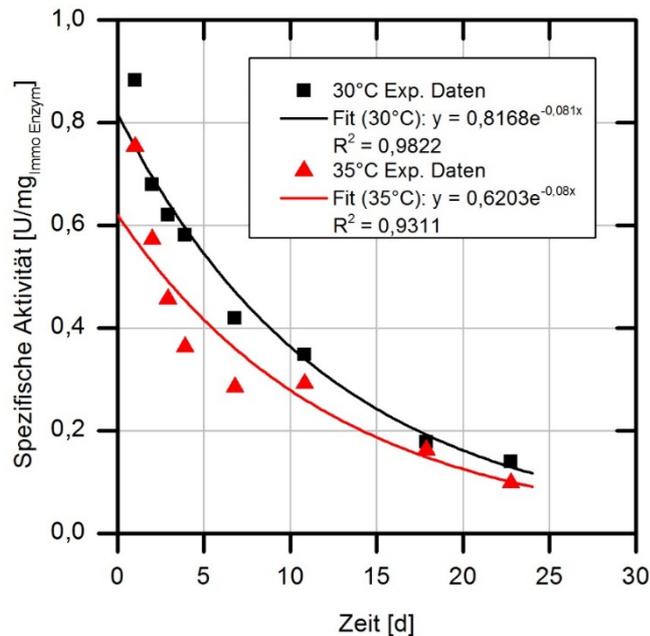


Abbildung 41: Spezifische Aktivitäten der immobilisierten AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysate an Amino C2 Acrylat unter Prozessbedingungen bei 30 und 35 °C. Reaktionsbedingungen: $V = 1 \text{ mL}$, $U_{\text{Schüttler}} = 900 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$ (justiert mit 1 M NaOH), $c_{\text{NM, Start}} = 25 \text{ mM}$, $T = 30$ und 35 °C , 100 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Zwischen den Messungen der Anfangsaktivität wurde der Träger weiter unter Prozessbedingungen mit der jeweiligen Temperatur in H_2O , $\text{pH } 8$ mit 900 rpm inkubiert.

Die Reaktion bei 15 °C zeigte eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität im Vergleich zu den anderen Temperaturen. Eine Temperaturerhöhung von 15 auf 25 °C führte zu einer Verdopplung der spezifischen Aktivität von $0,4$ auf über $0,8 \text{ U/mg}_{\text{immobilisiertes Enzym}}$. Eine weitere Temperaturerhöhung auf 30 bzw. 35 °C erzielte keinen signifikanten Anstieg der Aktivität. Tabelle 17 fasst die Werte der Stabilitätsmessung zusammen. Die Analyse der spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen Temperaturen zeigte, dass das immobilisierte Enzym bei Erniedrigung der Temperatur eine höhere Stabilität aufweist. Mit 15 °C konnte eine Halbwertszeit von über 18 Tagen erreicht werden, jedoch bei geringer Aktivität. Mit einer Temperatur von 30 °C , wie sie zuvor verwendet wurde, konnte die Halbwertszeit auf $8,6$ Tage ($206,4 \text{ h}$) erhöht werden. Dies entspricht einer über 170 -fachen Steigerung der Stabilität gegenüber der des freien Enzymes ($\tau_{1/2} = 1,2 \text{ h}$).

Ergebnisse

Tabelle 8: Berechnete Prozessparameter der Stabilitätsstudie bei 15 bis 35 °C.

Temperatur [°C]	k_{cat} [d ⁻¹]	k_{des} [d]	$\tau_{1/2}$ [d]	TTN [-]
15	14551	0,038	18,2	382.926
25	28897	0,074	9,4	390.502
30	29405	0,081	8,6	363.022
35	22331	0,08	8,7	279.135

Mit Verringerung der Temperatur steigt die TTN von 279.000 bei 35 °C auf ca. 400.000 bei Temperaturen von 25 °C und 15 °C deutlich an. Mit diesem Anstieg ist allerdings auch eine Erhöhung der benötigten Reaktionszeit verbunden. Die Reaktionszeit ist für eine industrielle Anwendung ein wichtiger Parameter. Abbildung 42 verdeutlicht den Zusammenhang der berechneten TTN Werte und den benötigten Zeitverbrauch, welche zum Erreichen bis zur enzymatischen Desaktivierung (Annahme: 0,1 % Restaktivität) benötigt wird. Die Berechnung wurde mit der Annahme von einer 0,1 %igen Restaktivität durchgeführt, da der exponentiell abfallende Fit zur Ermittlung der Desaktivierung die Zeitachse (X-Achse) nur asymptotisch annähert.

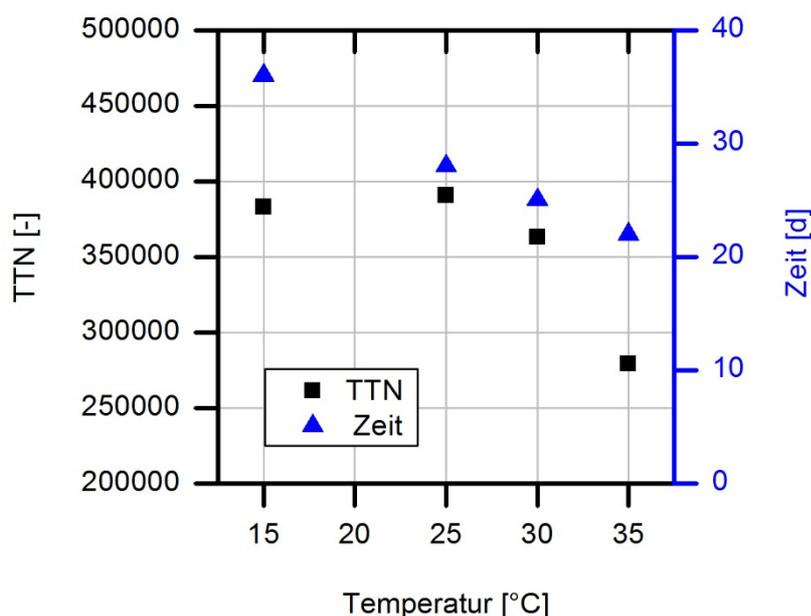


Abbildung 42: Berechnete TTN Werte und theoretisch benötigter Zeitverbrauch zum Erreichen der TTN bei verschiedenen Reaktionstemperaturen der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante in der Naproxenmalonsäure Umsetzung.

Der Bioprozess mit der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante kann mit Temperaturen von 25 °C und 30 °C am effektivsten realisiert werden. Für die Folgeexperimente mit immobilisiertem Enzym wurde weiterhin eine Temperatur von 30 °C gewählt. Diese Temperatur stellt einen guten Kompromiss zwischen katalytischer Aktivität und Stabilität dar. Eine Prozessführung bei 25 °C ist ebenfalls denkbar, da hierbei Heizenergie eingespart werden kann.

Im folgenden Abschnitt 0 wird das immobilisierte Enzym detailliert für die weitere Bioprozessgestaltung charakterisiert.

- Die Immobilisierung des Enzymes aus dem Zelllysate konnte erfolgreich demonstriert werden und wird für die weitere Prozessentwicklung angewendet.
 - Weitere Optimierungen, wie die Beschichtung des Trägers ergaben keine weitere Verbesserung.
 - Untersuchungen der Stabilität bei 30 °C zeigten eine über 170-fache Stabilitätssteigerung.
-

2.6 Charakterisierung der immobilisierten AMDase-CLGIPL⁴

2.6.1 Kinetische Charakterisierung

Für die kinetische Untersuchung des immobilisierten Enzymes wurde eine kovalente Immobilisierungsvariante an einen Amino C2 Acrylatträger gewählt, um die AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysate zu fixieren. Das immobilisierte Enzym wurde auf die Umsetzung von Naproxenmalonsäure in einem Konzentrationsbereich von 0,1 mM bis 100 mM untersucht (Abbildung 43).

Hierbei zeigt das Enzym ein deutliches Michaelis-Menten Verhalten in der Umsetzung und weist eine maximale Umsatzrate v_{\max} von $3,62 \pm 0,1$ U/mg_{Immo Enzym} auf. Dies entspricht 60 % der Aktivität, die für die freie AMDase-CLGIPL in der Naproxenmalonsäure Umsetzung ermittelt werden konnte ($k_{\text{cat, freies Enzym}} = 151 \text{ min}^{-1}$ und $k_{\text{cat, Immo}} = 90 \text{ min}^{-1}$). In dem analysierten Substratbereich bis 100 mM war keine Substratüberschussinhibierung

⁴ Anteile dieses Kapitels wurden publiziert in Aßmann *et al.* (2017b): Aßmann, M., Stöbener, A., Mügge, C., Gaßmeyer, S.K., Hilterhaus, L., Kourist, R., Liese, A. & Kara, S. 2017. Reaction engineering of biocatalytic (S)-naproxen synthesis integrating in-line process monitoring by Raman spectroscopy. *React. Chem. Eng.* **33**, 302. DOI: 10.1039/c7re00043j

feststellbar. Die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante des immobilisierten Enzyms hat einen Wert von $K_M = 22.14 \pm 0.1$ mM. Die Affinität infolge der Immobilisierung ist im Vergleich zum freien Enzym mit einem K_M von 0.075 ± 0.024 mM um den Faktor 300 gesunken. Das immobilisierte Enzym benötigt demnach eine höhere Substratkonzentration, um die maximale Umsatzrate zu erreichen. Diese Beobachtung ist ein bekanntes Phänomen und wurde bereits in anderen Studien bei der Immobilisierung von Enzymen an Trägermaterialien festgestellt (Sardar *et al.* 2003). In anderen Fällen kann allerdings auch eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität erreicht werden, wie z.B. bei der Immobilisierung einiger Lipasen, da diese hierbei in der aktiven Form stabilisiert wird (Mateo *et al.* 2007).

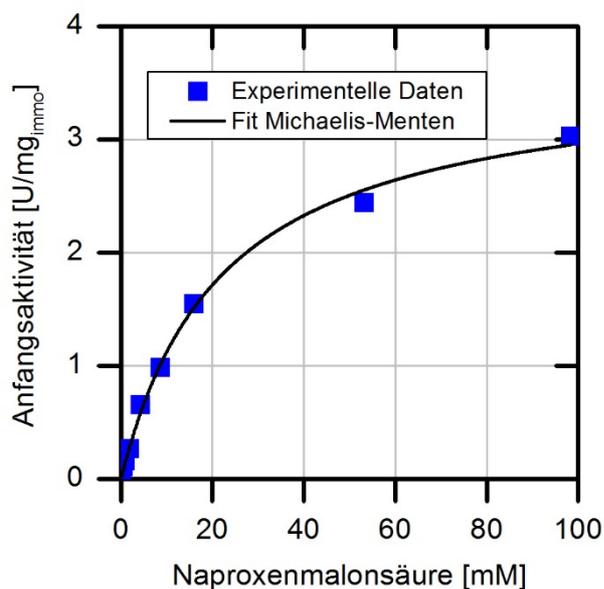


Abbildung 43: Kinetische Charakterisierung der (S)-selektiven AMDase-Mutante in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure.

Reaktionsbedingungen:

$V = 1$ mL, $U_{\text{Schüttler}} = 900$ rpm, pH 8 (justiert mit 1 M NaOH), $c_{\text{NM, Start}} = 0\text{--}100$ mM, $T = 30$, Variierende Menge Träger mit immobilisiertem Enzym. Beladung: $8,6 \text{ mg}_{\text{AMDase-Mutante}}/\text{g}_{\text{Träger}}$.

Die Immobilisierung des Enzymes verändert die Mikroumgebung des Enzymes durch das umgebende Trägermaterial. Dies kann Veränderungen der kinetischen Parameter hervorrufen, was in den meisten Fällen zu einer herabgesetzten maximalen Umsatzrate durch die Immobilisierung führt (Guisan 2006). Jedoch wird die reduzierte Aktivität meist durch die Stabilisierung und damit Erhöhung der Produktivität durch die Immobilisierung kompensiert.

Das Enzym wird bei der Immobilisierung sowohl an der Trägeroberfläche, als auch in dem Inneren des porösen Materials fixiert (Porenvolumen $1,14 \text{ mL}/\text{g}_{\text{Träger}}$). Für den Substratumsatz ist es erforderlich, dass das Substrat in das poröse Material diffundiert. Beeinträchtigungen bei diesem diffusiven Stofftransport werden als Diffusionslimitierung des immobilisierten Enzyms bezeichnet (Liese & Hilterhaus 2013). Grundsätzlich wird zwischen der internen und externen Diffusionslimitierung unterschieden, wobei in Abschnitt 1.1.2 auf die externe Diffusionslimitierung des hier betrachteten Systems genauer eingegangen wird.

Für die Wahl des optimalen Reaktorsystems für die Biosynthese von Profenen ist es wichtig den Einfluss des gebildeten Produktes auf die enzymatische Aktivität zu kennen. Insbesondere im Fall von kontinuierlich betriebenen Reaktoren, wie einem gepackten Strömungsrohr-Reaktor (*engl.: Plug flow reactor, PFR*) oder einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor (*engl. Continuously Stirred tank reactor, CSTR*) kann eine starke Inhibierung durch das gebildete Produkt den Vollumsatz verhindern. Im in dieser Arbeit diskutierten System könnte das gebildete Produkt Naproxen eine Reduktion des Umsatzes auslösen, da die AMDase dafür bekannt ist, in Anwesenheit des Produktes einen signifikanten Aktivitätsverlust aufzuweisen (Obata & Nakasako 2010). Ebenfalls wurde im Rahmen dieser Studie ein geringer Aktivitätsverlust der freien AMDase-CLGIPL-Mutante in der Anwesenheit von Naproxen in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure beobachtet (Absatz 2.2.2).

Zur weiteren kinetischen Charakterisierung wurde das Reaktionssystem im Hinblick auf eine mögliche kompetitive Produktinhibierung durch Naproxen untersucht. Für diesen Zweck wurde das immobilisierte Enzym auf die Veränderungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei einer konstanten Substratkonzentration von 45 mM Naproxenmalonsäure in der Anwesenheit von 0 bis 70 mM Naproxen untersucht (Abbildung 44). Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten im betrachteten Konzentrationsbereich sinken von 2,5 U/mg_{imm} ohne Naproxen zu 1,4 U/mg_{imm} mit einer Konzentration von 67 mM Naproxen. Demnach ist die immobilisierte AMDase-CLGIPL durch das Naproxen inhibiert. Mit Hilfe eines Fit Modells, basierend auf die Michaelis-Menten Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung konnte eine Inhibitorkonstante K_i von $26,34 \pm 1,4$ mM für Naproxen ermittelt werden (Gl. 1). Für eine effiziente Reaktion mit vollständigen Umsatz sollte der Quotient aus der Michaelis-Menten-Konstante und der Inhibitorkonstante kleiner eins sein ($K_M/K_i < 1$). Bei einem höheren Wert wäre die enzymatische Affinität des Enzymes gegenüber dem Produkt für einen vollständigen Umsatz zu groß (Lee & Whitesides 1986) (Liese *et al.* 1996). Das immobilisierte Enzym weist einen Quotienten K_M/K_i von 0,84 auf, dementsprechend ist eine Reaktionsführung ohne kontinuierliche Produktabtrennung möglich. Es kann festgehalten werden, dass durch das Produkt Naproxen eine geringe Produktinhibierung im betrachteten System vorliegt.

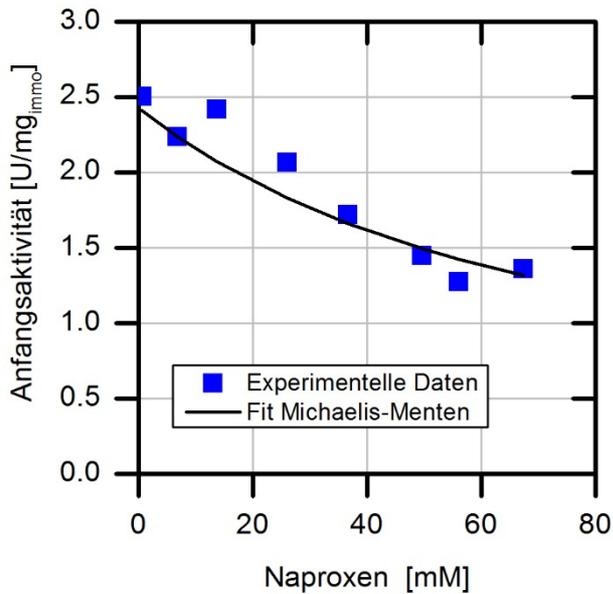


Abbildung 44: Untersuchung der kompetitiven Produktinhibierung der (S)-selektiven AMDase-Mutante in der Naproxenmalonsäure Umsetzung mit verschiedenen Startkonzentrationen von Naproxen.

Reaktionsbedingungen:

V = 1 mL, U_{Schüttler} = 900 rpm, pH 8 (justiert mit 1 M NaOH), C_{NM, Start} = 45 mM, C_{Nap, Start} = 0—70 mM T = 30, 20 g/L Träger mit immobilisiertem Enzym. Beladung: 8,6 mgAMDase-Mutante/gTräger.

$$v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_{M,S} \times \left(1 + \frac{[P]}{K_{i,P}}\right) + [S]} \quad v = \frac{3.62 \left[\frac{U}{mg}\right] \times NM [mM]}{22.14_{,NM} [mM] \times \left(1 + \frac{NA [mM]}{26.34_{,NA[mM]}}\right) + NM [mM]}$$

Gl. 1

Mit:

- v Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]
- v_{max} Maximale Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]
- S Substratkonzentration [mM]
- K_M Michaelis-Menten-Konstante [mM]
- K_i Inhibitor-Konstante [mM]
- P Produktkonzentration [mM]

Mit Hilfe dieser Gleichung ist es möglich eine Vorhersage über die Geschwindigkeit der Reaktion zu erstellen und die Länge der Reaktionszeit für die volle Umsetzung theoretisch zu ermitteln.

2.6.2 Untersuchung auf mögliche externe Stofftransportlimitierungen

Bei der Immobilisierung an dem Träger kann es zu einer Diffusionslimitierung kommen, da das Substrat zunächst die Barriere in den Träger überwinden muss, damit die enzymatisch katalysierte Reaktion stattfinden kann. Eine experimentelle Möglichkeit zur Untersuchung der Diffusionslimitierung ist das Durchführen der Reaktion in zwei Festbettreaktoren mit unterschiedlichem Bettvolumen. Hierbei wird die Verweilzeit in beiden Festbettreaktoren über die Anpassung des Volumenstromes der Substratlösung konstant gehalten. Um sich das Verhalten genauer anschauen zu können, werden über den Volumenstrom unterschiedliche Verweilzeiten eingestellt. In beiden Festbettreaktoren steht für den Umsatz zum Produkt die gleiche Zeitspanne zur Verfügung, die Systeme unterscheiden sich nur in den Stromfluss

durch das Festbett des gepackten Trägers. Bei einer diffusionskontrollierten Reaktion hängt die Umsetzung nicht nur von der Zeit ab, welche für die Reaktion zur Verfügung steht, sondern auch von dem Fluss durch das poröse Material. Eine rein reaktionskontrollierte Biokatalyse mit immobilisiertem Enzym weist bei gleichen Verweilzeiten identische Umsetzungsraten auf. Besteht jedoch eine externe Diffusionslimitierung, kann eine höhere Umsetzung mit höheren Flussraten beobachtet werden (Abbildung 45 (Liese & Hilterhaus 2013)).

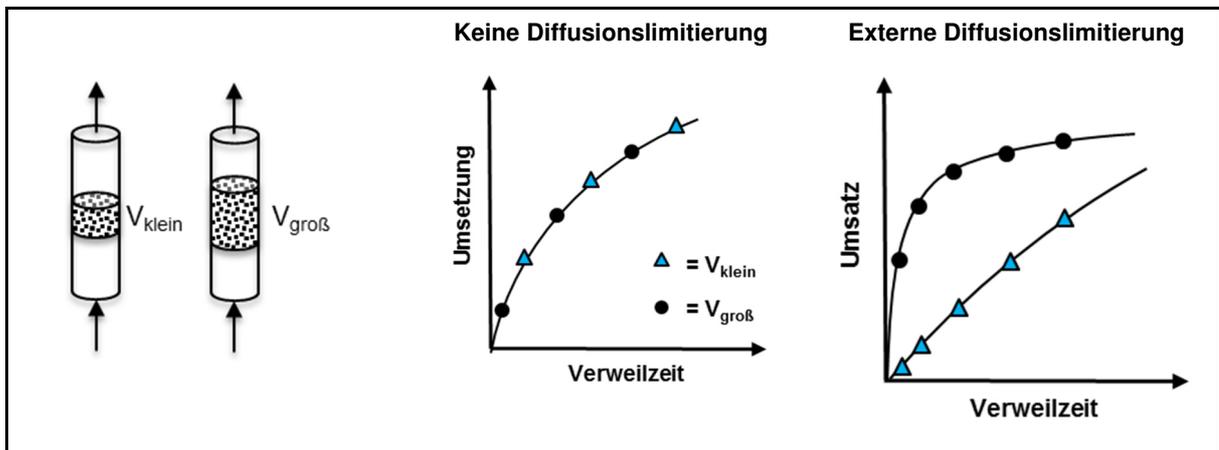


Abbildung 45: Analyse auf mögliche externe Stofftransportlimitierungen von immobilisierten Enzymen (Abbildung nach (Liese & Hilterhaus 2013)).

Für die experimentelle Ermittlung von möglichen Stofftransportlimitierungen wurden zwei Säulen mit der immobilisierten AMDase-CLGIPL an Amino C2 Acrylat gepackt und die Umsetzung von einer 5 mM Flurbiprofenmalonsäure Reaktionslösung bei vier verschiedenen Verweilzeiten ($\tau = 1, 2, 5$ und 6 min) analysiert (Abbildung 46).

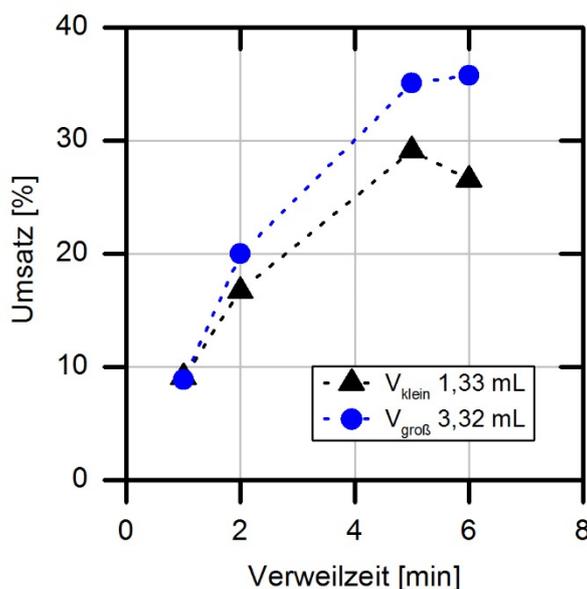


Abbildung 46: Untersuchung der Stofftransportlimitierung der immobilisierten (S)-selektiven AMDase-CLGIPL an Amino C2 Acrylat in zwei gepackten Säulen mit verschiedenen Packungsvolumina (1,3 mL und 3,3 mL). Die Flussraten wurden bei festgesetzten Verweilzeiten variiert ($\tau = 1, 2, 5$ und 6 min). Reaktionsbedingung: 5 mM Flurbiprofenmalonsäure, Raumtemperatur.

Mit steigender Verweilzeit sind Unterscheide zu beobachten, wobei bei geringer Verweilzeit identische Umsätze erzielt werden konnten. Mit längeren Verweilzeiten ist bei dem experimentellen Ansatz mit einem größeren Volumen des gepackten Trägers eine höhere Umsatzrate feststellbar als für den Ansatz mit kleinen Packungsvolumen. Je höher die Flussrate, desto effizienter kann die Reaktionslösung in das Trägermaterial eindringen und somit von dem immobilisierten Enzym zum Produkt umgesetzt werden. Der Fluss hat ebenfalls einen Einfluss auf die Filmdiffusion. Mit Steigern der Flussgeschwindigkeit wird die Filmschicht auf der Oberfläche der Carrier geringer und damit auch der Einfluss der Filmdiffusion. Beide Phänomene tragen dazu bei, dass ein höherer Umsatz im Fall einer Diffusionslimitierung erzielt werden kann. Demnach liegt bei erhöhten Verweilzeiten zwischen 5 und 6 min eine externe Diffusionslimitierung vor.

2.6.3 Wahl des geeigneten Reaktorkonzepts

Die Charakterisierung des immobilisierten Enzymes zeigte einen hohen K_M -Wert in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure und einen inhibierenden Effekt durch das gebildete Naproxen. Dies führt insbesondere in den Endphasen der Reaktion, mit geringen Substrat- und hohen Produktkonzentrationen, zu einer deutlichen Reduktion der enzymatischen Aktivität. Ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR) kann demnach für diese Reaktion ausgeschlossen werden, da hierbei stetig eine hohe Produktkonzentration mit niedriger Substratkonzentration vorliegt.

Als mögliche Reaktortypen kommen das Strömungsrohr (PFR) und der Rührkesselreaktor (STR) in Frage. Während das Strömungsrohr einen Konzentrationsgradienten im Verlauf des Flusses der Reaktanden durch das Strömungsrohr aufweist, ist dieser Gradient im Rührkesselreaktorsystem über die Reaktionszeit vorhanden (vgl. Abschnitt 1.4.5, Abbildung 14). Als geeignetste Reaktorwahl ist im Rahmen dieser Arbeit ein Batch-Modus im Rührkesselreaktor gewählt worden. Hierbei kann die vollständige Umsetzung zum Produkt gewährleistet und somit die Reaktion effizient durchgeführt werden. Neben dem handelsüblichen Rührkesselreaktor wurde darüber hinaus ein rotierender Festbettreaktor gewählt. Hierbei liegt das immobilisierte Enzym im gepackten Festbett im Rührerelement vor. Die Reaktionslösung wird hierbei während das Rühren durch das gepackte Bett mit immobilisiertem Enzym geströmt. Dies soll insbesondere dazu beitragen Limitierungen durch die Diffusion zu verringern.

- Die Charakterisierung des immobilisierten Enzymes aus dem Zellysate zeigte einen angestiegenen K_M Wert für die Umsetzung der Naproxenmalonsäure und eine Inhibierung durch das gebildete Naproxen.
 - Es konnte eine Aktivität von 60 % des immobilisierten Enzymes im Vergleich zum freien Enzym gewonnen werden.
 - Für die Synthese mit immobilisiertem Enzym wurde ein Rührkesselreaktor-Konzept im Batch-Modus ausgewählt.
-

2.7 Biokatalytische (S)-Flurbiprofen Synthese⁵

Flurbiprofen ist neben Naproxen ein weiteres Arylpropionsäurederivat mit NSAR-Wirkung des (S)-Enantiomers. Das (R)-Flurbiprofen wird zudem in der Behandlung von Alzheimer eingesetzt, da es eine inhibierende Wirkung auf die γ -Sekretase besitzt (Beher *et al.* 2004). Dieses Enzym bildet Amyloid-(A β) Peptide, welche für die neurodegenerative Alzheimer-Krankheit verantwortlich sind. Jedoch zeigen neuere Studien, dass die Wirkung des (R)-Flurbiprofens nur sehr gering ist. Dieser Befund wird unter anderem mit der niedrigen Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes aufgrund der geringen Löslichkeit und der daraus resultierenden geringen Konzentration am Wirkungsort begründet (Imbimbo 2009). Das (R/S) Racemat von Flurbiprofen wird erfolgreich in geringen Dosen als Therapeutikum bei Halsschmerzen (z.B. Dobendan® Direkt, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Flurbiprofen 8,75 mg Lutschtabletten) und bei der Behandlung von Bindehautentzündungen in Augentropfen eingesetzt (z.B. OCUFLUR O.K., OmniVision GmbH, Augentropfen).

In der vorliegenden Arbeit wurde die biokatalytische Synthese des (S)-Flurbiprofens mit der (S)-selektiven Enzymvariante AMDase-CLGIPL durchgeführt. Die Synthese erfolgte mit dem aufgereinigten und entsprechend immobilisierten Enzym und mit dem immobilisierten Enzym aus dem Zellysate.

Die Synthese erfolgte im Rahmen einer Machbarkeitsstudie zunächst im 1 mL Maßstab, um die Wiederverwertbarkeit in wiederholten Batch-Experimenten nachzuweisen. Das Immobilisat des aufgereinigten Enzymes konnte erfolgreich 10-fach mit einem Substrattiter von 20 mM und vollem Umsatz eingesetzt werden (Abbildung 47).

⁵ Anteile dieses Kapitels wurden publiziert in Gaßmeyer *et al.* (2016):

Gaßmeyer, S.K., Wetzig, J., Mügge, C., Abmann, M., Enoki, J., Hilterhaus, L., Zuhse, R., Miyamoto, K., Liese, A. & Kourist, R. 2016. Arylmalonate decarboxylase-catalyzed asymmetric synthesis of both enantiomers of optically pure flurbiprofen. *ChemCatChem* **8**, 916–921.

Ergebnisse

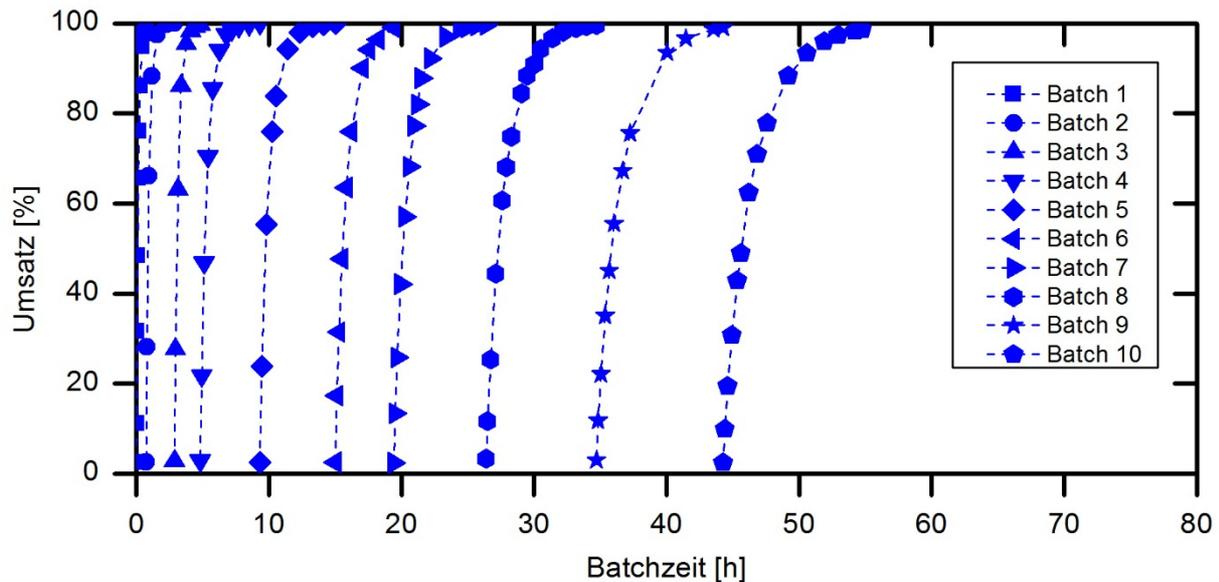


Abbildung 47: Enzymatische Decarboxylierung von Flurbiprofenmalonsäure katalysiert durch kovalent immobilisierte aufgereinigte AMDase-CLGIPL auf Amino C2 Acrylaträger in wiederholten Batch-Versuchen. Reaktionsbedingungen: $V = 1 \text{ mL}$, $U_{\text{Schüttler}} = 1500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8,5$, $c_{\text{Tris-Puffer}} = 10 \text{ mM}$, $c_{\text{FbpMA, Start}} = 20 \text{ mM}$, $T = 30$, $20,3 \text{ g/L}$ Träger mit immobilisiertem Enzym (Beladung: $80,7 \text{ mg}_{\text{Enzym}}/\text{g}_{\text{Träger}}$).

Neben dem Ansatz mittels immobilisiertem aufgereinigtem Enzym wurde die Synthese zudem mit immobilisiertem Enzym aus dem Zelllysate durchgeführt. Hierbei wurde das Enzym Präparat in fünf wiederholten Batch-Experimenten erfolgreich eingesetzt (Abbildung 48).

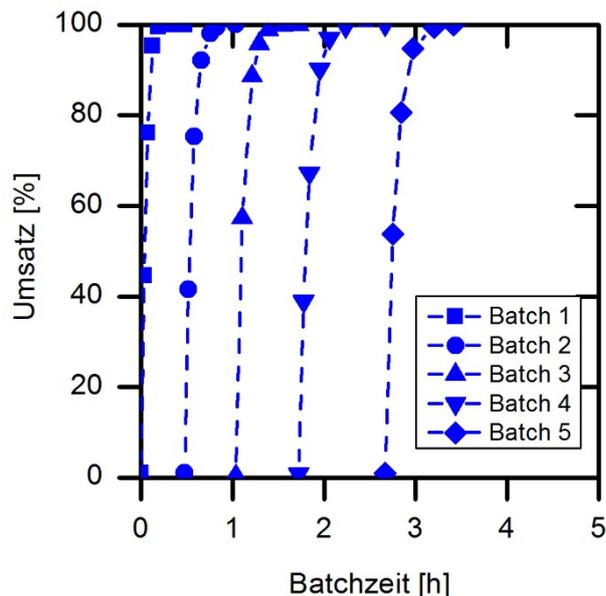


Abbildung 48: Enzymatische Decarboxylierung von Flurbiprofenmalonsäure katalysiert durch kovalent immobilisierte AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysate auf Amino C2 Acrylaträger in wiederholten Batch-Versuchen.

Reaktionsbedingungen:

$V = 1 \text{ mL}$, $U_{\text{Schüttler}} = 1500 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8,5$, $c_{\text{Tris-Puffer}} = 10 \text{ mM}$, $c_{\text{FbpMA, Start}} = 20 \text{ mM}$, $T = 30$, $122,7 \text{ g/L}$ Träger mit immobilisiertem Enzym.

Die Synthese erfolgte ebenfalls im 1 mL Maßstab, jedoch wurde von der Präparation mehr Trägermaterial eingesetzt, da die Aktivität durch die geringeren Mengen des Zielproteins geringer war. Ein Vergleich der zwei Synthese-Strategien zeigt, dass die spezifische Aktivität

des Immobilisates mit aufgereinigtem Enzym ca. dreifach höhere Umsatzraten pro Menge eingesetztes Trägermaterial aufweist, als mit dem eingesetzten immobilisierten Enzym aus dem Zelllysate (Abbildung 49). Ein Vergleich der spezifischen Anfangsaktivitäten zeigte allerdings auch, dass mit dem immobilisierten Zelllysate ein geringerer Aktivitätsverlust mit steigender Anzahl an wiederholten Batch-Reaktionen detektiert werden konnte.

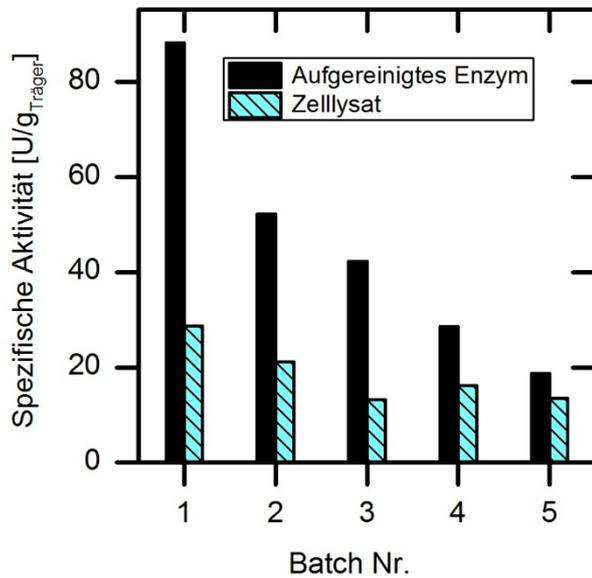


Abbildung 49: Vergleich der spezifischen Aktivitäten des immobilisierten aufgereinigten AMDase-CLGIPG und Immobilisierung aus dem Zelllysate.

2.7.1 Präparative Synthese von (S)-Flurbiprofen

Für einen präparativen Ansatz der Flurbiprofensynthese wurde das immobilisierte Enzym aus dem Zelllysate in einem 20 mL Maßstab eingesetzt und das Produkt nach vollständigem Umsatz mittels Extraktion in die organische Phase überführt. Die organische Phase wurde anschließend mit einem Rotationsverdampfer entfernt.

Ergebnisse

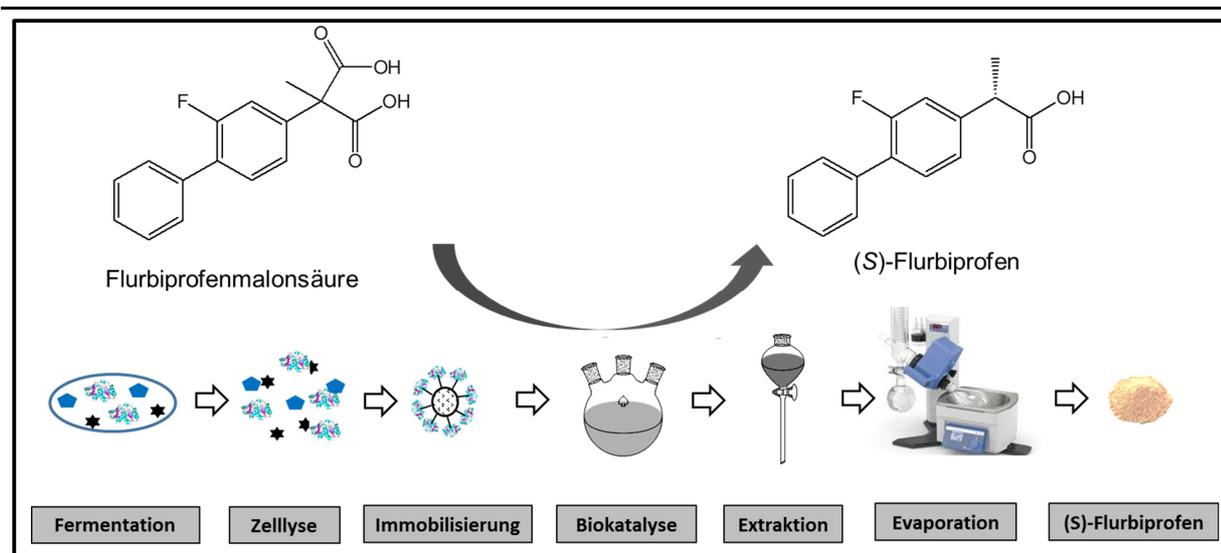


Abbildung 50: Schematische Darstellung der AMDase-CLGIPL katalysierten Synthese von (S)-Flurbiprofen mittels immobilisiertem Enzym.

Die Umsetzung von 152,2 mg Flurbiprofenmalonsäure wurde mit 12,54 g/L Trägermaterial in einem Rührkesselreaktor durchgeführt und der Verlauf analytisch mittels HPLC verfolgt (Abbildung 51). Nach vollständigem Umsatz nach 22 h Reaktionszeit wurde das Produkt in einer dreistufigen Extraktion mit Ethylacetat in die organische Phase überführt. Nach einer dritten Extraktion konnte von dem Zielprodukt in der wässrigen Phase kein verbleibender Rest mehr detektiert werden.

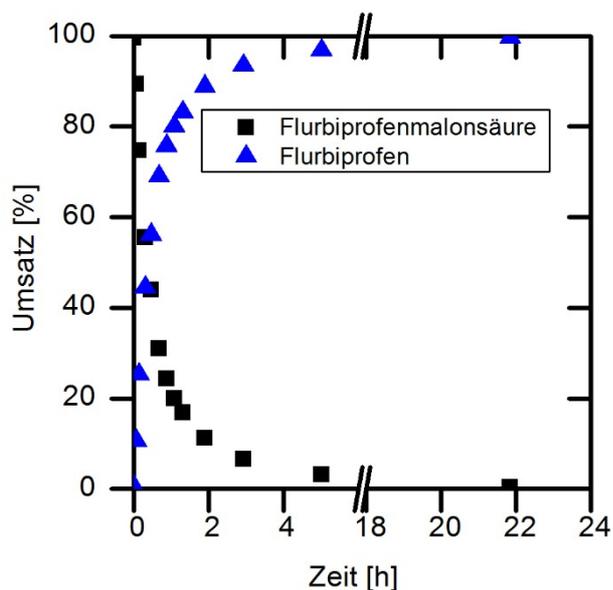


Abbildung 51: Umsetzung von 152,2 mg Flurbiprofenmalonsäure im präparativen Ansatz zur Produktisolierung.

Reaktionsbedingungen:

$V = 20 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 600 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8,5$,

$C_{\text{Tris-Puffer}} = 10 \text{ mM}$, $C_{\text{FbpMA, Start}} = 26,35 \text{ mM}$,

$T = 30$, $12,6 \text{ g/L}$ Träger mit immobilisierter

AMDase-CLGIPL aus dem Zellysat.

Es konnte ein Produkt mit hoher optischer Reinheit von >99 % ee des (S)-Flurbiprofens mit einer isolierten Ausbeute von 99,1 % erzielt werden.

Ein Nachteil der Extraktion stellt jedoch der erhöhte Verbrauch an Lösungsmittel dar. Dies bewirkt einen negativen Einfluss auf die Ökobilanz des Systems. Der Einsatz des Ethylacetats für die Produktaufarbeitung führt in einer Analyse der Ökoeffizienz der enzymatischen Reaktion einen erhöhten Verbrauch an CO₂. Demnach sind alternative Produktaufarbeitungen für die Prozessgestaltung geeigneter.

- Die wiederholte Anwendung des Immobilisates in der (*S*)-Flurbiprofen Synthese konnte erfolgreich demonstriert werden.
 - Bei der Synthese im präparativen Maßstab wurde (*S*)-Flurbiprofen mit einer Ausbeute von 99 % und einer Enantiomerenreinheit von *ee* >99 % des (*S*)-Enantiomers erfolgreich hergestellt.
-

2.8 Präparative (*S*)-Naproxen Synthese mit immobilisiertem Enzym

Die kinetische Charakterisierung der immobilisierten AMDase-CLGIPL an Amino C2 Acrylaträger zeigte einen hohen K_M und einen inhibierenden Effekt durch das gebildete Naproxen. Die enzymatische Aktivität ist insbesondere bei niedrigen Substratkonzentrationen und am Ende der Umsetzung bei hohen Produktkonzentrationen herabgesetzt.

Ein Batch-Konzept für die Synthese stellt sich als die beste Wahl heraus, da in kontinuierlich betriebenen Reaktorsystemen der hohe K_M und/oder der inhibierende Effekt des Naproxen mit einer überproportionalen hohen Menge an eingesetztem Enzym umgangen werden müsste, um vollen Umsatz zu erreichen.

Als Batch-Reaktoren wurde hierbei zum einen ein normaler herkömmlicher Rührkesselreaktor gewählt und zum anderen ein rotierender Festbettreaktor gewählt (engl.: *rotating bed reactor* (RBR), SpinChem®). (Abbildung 52). Dieser spezielle Rührkesselreaktor ist mit einem Einsatz am Rührerelement ausgestattet, in welchem das immobilisierte Enzym von der Reaktionslösung separiert eingesetzt werden kann. Dies kann Diffusionslimitierungen reduzieren, die enzymatische Stabilität auf dem Träger erhöhen und ermöglicht eine einfache Abtrennung und Rezyklierung des Biokatalysators in einer wiederholten Anwendung (Mallin *et al.* 2013).

Ergebnisse

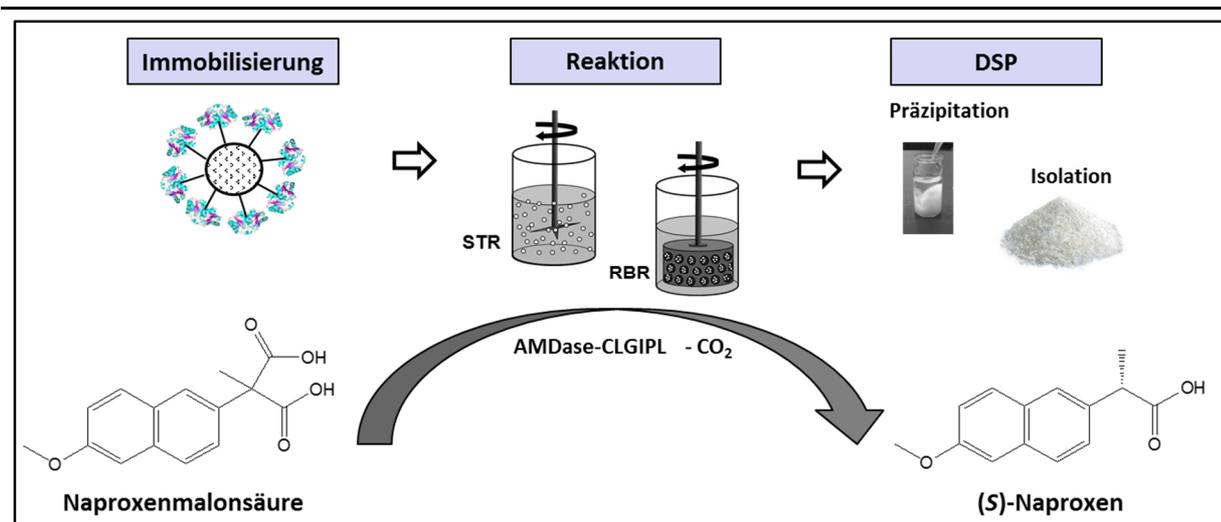


Abbildung 52: Vorgehen der biokatalytischen (S)-Naproxen-Synthese.

Für die Synthese des Naproxens wurde die Reaktion auf 100 mL hochskaliert. In beiden Rührkessel Systemen STR und RBR - wurde für die Vergleichbarkeit die Reaktion unter identischen Bedingungen durchgeführt (Rührergeschwindigkeit, Temperatur, Biokatalysatormenge). In beiden Reaktorsystemen konnte die vollständige Umsetzung von 48.8 mM Naproxenmalonsäure erreicht werden (Abbildung 53). Die Reaktionsverläufe der biokatalytischen Naproxen-Synthese weisen in dem normalen Rührkesselreaktor und dem rotierenden Festbettreaktor ähnliche Reaktionsverläufe auf. In beiden Systemen konnte die vollständige Umsetzung in einer fünffachen Anwendung der immobilisierten Enzympräparation eingesetzt werden.

Ergebnisse

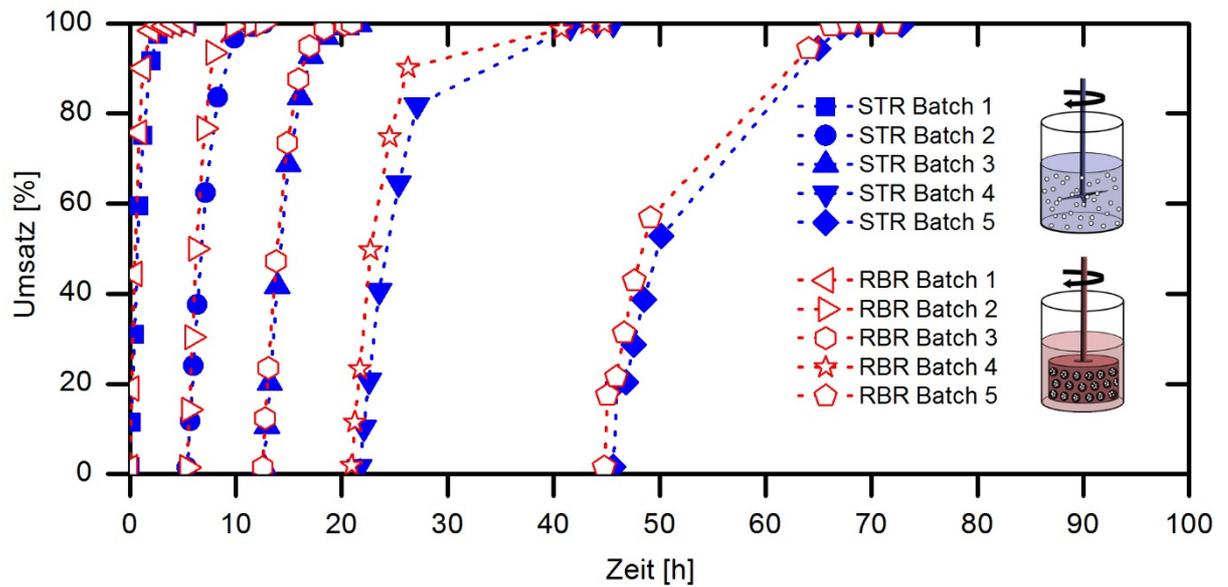


Abbildung 53: Wiederholte Batch-Versuche der Naproxenmalonsäure Umsetzung in den beiden Rührkesselreaktor Konzepten STR und RBR. Reaktionsbedingungen: $V = 100 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 700 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$ (justiert mit 1 M NaOH), $c_{\text{NM, Start}} = 48,6 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $45 \text{ g/L AMDase-CLGIPL an Amino C2 Acrylat}$. Beladung: $8,6 \text{ mg}_{\text{AMDase-CLGIPL}}/\text{g}_{\text{Träger}}$. Zwischen den Experimenten wurde der Träger mit 100 mL Wasser gewaschen und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder sofort wieder eingesetzt.

Die experimentellen Daten der Naproxen Synthese in den beiden Reaktor-Setups liegen nah an der theoretischen Umsetzung, die mit Hilfe des kinetischen Modells berechnet werden kann (Abbildung 54). Die realen Umsätze zu Naproxen in dem klassischen Rührkesselreaktor (STR) und im rotierenden Festbettreaktor (RBR) verlaufen etwas schneller als das vorhergesagte Modell.

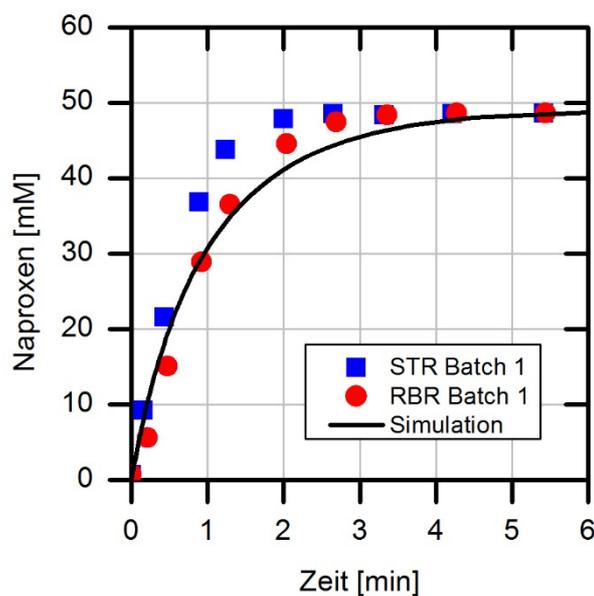


Abbildung 54: Experimentelle Daten der Naproxen Bildung und Simulation des kinetischen Modells. Kinetische Daten: $v_{\text{Max}} = 3,62 \text{ U/mg}$; $K_{\text{M, NM}} = 22,14 \text{ mM}$; $K_{\text{i, Nap}} = 26,34 \text{ mM}$. Reaktionsbedingungen: $V = 100 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 700 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$ (justiert mit 1 M NaOH), $c_{\text{NM, Start}} = 48,6 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $45 \text{ g/L AMDase-CLGIPL an Amino C2 Acrylat}$. Beladung: $8,6 \text{ mg}_{\text{AMDase-CLGIPL}}/\text{g}_{\text{Träger}}$.

Genaueren Analysen der spezifischen Aktivitäten in den beiden Reaktionskonzepten zeigen, dass im rotierenden Festbettreaktor System eine ca. 20 % ($0,5 \text{ U/mg}_{\text{Immo Enzym}}$) geringere Aktivität in der ersten Anwendung des immobilisierten Enzymes gefunden werden kann (Abbildung 55). Die maximalen Aktivitäten in den erneuten Anwendungen zeigen einen etwas geringeren Aktivitätsverlust über die reale Batch-Zeit in dem rotierenden Festbettreaktor System. Die enzymatischen Halbwertszeiten konnten $\tau_{1/2, \text{RBR}}$ 23 h und $\tau_{1/2, \text{STR}}$ 21 h ermittelt werden. Ausgehend von der maximalen Aktivität und der enzymatischen Desaktivierung lässt sich dementsprechend eine TTN von 80,000 für den RBR und 100,000 für den STR ermitteln. Diese Werte für die TTN sind vergleichbar mit repräsentativen Biokatalysatoren zwischen 10^4 bis 10^7 (Rogers & Bommarius 2010). Jedoch gilt hierbei zu bedenken, dass es sich lediglich um eine Annäherung handelt und einfließende Parameter wie die Kinetik vernachlässigt werden.

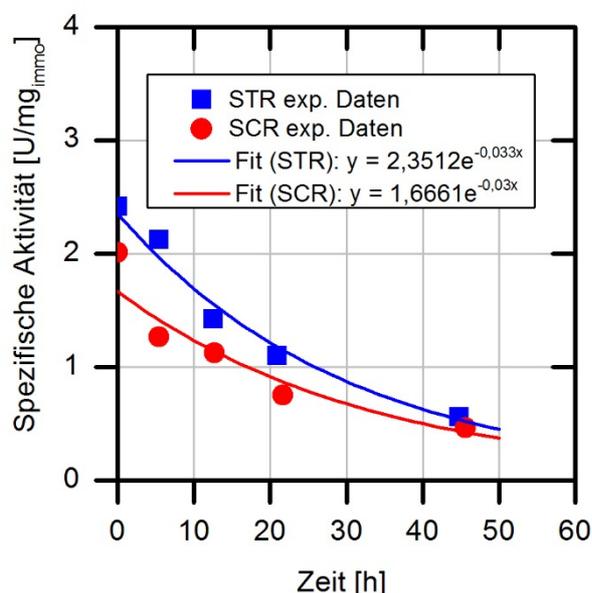


Abbildung 55: Untersuchung der Stabilität der immobilisierten AMDase-CLGIPL in den beiden wiederholten Batch-Versuchen im STR und im RBR. Reaktionsbedingungen: $V = 100 \text{ mL}$, $U_{\text{Rührer}} = 700 \text{ rpm}$, $\text{pH } 8$ (justiert mit 1 M NaOH), $C_{\text{NM, Start}} = 48,6 \text{ mM}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $45 \text{ g/L AMDase-CLGIPL}$ an Amino C2 Acrylat. Beladung: $8,6 \text{ mg}_{\text{AMDase-CLGIPL}}/\text{g}_{\text{Träger}}$. Zwischen den Experimenten wurde der Träger mit 100 mL Wasser gewaschen und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder sofort wieder eingesetzt.

Zusammenfassend ist die erreichbare Produktivität in beiden Reaktorsystemen vergleichbar. Insbesondere bei der Handhabung zur Abtrennung des Biokatalysators für die Wiederverwendung und beim Waschen des Trägermaterials zeigt das System im RBR deutliche apparative Vorteile. Dies spart insbesondere in einem angestrebten Prozess Zeit in der Prozessdurchführung. Allerdings kommt der RBR bei der Maßstabsvergrößerung im Vergleich zum klassischen Rührkessel schnell an seine Grenzen.

Ergebnisse

Tabelle 9: Prozess Parameter der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante berechnet aus den experimentellen Daten in der Naproxen-Synthese in STR und RBR.

Parameter	STR	RBR
$\tau_{1/2}$ [h]	21,0 ± 0,3	23,1 ± 1,5
k_{cat} [h ⁻¹]	3526,8 ± 53,6	2499,2 ± 158,2
k_{des} [h ⁻¹]	0,033 ± 0,0005	0,03 ± 0,002
TTN [-]	106.873 ± 1625	83.306 ± 5273

2.8.1 Produktisolation

Die Isolation des biokatalytisch synthetisierten (*S*)-Naproxens im Downstream-Prozess (DSP) kann auf verschiedene Wege durchgeführt werden wie z.B. durch Extraktion in eine leicht verdampfbare organische Phase oder durch Präzipitation mit Hilfe von Fällungs-Reagenzien. Im Falle der Naproxenisolation ist es aufgrund der geringen Löslichkeit der freien Säure möglich durch eine einfache und kostengünstige Ansäuerung das Produkt zu Fällern. Dies ist möglich, da das Naproxen nach der Biosynthese zunächst als Natrium-Salz vorliegt und diese Form eine sehr viel höhere Löslichkeit im wässrigen Medium besitzt als die protonierte freie Säure (0,07 mg mL⁻¹, protoniert; 266 mg mL⁻¹, Natrium-Salz) (Liu 2000). Für den AMDase katalysierten Prozess wird die freie protonierte Säure der Naproxenmalonsäure zunächst durch 1 M NaOH in die Salz-Form überführt und der pH Wert auf 8 justiert. Die maximale Löslichkeit der Naproxenmalonsäure unter diesen Bedingungen konnte zu 201,9 ± 8,7 mM bestimmt werden. Das entspricht einer Substratkonzentration von 55 g/L und einer maximal erreichbaren Produktkonzentration von 46,5 g/L.

Die Effizienz der Fällung hängt von der zugeführten Säurestärke ab. Zur Analyse wurde eine 100 mM Naproxen Produktlösung mit verschiedenen Säurestärken versetzt und der Überstand auf verbleibendes Naproxen untersucht (Abbildung 56).

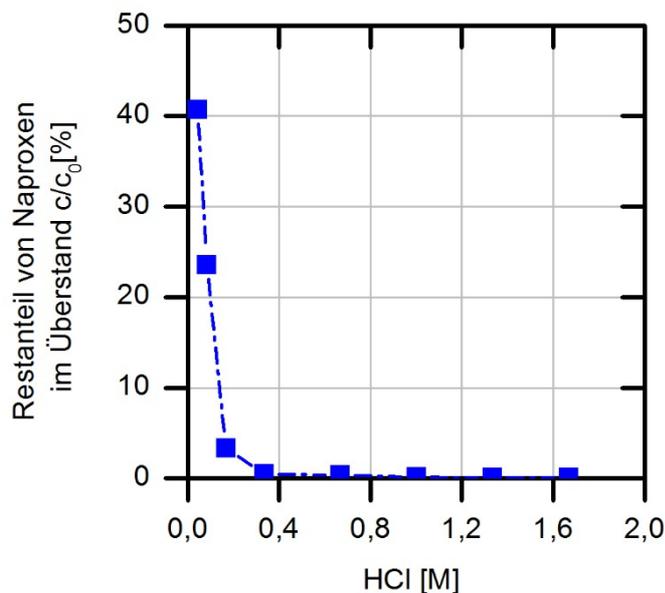


Abbildung 56: Analyse der Fällungseffizienz durch Ansäuerung der Produktlösung nach erfolgter Biotransformation zur Isolation von Naproxen. Eine 100 mM Produktlösung (pH 9) wurde mit verschiedenen Säurestärken versetzt, das ausgefallene Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf verbleibendes Naproxen mittels HPLC untersucht.

Die Effizienz der Fällung steigt im Bereich von $c_{\text{HCl}} < 0,5$ M deutlich mit Erhöhung der Säurestärke der Salzsäure. Oberhalb einer Stärke von 0,5 M HCl ist über 99,5 % des Naproxen im Präzipitat lokalisiert. Für die weitere Produktaufarbeitung wurde eine Säurekonzentration von 1 M HCl für die Fällung des Produktes gewählt.

Das gefällte Naproxen wurde mit Hilfe eines Filterpapiers von der restlichen Lösung separiert und bei 40 °C für 8 h in einem Vakuumofen getrocknet. Die Menge an Naproxen konnte zu 10,3 g bestimmt werden, dies entspricht einer isolierten Ausbeute von 92 % (entsprechend zu 11,2 g maximaler Naproxen Ausbeute). Das Naproxen wurde dann anschließend mittels chiraler GC und ¹H NMR Spektroskopie weiter analysiert.

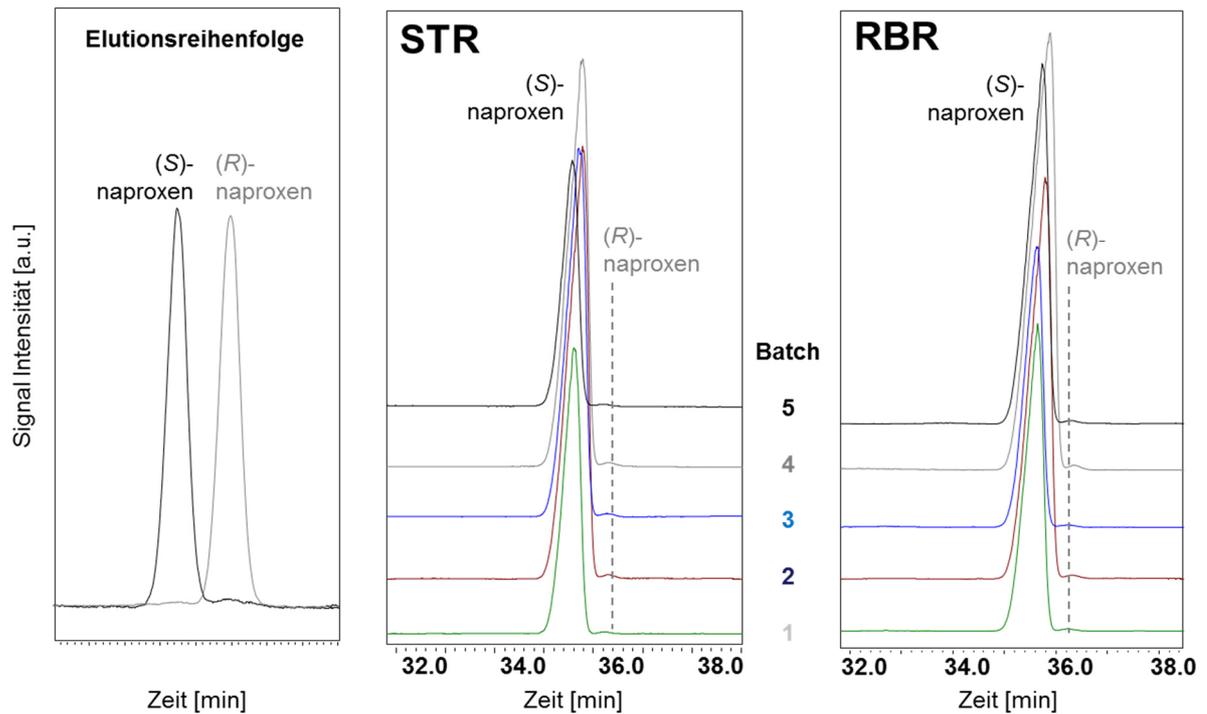


Abbildung 57: Chirale GC Analyse des synthetisierten Naproxen in STR und RBR. Die Messung erfolgte mit einer chiralen Säule (FS Hydrodex- β -6TBDM, Macherey-Nagel) mit einer isothermen Methode mit 160 °C mit einen Injektionssplit von 1/20. Die Elutionsreihenfolge ist: (S)-Naproxen (35.7 min) und (R)-Naproxen (36.3 min).

Die Enantiomerenreinheit des Produktes konnte zu 99 % ee des gewünschten (S)-Naproxens bestimmt werden. Zwischen den Ergebnissen der ermittelten Enantiomerenreinheit des Naproxens aus dem STR und dem RBR gibt es keine signifikanten Unterschiede. Das Produkt wurde zur weiteren Analyse der Reinheit mittels ^1H NMR analysiert. Die ^1H NMR Analyse zeigte eine hohe Reinheit des isolierten Produktes (Anhang Abbildung 72).

Für die biokatalytische (S)-Naproxen Synthese konnte für die Produktivität der gesamten Batch-Versuche mit der gleichen Enzympräparation ein Wert von $140 \text{ kg}_{(\text{S})\text{-Naproxen}}/\text{kg}_{\text{AMDase-CLGIPL}}$ erreicht werden. Dieses übersteigt die Minimalanforderung für pharmazeutische Produkte mit $50\text{--}100 \text{ kg}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{Enzym}}$ (Tufvesson *et al.* 2011).

Ein wichtiger Faktor, welcher die Umweltfreundlichkeit von Prozessen in Bezug auf die Abfallerzeugung pro Produkteinheit wiedergibt, ist der E-Faktor. Dieser wird in $\text{kg}_{\text{Abfall}}/\text{kg}_{\text{Produkt}}$ wiedergegeben. Bei der biokatalytischen Naproxensynthese konnte mit einem Substrattiter von 48,6 mM Naproxenmalonsäure im wässrigen System mit Naproxen als Produkt und CO_2 als Abfallnebenprodukt ein Wert von $89 \text{ kg}_{\text{Abfall}}/\text{kg}_{(\text{S})\text{-Naproxen}}$ ermittelt werden. Für pharmazeutische Prozesse sollte der E-Faktor in einem Bereich zwischen 25 und $100 \text{ kg}_{\text{Abfall}}/\text{kg}_{\text{Produkt}}$ (Sheldon 2007) liegen.

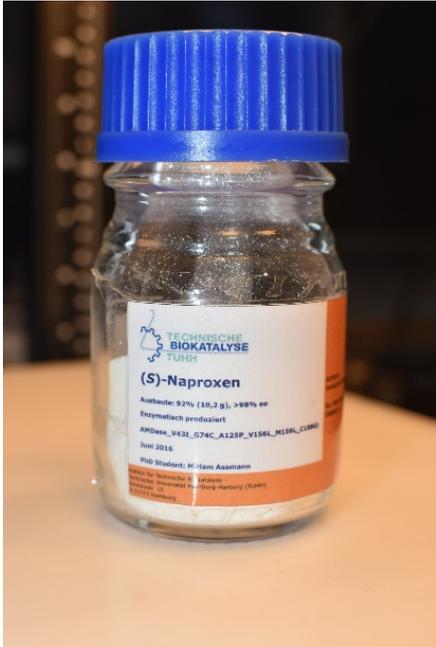


Abbildung 58: Präparativ hergestelltes (S)-Naproxen.

Spezifikationen:

Menge (S)-Naproxen: 10,3 g

Isolierte Ausbeute: 92 %

Enantiomerenreinheit: 99 % ee

-
- Die Synthese von (S)-Naproxen mit immobilisierter AMDase-CLGIPL-Mutante aus dem Zellysate konnte erfolgreich demonstriert werden.
 - Nach säureinduzierter Produktfällung und Trocknung konnte eine isolierte Ausbeute von 92 % mit einem ee von 99 % des (S)-Enantiomers erreicht werden.
-

3 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein biotechnologischer Prozess für die Synthese von Arylpropionsäuren mittels AMDase katalysierter enantioselektiver Decarboxylierung entwickelt. In dem folgenden Kapitel sollen die im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhaltenen Ergebnisse detaillierter diskutiert werden.

3.1 Rahmenbedingungen des biotechnologischen Prozesses

Die Untersuchung der Reaktionsbedingungen erfolgte mit dem Wildtyp der AMDase und der Umsetzung von Phenylmalonsäure als Modells substrat. Die Ergebnisse des Temperatur- und pH-Screenings für den Wildtypen sind in Tabelle 10 zusammengefasst und Literaturwerten gegenübergestellt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Temperatur und pH-Wert Untersuchungen bezogen auf die Aktivität mit vergleichenden Literaturdaten.

Quelle	T-Optimum	T-Bereich	pH Optimum	pH Bereich
Diese Arbeit	40 °C	30–45 °C	7	6–9
(Miyamoto & Ohta 1992b)	45 °C	45–55 °C	8,5	6–9
(Matoishi <i>et al.</i> 2004)	--	--	8	5–9,5

Die Werte für den experimentell bestimmten pH-Bereich von 6–9 stimmen gut mit den gefundenen Literaturdaten überein. Der Temperaturbereich mit der höchsten Aktivität liegt unter den gegebenen Versuchsbedingungen in einem geringeren Bereich, im Vergleich zu den in der Literatur gefundenen Werten. Neben der Aktivitätsanalyse des Enzyms, war während der experimentellen Untersuchungen bei höheren Temperaturen zusätzlich eine temperaturinduzierte Desaktivierung zu erkennen.

Die Hitze-Desaktivierung konnte bereits von Miyamoto & Ohta während der Charakterisierung der AMDase beobachtet werden (Miyamoto & Ohta 1992b). Die Untersuchungen zeigten mit einer Inkubationszeit von 10 min bei 50 °C einen Aktivitätsverlust von über 50 %, welcher mit einer Temperatur von 40 °C auf 10 % Aktivitätsverlust reduziert werden konnte. Dies zeigt nochmals deutlich wie sensitiv dieses Enzym gegenüber höheren Temperaturen reagiert und eine Entfaltung bereits bei niedrigen Temperaturen (30–40 °C) stattfindet.

3.2 Kinetische Charakterisierung der freien AMDase

Die Wildtyp AMDase wurde bereits in vergangenen Studien kinetisch untersucht, wobei die Umsetzung einer Vielzahl von Substraten analysiert wurde. Diese Charakterisierungen erfolgten insbesondere um zu untersuchen, welche Möglichkeiten die neu entdeckte Decarboxylase bietet und wie groß das Substratspektrum ist. In Tabelle 11 sind die experimentellen Daten dieser Arbeit von der Umsetzung von Phenylmalonsäure mittels des Wildtyp-Enzyms Literaturdaten gegenübergestellt.

Tabelle 11: Kinetische Parameter der Wildtyp-AMDase in der Umsetzung von Phenylmalonsäure.

Quelle	v_{\max} [U/mg]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M
Diese Arbeit ^a	281,7 ± 17,5	2,15 ± 0,67	117,4 ± 7,3	54,6
(Miyachi <i>et al.</i> 2011) ^b	n.a.	5,1	260	50
(Okrasa <i>et al.</i> 2008)	n.a.	10,7	316	29,6
(Miyamoto & Ohta 1992b) ^c	882,7	13,9	353	25,4
(Terao <i>et al.</i> 2007) ^c	467	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. nicht angegeben

^a50 mM Tris-Puffer, pH 7, 30 °C.

^b5–10 mM MOPS, pH 7,2, 30 °C

^c100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 37 °C.

Die Affinität der Wildtyp-AMDase ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen gegenüber dem Substrat Phenylmalonsäure 40 % geringer im Vergleich zu den Literaturdaten (Terao *et al.* 2007). Die *Turnover Number* k_{cat} weist etwas geringere Werte auf (ca. 50 %), wohingegen die experimentell bestimmten Werte der katalytische Effizienz vergleichbar mit gefundenen Literaturdaten ist.

Das Wildtyp-Enzym wurde ebenfalls auf die Umsetzung von Naproxenmalonsäure, eines von zwei Zielsubstraten, untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 12 zusammen mit gefundenen Literaturdaten dargestellt.

Tabelle 12: Kinetische Parameter der Wildtyp-AMDase für die Umsetzung von Naproxenmalonsäure.

Quelle	v_{\max} [U/mg]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M
Diese Arbeit ^a	28,85 ± 2,06	0,32 ± 0,15	12,0	37,6
(Gaßmeyer 2015) ^a	90	n.a.	n.a.	n.a.
(Yoshida <i>et al.</i> 2015b) ^b	88	n.a.	n.a.	n.a.
(Terao <i>et al.</i> 2006a) ^{*,b}	n.a.	0,43	30,9	71,8

n.a. nicht angegeben

* Substrat: α -Methyl- α (β -naphtyl) Malonsäure (keine 6-Methoxy Funktionalität am Naphtylrest)

^a50 mM Tris-Puffer, pH 7, 30 °C.

^b100 mM Tris-HCl, pH 7, 37 °C.

Für Naproxenmalonsäure als Substrat der Wildtyp-AMDase sind in der Literatur deutlich weniger kinetische Daten veröffentlicht als für die Phenylmalonsäure. Dies ist mit der kommerziellen Verfügbarkeit der Phenylmalonsäure erklärbar. Die Naproxenmalonsäure ist bisher nicht käuflich erwerbbar, sodass entweder das Substrat selbst synthetisiert, wie bei (Terao *et al.* 2003) beschrieben, oder die Synthese in Auftrag gegeben werden muss.

(Terao *et al.* 2006a) haben in ihren Untersuchungen einen K_M -Wert erhalten, welcher in der gleichen Größenordnung des Wertes liegt, der im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde. Die Werte für die katalytische Aktivität sind jedoch um das 2,6-fache höher als die experimentellen Daten dieser Arbeit. Der gleiche Trend ist in den Veröffentlichungen von (Gaßmeyer 2015) und (Yoshida *et al.* 2015b) zu finden. Diese zeigen ebenfalls 3-mal höhere Aktivitäten für die Wildtyp-AMDase bei der Umsetzung von Naproxenmalonsäure.

Der verhältnismäßig große Unterschied zwischen den experimentellen und den Literaturdaten kann diverse Gründe haben. Die Versuche wurden zum Teil unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, sowie mit einem unterschiedlichen Vorgehen während der Reaktionen durchgeführt, was Gründe für die Abweichungen darstellen kann. Die kinetischen Daten von (Yoshida *et al.* 2015b) wurden mit einer Temperatur von 37 °C, 100 mM Tris-HCl Puffer und einem pH von 7 erhalten. Diese Bedingungen unterscheiden sich von den in dieser Arbeit gewählten von 30 °C, 50 mM Tris-Puffer und pH 7.

Die kinetische Charakterisierung der neuen (S)-selektiven AMDase-CLGIPL-Mutante erfolgte für das Modellsubstrat Phenylmalonsäure und für Naproxenmalonsäure (Tabelle 13, Tabelle 14).

Tabelle 13: Kinetische Parameter der AMDase-CLGIPL-Mutante in der Umsetzung von Phenylmalonsäure.

Quelle	v_{\max} [U/mg]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M
Diese Arbeit	$29,98 \pm 1,5$	$1,91 \pm 0,29$	$12,5 \pm 0,6$	6,5

Tabelle 14: Kinetische Parameter der AMDase-CLGIPL-Mutante in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure.

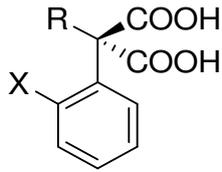
Quelle	v_{\max} [U/mg]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M
Diese Arbeit	$6,04 \pm 0,21$	$0,075 \pm 0,027$	$2,5 \pm 0,09$	33,6
(Yoshida <i>et al.</i> 2015b)	7,1	1,1	3,8	3,5
(Gaßmeyer 2015)	5,7	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. nicht angegeben

Für die Kinetik der neu generierten (S)-selektiven AMDase-Mutante (Gaßmeyer 2015; Yoshida *et al.* 2015b) sind keine Literaturdaten in Bezug auf Phenylmalonsäure als Modellsubstrat bekannt. Das Protein-Engineering wurde mit Naproxenmalonsäure als Screeningsubstrat durchgeführt, folglich sollte die Affinität bei der Umsetzung hoch sein. Die Werte für die

Michaelis-Menten-Konstante (K_M) sind um ein 25-faches geringer, als für die Phenylmalonsäure. Somit ist die Affinität der Naproxenmalonsäure als Substrat höher als die der Phenylmalonsäure. Die in der Literatur zu findenden Werte für die maximalen Umsetzungsraten, liegen in einer vergleichbaren Größenordnung. Der K_M -Wert von Naproxenmalonsäure als Substrat wurde in dieser Arbeit 15-fach niedriger ermittelt, als in der Arbeit von Yoshida beschrieben wurde (Yoshida *et al.* 2015b). Wie bereits oben beschrieben wurden die experimentellen Daten unter leicht unterschiedlichen Bedingungen generiert als das experimentelle Vorgehen dieser Arbeit, wodurch die Daten nicht exakt miteinander vergleichbar sind.

Neben der Michaelis-Menten Substratsättigungskinetik wurde die AMDase-CLGIPL-Mutante auf eine mögliche kompetitive Produktinhibierung und die Inhibierung durch einen Überschuss des Substrates in der Naproxenmalonsäure Umsetzung untersucht. Die enzymatische Reaktion ist nur schwach durch einen Überschuss an Naproxenmalonsäure inhibiert, wobei die Hälfte der maximalen Aktivität erst bei einer Konzentration von 358,2 mM Naproxenmalonsäure erreicht wäre. Dieser Wert ist jedoch nicht zugänglich, da Naproxenmalonsäure bei einem pH Wert von 8 maximal zu 200 mM als Natriumsalz gelöst werden konnte. Ebenfalls wurde eine geringe kompetitive Produktinhibierung festgestellt. Beide Inhibierungen (Substratüberschuss, kompetitive Produktinhibierung) sind für das freie Enzym gering, wodurch ein Substratfeed oder eine *in situ* Produktabtrennung nicht erforderlich waren. Ein Vergleich der Kinetik des Wildtyp-Enzymes und der AMDase-CLGIPL-Mutante zeigt, dass die Aktivität der Mutante für die Umsetzung von Phenylmalonsäure 10-fach geringer als die Aktivität des Wildtyps bei vergleichbarem K_M -Wert ist (2,2 mM wtAMDase und 1,9 mM AMDase-CLGIPL). In der Umsetzung von Naproxenmalonsäure ist die Aktivität der Mutante 5-fach geringer gegenüber dem Wildtyp bei gleichzeitiger 4-fachen Verringerung des K_M -Wertes. Dieses Ergebnis zeigt, dass die AMDase-Mutante erfolgreich bezüglich der Naproxenmalonsäure Umsetzung für die (S)-selektive Naproxen Synthese optimiert wurde. Im Fokus dieser Arbeit wurde die AMDase insbesondere in Hinblick auf die Umsetzung von Naproxenmalonsäure untersucht. Das Enzym hat darüber hinaus ein breiteres Substratspektrum und kann eine Vielzahl von anderen Substraten umsetzen, welche interessante chirale Synthesebausteine darstellen können. Die AMDase wurde bereits auf Substratumsetzungen mit verschiedenen Substituenten am α -Kohlenstoffatom und am Aromaten untersucht (Miyamoto *et al.* 1992; Miyamoto *et al.* 1994; Miyamoto & Ohta 1992b). Die kinetische Analyse zeigte, dass die Aktivität signifikant von der Struktur der Substrate abhängt. Die katalytische Aktivität steigt mit dem steigenden elektronenziehenden Charakter der Substituenten am Aromaten. Des Weiteren sind die Umsetzungen von α -Arylmalonsäuren gegenüber α -Aryl- α -methylmalonsäuren bevorzugt (Abbildung 59, (Miyamoto & Ohta 1992b)).



R: H, CH₃

X: -F, -Cl, -CF₃, -CH₃, -OCH₃

R: H > CH₃

X: meta > para > ortho

Keine Reaktion: ohne Aromaten, ohne direkter Verbindung der Malonsäure zum Aromaten, Veresterte Carbonsäure

Abbildung 59: Reaktivität der Wildtyp-AMDase

Für die enzymatische Reaktion ist eine syn-periplanare Anordnung zwischen den Substituenten am chiralen Zentrum und am aromatischen Ring erforderlich. Wenn der energetische Zustand dieser Anordnung zu hoch ist und das Substrat in einer anderen Konformation vorliegt findet keine Reaktion statt. Die genaue Positionierung des Substrates in der aktiven Bindestelle ist essentiell, damit die Reaktion stattfinden kann (Miyamoto *et al.* 1994).

Bereits der Austausch einzelner Aminosäuren kann die enzymatische Aktivität drastisch verändern. Sarah Gaßmeyer zeigte in ihren Studien im Rahmen ihrer Promotionsarbeit, dass sich die Präferenz welches Substrat von dem Enzym bevorzugt umgesetzt wird, bei einem Austausch von Aminosäuren umkehren kann (Gaßmeyer 2015). Die Wildtyp-AMDase, welche bevorzugt Naproxenmalonsäure umsetzt, änderte nach einem Austausch von vier Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums (V43I, A125P, V156L und M159L) die Umsetzungspräferenz von Naproxenmalonsäure zu Flurbiprofenmalonsäure. Das zeigt das Proteinengineering einen direkten Einfluss auf die Substratspezifität hat (Miyamoto & Kourist 2016) und für jede Zielreaktion einzeln betrachtet und optimiert werden muss.

Neben der Synthese von Profenen gibt es eine Vielzahl anderer interessanter Verbindungen, welche durch die enzymatische Synthese der AMDase zugänglich sind. Die Herstellung von Mandelsäure mit Hydroxy-Funktionen am α -Kohlenstoffatom und Phenylglycin, welches eine Aminfunktionalität aufweist wurden mit der Wildtyp-AMDase bereits näher untersucht (Tamura *et al.* 2009). Das *D*-Enantiomer von Phenylglycin ist ein Bestandteil von Seitenketten in mehreren semisynthetischen Antibiotika wie beispielsweise Ampicillin. In dieser Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass die Reaktion je nach Substrat stark vom pH-Wert abhängt. Bei einer Hydroxylgruppe am α -Kohlenstoffatom kann ein relativ breites pH-Profil beobachtet werden (pH 5–9), während bei der Reaktion mit einem amino-funktionalisierten α -Kohlenstoffatom die Aktivität strikt vom pH Wert abhängt und nur in einem kleinen Bereich hohe Aktivitäten detektiert werden können und die pH-abhängige Aktivität ein scharfes Maximum aufweist (pH 9–11) (Tamura *et al.* 2009). Die optimalen Parameter sollten demnach separat für jedes

Enzymreaktionssystem betrachtet werden, um eine möglichst effiziente Synthese zu ermöglichen.

Die AMDase besitzt großes Potential für die Synthese verschiedenster enantiomerenreiner Synthesebausteine, welche für die Produktion von Pharmaka und Feinchemikalien genutzt werden können. Durch gezieltes Enzym-Engineering kann das Substratspektrum erweitert und somit neue Syntheserouten zugänglich gemacht werden. Bereits der Austausch von einzelnen Aminosäuren kann die Selektivität für ausgewählte Substrate drastisch ändern und ermöglicht so den Zugang von einer Vielzahl verschiedener Zielprodukte (Lewin *et al.* 2015).

3.3 Stabilitätsanalyse des freien Enzymes

Das lösliche freie Enzym wurde auf die Stabilität in der Umsetzung von Phenylmalonsäure mit dem Wildtyp-Enzym und Naproxenmalonsäure mit der AMDase-CLGIPL-Mutante untersucht. Die Analyse der Stabilität des freien Enzymes zeigte eine Halbwertszeit von 1,2 h bei einer Temperatur von 30 °C sowohl für die Wildtyp-AMDase in Bezug auf die Phenylmalonsäure Umsetzung als auch für die AMDase-CLGIPL-Mutante in der Naproxenmalonsäure Umsetzung. Dieser Analyse zur Folge hat der Austausch der Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums keinen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Stabilität. Die Stabilität des freien Wildtyp-Enzymes zeigt mit 1,2 h eine höhere Halbwertszeit als in der Literatur mit 32 min zu finden ist (Miyazaki *et al.* 1997). Nichtsdestotrotz sinkt die Aktivität schnell ab, sodass das Reaktionssystem weitere Optimierungen benötigt, um einen effizienten biokatalytischen Prozess etablieren zu können. In einer Forschungsarbeit von Miyamoto und Co-Arbeitern wurde eine AMDase aus dem Bodenorganismus *Archromobacter* sp. KU1311 auf die verbleibende Aktivität nach einer 30-minütigen Inkubation mit 30, 40, 45, 50 und 60 °C untersucht. Hierbei konnte für 30 °C eine verbleibende Aktivität von 90 % gezeigt werden. Bei höheren Temperaturen sinkt die Aktivität stark ab (40 °C: 80 %; 45 °C: 60 %; 50 °C: 35 % und 60 °C: 0 %) (Miyamoto *et al.* 2007). Dies zeigt nochmals deutlich, wie temperaturempfindlich die AMDase ist und demonstriert die Notwendigkeit weiterer Optimierungen für eine effiziente Bioprozessanwendung dieses Enzyms. Mit einem Absenken der Temperatur auf 22 °C konnte im Rahmen dieser Arbeit die Stabilität der AMDase-CLGIPL-Mutante von $\tau_{1/2} = 1,2$ h für eine Reaktionsführung mit 30 °C auf $\tau_{1/2} = 5,8$ h erhöht werden, jedoch sinkt die katalytische Aktivität hierbei mit über 60 %, stark ab.

Neben dem Einfluss der Temperatur wurde zudem die Stabilität des freien Enzymes mit einem Additiv analysiert. Mit dem Zusatz von 10 % (v/v) von Polyethylenglycol (PEG₆₀₀) konnte eine Steigerung der Stabilität von $\tau_{1/2} = 1,2$ h auf $\tau_{1/2} = 5,4$ h des freien Enzyms erreicht werden. Diese Steigerung kann damit begründet werden, dass sich die Oberflächenbeschaffenheit durch die Modifikation verändert wird und die Stabilität hierdurch gesteigert werden kann. Die

Oberflächen-Ladungs-Verteilung stellt eine wichtige Rolle für die thermale Stabilität dar. Thermostabile Enzyme haben z.B. häufig einen höheren aliphatischen Index als mesotherme Enzymvarianten. Der Index ist durch das relative Volumen an den aliphatischen Aminosäuren (Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin) definiert. Demnach besitzen stabilere Enzyme einen hohen Anteil nicht polarer Reste, wohingegen Enzyme mit vielen wasserstoffbrückenbildenden Resten (Serin, Threonin) oder Metalloproteine eine geringere Stabilität aufweisen (Ikai 1980). In der Forschungsarbeit von Longo und Combes konnte ebenfalls die Beobachtung gemacht werden, dass durch die Modifikation mit PEG eine Stabilitätssteigerung erreicht werden kann. Im Rahmen der Arbeit wurden zwei verschiedenen Enzyme, eine Lipase und α -Chymotrypsin, auf die Modifikation mit Glycosiden und PEG untersucht. Während die Oberfläche mit Glycosiden an hydrophilen Charakter zunimmt, wird die Oberfläche mit dem Zusatz an PEG hydrophober. Für beide getesteten Enzyme wurden mit Glycosidmodifikationen Stabilitätsverluste detektiert, während die PEG-modifizierten Enzyme eine erhöhte Stabilität aufwiesen (Longo & Combes 1997). Für das freie Enzym konnte demnach durch die Oberflächen Modifikation eine leichte Stabilitätssteigerung erreicht werden.

3.4 Immobilisierung der AMDase

Das freie Enzym AMDase ist im löslichen Zustand ein relativ instabiles Enzym ($\tau_{1/2} = 1,2$ h), welches erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit immobilisiert und in Folge dessen, signifikant stabilisiert werden konnte.

Aktivität und Stabilität des immobilisierten Enzymes hängen von den Eigenschaften der Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial ab und den Bedingungen unter welchen gearbeitet wird, wie:

- Anbindungsposition und Anzahl von Anbindungen
- Konformationsfreiheit in der Matrix und Porengröße des Trägers
- Mikroumfeld, in welchem Enzym lokalisiert ist
- Chemische und physikalische Struktur des Trägers
- Spacer-Eigenschaften (z.B. Ladung, Länge, Größe)
- Immobilisierungsbedingungen (z.B. Dauer, pH, Temperatur etc.)
- Reaktionsbedingungen und Art der Separierung

Dies ist eine Vielzahl von beeinflussenden Parametern und es ist somit schwierig vorherzusagen, welcher Träger für das gewählte Enzym bzw. die Zielreaktion am geeignetsten ist. Die AMDase wurde bereits zuvor von Wong und Co-Arbeitern an Polystyrol-Nanopartikeln immobilisiert und eine 4-fache Rezyklisierung demonstriert (Wong *et al.* 2010). Innerhalb dieser Arbeit konnte das Enzym erfolgreich im Rahmen eines Screenings zur Realisierbarkeit, an

sieben verschiedenen Trägern angebunden werden, welche sich u.a. in Art der Anbindung, Porenweite, Spacer und Größe unterschieden.

Dabei zeigte die Aktivität des immobilisierten Enzyms im zweiten Batch eine höhere Aktivität als es in einer ersten Anwendung ermittelt werden konnte. Hierbei kommen mehrere Faktoren zusammen, durch welche diese Aktivitätssteigerung im zweiten Batch begründet werden kann. Zum Einem wird der trockene Träger in der ersten Anwendung durch die Reaktionslösung äquillibriert, wodurch die immobilisierten Enzyme, insbesondere innerhalb der Poren, in einen flexibleren Zustand aufgrund der zurückgehaltenen Flüssigkeit überführt werden. Des Weiteren konnte in einer Untersuchung der Adsorption der Substrate an/im Trägermaterial festgestellt werden, dass ein kleiner Prozentsatz des Substrates/Produktes am Trägermaterial zurückgehalten wird. Demzufolge befindet sich in der Folgereaktion bereits Substrat bzw. Produkt beim Reaktionsstart in der Reaktionslösung, welches am Träger nach dem ersten Batch verblieben ist.

Zunächst fiel die Wahl des Trägers in dieser Arbeit auf die komplexierte Anbindung an poröse Glaspartikel, da hier vielversprechende Ergebnisse, insbesondere hohe Aktivitäten, erhalten wurden. Die Immobilisierung mit dem Zellysat zeigte jedoch hohe Aktivitätseinbußen verglichen mit der Immobilisierung des aufgereinigten Enzyms. Dieses Resultat war unerwartet, da die Immobilisierung über den His₆-Tag der AMDase erfolgt und demnach alle Anbindepositionen des Trägers mit dem Zielenzym besetzt werden könnten. Demzufolge muss es einen anderen Grund geben, der zur erheblichen Verringerung der enzymatischen Aktivität geführt hat. Optimierungsversuche, insbesondere im Immobilisierungsverfahren, zeigten die Notwendigkeit aller Parameter, wie bspw. die Immobilisierungsdauer. Durch Verkürzung der Immobilisierungszeit und dem Hinzufügen von Proteaseinhibitoren konnte Immobilisat mit höheren Aktivitäten gewonnen werden. Demzufolge wurde ein Teil des Zielproteins während der Immobilisierung von zellinternen Proteasen abgebaut. Des Weiteren kann ebenfalls ein Anteil des Zielenzyms während der Immobilisierung deaktiviert worden sein, wodurch vermutlich ebenfalls inaktives Enzym mit angebunden worden ist. Neben den Analysen des Immobilisierungsprozesses zeigten Rezyklierungsstudien, hohe Aktivitätsverluste in der Wiederverwendung. Dies ist mit Enzymverlusten erklärbar, da die komplexe Anbindung schwächer als z.B. die kovalente Anbindung ist. Dieser Träger ist demzufolge für das gewählte System der AMDase katalysierten Arylpropionsäure-Synthese nicht geeignet und die Wahl fiel auf die kovalente Anbindung an Amino C2 Acrylaträger. Dieser besitzt zudem eine große Porenweite (120 nm) und große Partikeldurchmesser (>400 µm), was Diffusionslimitierungen vorbeugen und zu einer leichten Abtrennung des Immobilisates beitragen kann.

Das immobilisierte aufgereinigte Enzym an Amino C2 Acrylat zeigte ebenfalls Aktivitätsverluste in der Wiederverwendung, jedoch weniger stark ausgeprägt als es mit der

komplexen Anbindung beobachtet werden konnte. Mit dem immobilisierten Enzym aus dem Zellysat konnte zudem ein stabileres Präparat mit geringeren Aktivitätsverlusten generiert werden. Unabhängig vom verwendeten Substrat (Naproxenmalonsäure/Flurbiprofenmalonsäure) war mit dem Zellysat in den Rezyklierungen der Verlust an Aktivität geringer.

Die Wiederverwendbarkeit des immobilisierten Enzymes in der optisch reinen Synthese von (*S*)-Flurbiprofen, konnte sowohl für das immobilisierte aufgereinigte Enzym, als auch für das immobilisierte Enzym aus dem Zellysat erfolgreich, mit 10 bzw. 5 Rezyklierungen, gezeigt werden. Allerdings fehlen für das Substrat Flurbiprofenmalonsäure die genauen kinetischen Daten in der Flurbiprofen-Synthese, wie die maximalen Umsatzraten oder eine mögliche Inhibierung durch das Flurbiprofen des freien und des immobilisierten Enzymes. In der Arbeit von Sarah Gaßmeyer ist für die Flurbiprofenmalonsäure-Umsetzung der AMDase-CLGIPL-Mutante eine Aktivität von 55 U/mg zu finden (Gaßmeyer 2015). Da sowohl das (*R*)-als auch das (*S*)-Flurbiprofen interessante Kandidaten für die pharmazeutische Industrie sind, wäre eine weitere Charakterisierung der (*R*)-selektiven Wildtyp-AMDase und der (*S*)-selektiven AMDase-CLGIPL-Mutante in Hinsicht auf die Flurbiprofenmalonsäure-Umsetzung von großem Interesse.

Für die enzymatische Rezyklierung in der Flurbiprofenmalonsäure-Umsetzung konnten die gleichen Stabilisierungstendenzen des Immobilisates mit der Immobilisierung des Enzymes aus dem Zellysat detektiert werden, wie es auch für die Umsetzung der Naproxenmalonsäure ermittelt werden konnte. Hierbei konnte für beide Substrate in einer vierten Reaktion mit dem aufgereinigtem Enzym eine Restaktivität von ~30 % ermittelt werden, während das Immobilisat mit dem Zellysat noch über 50 % Aktivität zeigte.

Ein möglicher Grund dafür ist, dass durch die Immobilisierung aus dem Zellysat ebenfalls andere zellinterne Proteine an dem Träger angebunden werden und sich dadurch die Mikroumgebung des immobilisierten Enzymes verändert. Dies kann sich negativ oder positiv auf die enzymatische Aktivität und Stabilität auswirken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein positiver Effekt auf die Stabilität ermittelt werden. Diese Beobachtung wurde mit der komplexierten Anbindung nicht erhalten, da dort die Immobilisierung mit dem Zellysat einen negativen Effekt auf die verbleibende Aktivität in den Rezyklierungen zeigte.

3.5 Charakterisierung der immobilisierten AMDase

Das Immobilisat wurde für das weitere Vorgehen der Bioprozessentwicklung in Hinsicht auf die Naproxenmalonsäure-Umsetzung charakterisiert und die Kinetik in der Naproxen-Synthese und die Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 15 zusammengefasst und Werten des freien Enzymes vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 15: Vergleiche der kinetische Daten und der Stabilitäten der freien aufgereinigten AMDase-CLGIPL und der immobilisierten AMDase-CLGIPL aus dem Zellysate in der Naproxenmalonsäure-Umsetzung.

Parameter	Freie AMDase-CLGIPL	Immobilisierte AMDase-CLGIPL
v_{\max} [U/mg]	6,04	3,62
k_{cat} [s^{-1}]	2,5	1,5
K_M [mM]	0,08	22,14
$K_{i, \text{Nap}}$ [mM]	2,4	26,34
K_M/K_i [-]	0,03	0,84
$K_{i, \text{NM}}$ [mM]	358,2	--
$\tau_{1/2}$ [h]	1,2	206,4 (>21)*
TTN [-]	25000	353032 (>83000)*

* Experiment im 100 mL Maßstab für die präparative Naproxen Synthese mit 50 mM Naproxenmalonsäure.

Die kinetischen Parameter der immobilisierten AMDase sind gegenüber dem freien Enzym deutlich verschoben. Die maximale Umsatzrate ist 40 % geringer als mit dem freien Enzym und die Affinität ist deutlich herabgesetzt, mit einer Verschiebung des K_M Wertes zu höheren Konzentrationen um das ca. 300-fache. Sowohl das freie, als auch das immobilisierte Enzym, ist durch das gebildete Produkt Naproxen inhibiert. Bei einem Vergleich von K_M über K_i wird deutlich, dass die Inhibierung für die immobilisierte AMDase stärker ausgeprägt ist. Demnach ist die Effektivität des freien Enzymes in Bezug auf die Inhibierung durch Naproxen besser. Zudem kann für das immobilisierte Enzym keine Substratüberschussinhibierung ermittelt werden, während für das freie Enzym eine leichte Inhibierung festgestellt werden konnte. Insbesondere die Produktinhibition führt im fortgeschrittenen Reaktionsverlauf zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Hierbei war mit einem $K_M/K_i = 0,84$ noch eine vollständige Umsetzung zum Produkt möglich (Wert < 1, (Lee & Whitesides 1986); (Liese *et al.* 1996)). Eine Erhöhung der Produktivität wäre hier z.B. durch ein Entfernen des Produktes aus der Reaktionslösung möglich (Freeman *et al.* 1993).

Durch die Immobilisierung verändert sich die enzymatische Mikroumgebung, was eine Veränderung der enzymatischen Parameter verursachen kann. Der Aktivitätsverlust durch die Immobilisierung ist ein Phänomen, welches häufig beobachtet werden kann (Aksoy *et al.* 1998).

Die Verschiebung der enzymatischen Kinetik ist insbesondere durch Stofftransporteffekte und partielle pH-Veränderungen innerhalb der Poren erklärbar und hängt stark von der Partikelgröße, den Porendimensionen und der Enzymdichte ab (Tischer & Kasche 1999).

Die Verschiebung der Michaelis-Menten-Konstante zu höheren Konzentrationen kann durch die Anbindung erklärt werden, wodurch die Reaktion von der Diffusion der einzelnen

Verbindungen zu dem Enzym und in das poröse Material limitiert ist. Das freie Enzym ist in der Reaktionslösung frei beweglich, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass das Substratmolekül und das aktive Zentrum des Enzyms aufeinander treffen deutlich höher ist. Hinzu kommt, dass das poröse Material des Trägers eine Barriere darstellt und das Substrat zunächst eindringen muss, damit eine Reaktion stattfinden kann. Der ausgewählte Träger zählt mit einer durchschnittlichen Porenweite von 120 nm zu dem makroporösen Trägermaterial (> 50 nm Porendurchmesser), was zu einer besseren Zugänglichkeit beitragen kann. Mikroporöse Träger (< 2 nm Porendurchmesser) können Enzyme (2–10 nm im Durchmesser) nicht effektiv im porösen Material anbinden und bei mesoporösen Material kann eine Diffusionslimitierung in den Poren mit Enzymen auftreten (Bayne *et al.* 2013).

Eine Untersuchung auf externe Diffusionslimitierungen bestätigte die Vermutung, dass das System einer Limitierung der Diffusion durch die Barriere zwischen Reaktionsflüssigkeit und dem Enzym an und im Träger unterliegt. Je höher die Flussrate eingestellt ist und durch das gepackte Säulenbett mit immobilisiertem Enzym fließt, desto effizienter kann die Flüssigkeit zum einen in die porösen Träger eindringen und zum anderen die Höhe der Filmgrenzschicht auf der Oberfläche des Trägers reduzieren. Dieses Experiment erfolgte mit dem immobilisierten Enzym aus dem Zellysate, in welchem sich eine Vielzahl verschiedener Proteine aus dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) befindet. Darunter befinden sich auch relativ große Proteine mit einer Größe von ~200 kDa (siehe SDS-PAGE in Abbildung 35), wohingegen die AMDase mit ~25 kDa relativ klein ist. Die großen Proteine können eventuell dazu führen, dass die Poren etwas blockiert werden und hierbei der freie Fluss der Reaktionslösung zusätzlich behindert wird (Garcia-Galan *et al.* 2011). Ein Vergleichsexperiment mit immobilisiertem aufgereinigtem Enzym könnte hierbei eine Antwort liefern. Wenn die Aktivität mit dem immobilisierten aufgereinigtem Enzym eine geringere Diffusionslimitierung aufweist, dann tragen die zusätzlichen großen zellinternen Proteine zu einer Verschlechterung der Diffusionseigenschaften bei. Ein weiteres Experiment, welches ebenfalls eine Antwort liefern könnte, wäre das Zermahlen des Immobilisats in verschiedene Größen zur Freilegung innenliegender Enzyme, mit anschließender Untersuchung auf die Aktivitäten. Wenn das Resultat höhere spezifische Aktivitäten mit kleineren Partikeln zeigt, liegt eine Poren-Diffusionslimitierung vor. Diese wurde beispielsweise im Rahmen einer Studie von Petrenz und Mitarbeitern analysiert, wobei durch das Kleinmahlen des immobilisierten Enzyms eine Aktivitätssteigerung detektiert werden konnte (Petrenz *et al.* 2015).

Eine weitere Analyse könnte erfolgen, indem das Zellysate vor der Immobilisierung von großen Proteinen separiert wird. Dies könne z.B. durch die Größenausschluss-Filtration realisiert werden, wie sie im Rahmen dieser Arbeit zum Entsalzen der aufgereinigten Enzymlösung angewendet wurde (Amicon Ultrafiltrationseinheit mit 10 kDa Membran). Unterschiede in der Aktivität würden auf eine mögliche Blockierung der Poren mit großen Proteinen hindeuten.

Neben der enzymatischen Kinetik und des Diffusionsverhaltens können ebenfalls andere enzymatische Eigenschaften, wie der optimale pH- oder Temperaturbereich durch die Immobilisierung verändert werden. Tabelle 16 fasst Literaturdaten verschiedener trägergebundener Enzyme und die Auswirkungen auf die optimalen Parameter wie pH oder Temperatur zusammen. Zudem sind hier die Einflüsse auf die kinetischen Parameter der jeweiligen Systeme mit angegeben.

Tabelle 16: Beispiel verschiedener immobilisierter Enzyme und der Einfluss auf Temperatur- und pH-Verschiebungen, sowie der Einfluss auf die Stabilität und Kinetik durch die Immobilisierung.

Enzym	Träger	pH _{Opt}	T _{Opt}	Stabilität +/-	Kinetik		Literatur
		Immo (frei)	Immo (frei)		v _{max} +/-	K _M +/-	
Laccase	Methacrylate-Microspheres	5 (4)	50 (40)	+	k.a.	k.a.	(Mazlan & Hanifah 2017)
Nuklease	DEAE Cellulose	6 (5,5)	70 (60)	+	+	+	(Shi <i>et al.</i> 2010)
Trypsin	Mullbinde	9 (7)	60 (40)	+	-	+	(Seabra & Gil 2007)
Starch phosphorylase	Eierschale	7 (7)	45 (35)	+	-	k.a.	(Garg & Kumar 2008)
Lipase	Chitosan	7 (6)	45 (40)	+	-	-	(Pereira <i>et al.</i> 2003)
Laccase	Chitosan	6 (5)	60 (45)	+	-	+	(Asgher <i>et al.</i> 2017)
Lipase	Luffa Schwamm	8 (7,5)	40 (35)	+	-	k.a.	(Zhu <i>et al.</i> 2013)
Tannase	Calcium Alginate Beads	7 (6,5)	45 (30)	+	-	k.a.	(Yao <i>et al.</i> 2014)
Papain	Sepharose	7 (8)	80 (60)	+	-	+	(Homaei <i>et al.</i> 2010)
α-Amylase (TASKA)	ReliZyme	8 (8)	60 (60)	-	-	k.a.	(Kahar <i>et al.</i> 2016)
	Immobeads	8 (8)	60 (60)	-	-	k.a.	
α-Amylase	EP-HE3B-APTES	6 (6)	50 (50) 50 (60)	+	-	+	(Rodriguez <i>et al.</i> 2014)
	EP-APTES	6 (6)		+	+	+	

k.a. keine Angabe
+ Verbesserung
- Verschlechterung

Ursache der Veränderungen der enzymatischen Eigenschaften können durch Konformationsveränderungen des Enzymes aufgrund der Immobilisierung erklärt werden. Die

Enzyme liegen in immobilisierter Form in einer anderen Mikroumgebung vor als es für das freie bewegliche Enzym der Fall ist. In den meisten Fällen ist eine Verschiebung der optimalen Bereiche (Temperatur und pH-Wert) durch die Immobilisierung zu höheren Werten zu finden. Es gibt allerdings auch Beispiele in der Literatur, bei welchen keine Veränderungen detektiert wurden. Beispielsweise in der Forschungsarbeit von Kahar und Coautoren, in welcher eine α -Amylase an ReliZyme Träger immobilisiert wurde. Die optimalen pH- und Temperaturbereiche für das freie, sowie immobilisierte System sind hierbei unverändert geblieben. Diese Forschungsarbeit zeigte zudem einen destabilisierenden Einfluss durch die Immobilisierung (Kahar *et al.* 2016), was seltener in der Literatur zu finden ist. Dies kann daran liegen, dass negative Ergebnisse weniger häufig veröffentlicht werden und eine Immobilisierung nur sinnvoll bei einer signifikanten Verbesserung ist (Stabilität und/ oder Aktivität).

Zur Analyse der thermischen Stabilität und Aktivität wurde das immobilisierte Enzym nochmals bei vier Temperaturen analysiert (15, 25, 30 und 35 °C). Die höchsten katalytischen Aktivitäten konnten mit einer Temperatur von 30 °C erreicht werden. Mit einer Temperaturerniedrigung auf 15 °C war die katalytische Aktivität halbiert gegenüber einer Reaktionsführung bei Temperaturen von 25 oder 30 °C. Für eine effiziente Synthese benötigt die immobilisierte AMDase demnach eine Temperatur von 25–30 °C, oberhalb dessen ist die katalytische Aktivität ebenfalls herabgesetzt. Das Resultat zeigte, dass die Reaktion, mit 30 °C realisiert werden kann. Alle weiteren experimentellen Daten dieser Arbeit wurden mit einer Reaktionsführung von 30 °C generiert. In Tabelle 17 sind die generierten Daten zur Stabilitätsanalyse der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante, den Daten des freien Enzymes für die betrachteten Temperaturen von 25 und 30 °C gegenübergestellt.

Tabelle 17: Stabilitätsvergleich der immobilisierten und freien AMDase-CLGIPL-Mutante bei 25 und 30 °C.

Parameter	Immo Enzym				Freies Enzym			
	K_{cat} [min ⁻¹]	K_{des} [min]	$\tau_{1/2}$ [h]	TTN [-]	k_{cat} [min ⁻¹]	k_{des} [min ⁻¹]	$\tau_{1/2}$ [h]	TTN [-]
25 °C	20,1	5,1*10 ⁻⁵	225,5	390502	138,0	0,005	2,3	27600
30 °C	20,4	5,6*10 ⁻⁵	206,4	363022	246,9	0,01	1,2	24692

*In der Umsetzung einer 25 mM Naproxenmalonsäure-Lösung.

Der Einfluss der Temperatur ist mit dem freien Enzym wesentlich stärker ausgeprägt als es für das immobilisierte Enzym detektiert werden konnte. Für das freie Enzym ist die Aktivität mit 30 °C gegenüber 25 °C, fast verdoppelt, während die Aktivität bei dem immobilisierten Enzym in der gleichen Größenordnung liegt. Für eine industrielle Anwendung, bei welcher Parameter

wie Energiekosten essentiell sind, sollte eine Reaktionsführung mit 25 °C gewählt werden. Hier sind die TTN Werte etwas höher und die katalytische Aktivität bei der Anwendung des immobilisierten Enzymes ist unter einer Reaktionsführung mit 30 °C vergleichbar. Hierbei ist demnach nicht wesentlich mehr Enzym für die Biokatalyse erforderlich.

Die TTN-Bestimmung des Immobilisierten Enzyms erfolgte mit dem aus dem Fit erhaltenen Wert für die enzymatische Aktivität. Dieses Experiment wurde im kleinen Maßstab mit einer 25 mM Naproxenmalonsäure-Lösung ermittelt. Da diese Konzentration nur geringfügig oberhalb der Michaelis-Menten-Konstante (22,14 mM Naproxenmalonsäure) des betrachteten Systems liegt, ist die katalytische Aktivität demzufolge deutlich unterhalb der maximal möglichen erreichbaren katalytischen Aktivität. Die berechneten TTN-Werte sind durch die geringeren Aktivitäten mit 25 mM Naproxenmalonsäure unterschätzt und höhere Werte wären erreichbar.

Die Stabilitätsparameter wurden über eine Annäherung eines exponentiell abfallenden Fits berechnet. Dieser stimmt nicht in allen Fällen perfekt mit den Daten überein. Insbesondere die ersten Anwendungen zeigten eine starke Abweichung zu den restlichen generierten Daten in der Aktivitätsuntersuchung. Diese wurden entsprechend für die Berechnungen der Stabilitätsanalyse mittels des exponentiellen Desaktivierungsfit vernachlässigt.

Der Fakt, dass dieser Fit nicht immer exakt die enzymatische thermische Desaktivierung widerspiegelt wurde bereits in der Literatur beschrieben. Aymard und Abla beschreiben im Rahmen ihrer Veröffentlichung, dass nicht alle enzymatischen Desaktivierungen durch ein einfaches „one step-two stages“ Modell erklärbar sind, welches dem verwendeten Fit zugrunde liegt. Es kommen noch andere beeinflussende Faktoren mit ins Spiel, welche dazu beitragen, dass die Desaktivierung etwas komplexer ist. In dieser Veröffentlichung wird ein drei Parameter biexponentielles Modell vorgestellt, welches zu einer besseren Anpassung der experimentellen Daten zu dem Fit beitragen kann (Aymard & Abla 2000). Dieser biexponentielle Fit ist allerdings für die Berechnung der Stabilitätsparameter etwas komplizierter in der Anwendung und die essentiellen Parameter (Anfangsaktivität, k_{Des}) können dort nicht so simpel abgelesen werden.

3.6 Synthesen im präparativen Maßstab

In dieser Arbeit konnte die Reaktion von einem Mikroreaktionsgefäß-Maßstab (1–2 mL) auf einen Maßstab von 20–100 mL erfolgreich hochskaliert werden. Die Synthese erfolgte jeweils mit der immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante aus dem Zelllysat an den gewählten Träger Amino C2 Acrylat in einem Rührkesselreaktor im Satzbetrieb.

Die Herstellung von (*S*)-Flurbiprofen erfolgte hierbei im Rahmen einer Machbarkeitsstudie für die Demonstration der Möglichkeit der enzymatischen Synthese optisch reiner Profene im

präparativen Maßstab (Gaßmeyer *et al.* 2016). Nach vollständiger Umsetzung im Volumen von 20 mL wurde eine Produktaufarbeitung mittels Extraktion mit Ethylacetat mit anschließender Lösungsmittel-Verdampfung unter Vakuum realisiert, wobei (S)-Flurbiprofen mit einer hohen Reinheit von >99 % ee mit einer isolierten Ausbeute von >99 % erhalten werden konnten.

Die Synthese von (S)-Naproxen wurde in einem 100 mL Maßstab in zwei Rührkesselreaktoren realisiert. Ein konventioneller Rührkesselreaktor mit Propellerrührer und einem rotierenden Festbettreaktor, in welchem das Immobilisat durch einen Gittereinsatz im Rührelement vorliegt. Hierbei konnte ebenfalls Produkt in hoher Enantiomerenreinheit von 99 % ee mit einer hohen isolierten Ausbeute von 92 % (10.3 g) hergestellt werden.

Sowohl mit der Extraktion von (S)-Flurbiprofen, als auch mit der Präzipitation von (S)-Naproxen konnten die Produkte in hoher Reinheit und hohen isolierten Ausbeuten erhalten werden. Für den *Downstream*-Prozess ist es am sinnvollsten die einfachste und kostengünstigste Produktaufarbeitung zu wählen. Die Präzipitation hat hier gegenüber der Extraktion den Vorteil, dass nur wenig oder kein Lösungsmittel verwendet werden muss und eine Abdampfung entfällt, da das Produkt direkt als Feststoff vorliegt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Vor- und Nachteile der Produktisolation mittels Extraktion und Präzipitation.

Präzipitation	Extraktion
<ul style="list-style-type: none"> + simples Verfahren durch einfaches Ausfällen + geringer Zeitaufwand + wenig Chemikalienverbrauch 	<ul style="list-style-type: none"> + hohe Produktausbeute + hohe Produktreinheit
<ul style="list-style-type: none"> – Produktverlust (~8 %) beim Abfiltrieren 	<ul style="list-style-type: none"> – hoher Chemikalienverbrauch (Extraktionsmittel, Trocknungsmittel etc.) – hoher Zeitaufwand

In der präparativen Synthese von Naproxen konnten 10-fach höhere Desaktivierungskonstanten, verglichen mit der Stabilitätsanalyse im 1 mL Maßstab detektiert werden (k_{Des} 0,003 h⁻¹ versus k_{Des} 0,03 h⁻¹). Dieser Fakt kann verschiedene Ursachen haben. Das Trägermaterial wurde in beiden Versuchen auf unterschiedliche Art separiert. Während die Abtrennung im kleinen Maßstab durch Zentrifugation und Dekantieren der Flüssigkeit erfolgte, wurde das Immobilisat im hochskalierten Maßstab durch Filtration (Rührkesselreaktor) von der Reaktionslösung separiert. Dieser Einfluss der unterschiedlichen Immobilisatseparation auf die enzymatische Stabilität macht sich ebenfalls zwischen den beiden gewählten Rührkesselreaktoren bemerkbar. Durch die schonende Abtrennung und Waschung des Trägers im rotierenden Festbettreaktor konnte hier eine höhere Stabilität gegenüber dem Rührkesselreaktor erreicht werden. Diese kann neben der schonenden

Vorgehensweise ebenfalls durch geringere Verluste des Biokatalysators in den einzelnen Waschschrritten erklärt werden. Im kleinen Maßstab der Stabilitätsanalyse wurde das Immobilisat zudem zwischen den Messungen zur Bestimmung der Restaktivität in Wasser ohne Reaktanden inkubiert. Demzufolge hat die Reaktanden-Konzentration und die Art des experimentellen Vorgehens einen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Stabilität. Da dies jedoch nur eine Vermutung ist könnte z.B. ein Stabilitätsexperiment mit verschiedenen Substratkonzentrationen folgen, welches nähere Informationen über die konzentrationsabhängige Stabilität liefern würde.

3.7 Kritische Einschätzung des biokatalytischen Prozesses

Der erfolgreich entwickelte neue Prozess der AMDase katalysierten Herstellung von Arylpropionsäuren ist eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen chemischen Syntheserouten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das immobilisierte Enzym an einem Acrylatträger 10-mal in der Flurbiprofensynthese wiederverwendet werden. Hierbei war in der letzten Anwendung die Aktivität noch nicht vollständig verloren, sondern es konnten noch 10 % Restaktivität detektiert werden. Neben der Wiederverwertbarkeit konnte die Synthese im präparativen Maßstab für die α -Methyl- α -arylpropionsäuren (*S*)-Flurbiprofen und (*S*)-Naproxen erfolgreich demonstriert werden.

Dennoch ist die Bioprozessentwicklung an dieser Stelle noch nicht abgeschlossen und Optimierungen sind möglich. Eine Herausforderung stellt beispielsweise die Instabilität der α -Arylmalonsäuren dar und wird im folgenden Abschnitt 3.7.1 näher diskutiert. Eine weitere Möglichkeit den Prozess effizienter zu gestalten könnte durch weitere Optimierungen der AMDase realisiert werden (Abschnitt 3.7.2). Zudem kann für eine industrielle Anwendung eine direkte *in-line* Prozess Verfolgung der Reaktionsverläufe angestrebt werden (Abschnitt 3.7.3).

3.7.1 Stabilität der aromatischen Malonsäure-Derivate

Die Synthese von Arylpropionsäuren ausgehend von den Malonsäure-Derivaten bringt einen Nachteil mit sich. Das aromatische Substrat mit zwei benachbarten Carbonsäuren kann durch die unspezifische Autodecarboxylierung zu Arylpropionsäure decarboxylieren. Hierbei können sowohl das (*S*)- als auch das (*R*)-Enantiomer entstehen. Der Mechanismus dieser Reaktion wird durch die Keto-Enol Form dieser Verbindung gestützt, wobei eine Carbonylgruppe die Decarboxylierung der anderen bewirkt (Abbildung 60).

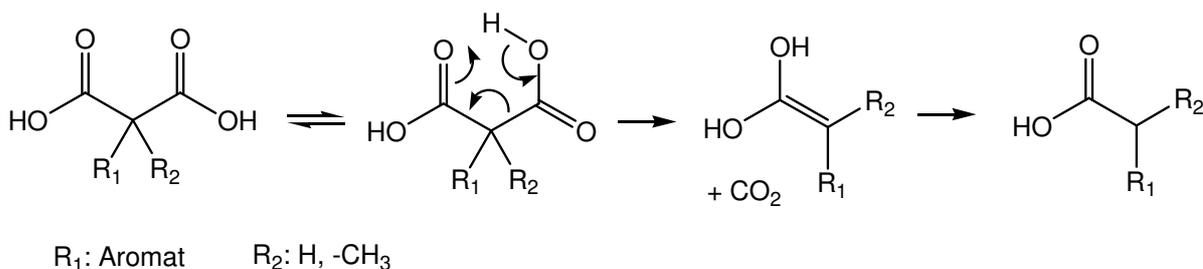


Abbildung 60: Decarboxylierung von Malonsäure Derivaten.

Insbesondere mit Flurbiprofenmalonsäure, welche mit dem Fluor einen elektronenziehenden Rest besitzt wurde eine hohe Decarboxylierungsrate festgestellt (Gaßmeyer 2015). Diese ist pH-abhängig und kann von den Zusammensetzungen der Reaktionslösung beeinflusst werden. So wurde beispielsweise mit dem Zusatz von PEG₆₀₀, welcher ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, eine höhere Decarboxylierung gegenüber der Reaktionen ohne PEG₆₀₀ beobachtet (Gaßmeyer 2015).

In dieser Arbeit wurden im Rahmen der Flurbiprofenmalonsäure-Umsetzung, eine racemische Flurbiprofen-Kontaminationen von 0,5 % bis 1,7 % in der Reaktionslösung nachgewiesen (pH 8,5, 10 mM Tris-Puffer, 25 mM Naproxenmalonsäure). Bei einer spontanen Reaktion würde die Decarboxylierung ein 1:1 (*R/S*)-Gemisch erzeugen. Die Produktreinheit ist demnach limitiert auf 99,8 %.

In der Synthese von Naproxen im präparativen Maßstab konnte ebenfalls eine spontane Decarboxylierung von 1,5 % detektiert werden (48,6 mM Naproxenmalonsäure, pH 8), demzufolge lag der maximal erreichbare ee des (*S*)-Enantiomers bei 99,3 %. Die enzymatisch katalysierte Reaktion ist strikt (*S*)-selektiv und die Kontamination von (*R*)-Enantiomer kann auf eine spontane Decarboxylierung zurückgeführt werden.

Hierbei tritt die Frage auf, wie eine spontane Decarboxylierung verhindert oder minimiert werden kann. Die Decarboxylierung ist stark pH sensitiv und bei alkalischen pH schwächer ausgeprägt. Die Malonsäure-Derivate weisen eine hohe Azidität auf und lösen sich erst durch Zugabe einer Base, wie NaOH. Da die Stabilität im basischen höher ist, sollte das Substrat zunächst mit einem Überschuss der Base versetzt werden, um die säureinduzierte Auto-Decarboxylierung zu minimieren. Eine Möglichkeit die Malonsäure-Vorläufer vor der unspezifischen Hydrolyse zu schützen könnte z.B. das Einführen von Schutzgruppen sein.

3.7.2 Möglichkeiten der weiteren Biokatalysator-Optimierung

Die enzymatische Aktivität der AMDase kann durch weiteres Engineering des aktiven Zentrums zusätzlich optimiert werden. Wie bereits im Abschnitt 3.2 der kinetischen Charakterisierung des freien Enzymes diskutiert, ist die Umsetzung der verschiedenen

Substrate strikt von der strukturellen Form des aktiven Zentrums der AMDase abhängig. Demnach sollte für jedes einzelne gewünschte Substrat ein separates Enzym-Engineering erfolgen um das jeweils am besten geeignete Enzym zu generieren. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit die Stabilität durch gezielte Mutationen von destabilisierenden Aminosäuren, insbesondere im Bereich der Enzymoberfläche zu erhöhen.

Eine weitere Möglichkeit robustere Enzyme zu gewinnen, stellt die Suche nach Enzymvarianten aus verschiedenen Ursprungsorganismen dar, wie z.B. thermophile Organismen, welche unter industrielle relevante Bedingungen z.B. mit hohen Temperaturen oder mit organischen Lösungsmitteln eine hohe Stabilität aufweisen. Folglich sind die Enzyme meist für diese Bedingungen angepasst und stabiler. Die Suche nach weiteren Vertretern dieser Enzymklasse wurde bereits von Maimanakos und ihren Coautoren (Maimanakos *et al.* 2016) durchgeführt. Es konnten 58 neue Enzymvarianten gefunden werden, wobei alle Varianten strikt (*R*)-selektiv sind. Drei ausgewählte AMDase Vertreter wurden weiter biochemisch charakterisiert. Zwei Enzyme (AmdA und AmdV) aus *Variovorax* sp. HH01 bzw. *Variovorax* sp. HH02 wurden aus Bodenproben isoliert. Die dritte Variante (AmdP) wurde in einer Datenbank-Recherche gefunden und stammt aus dem Organismus *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1. Dieser Stamm kann bei Temperaturen bis 50 °C wachsen, welches diese AMDase aus *P. gilvum* zu einem vielversprechenden Kandidaten für die industrielle Anwendung macht (Maimanakos *et al.* 2016). Bei genaueren Analysen dieser Varianten konnte jedoch eine signifikant geringere Aktivität (0,15–0,33 U/mg; Substrat: Naproxenmalonsäure) gegenüber der AMDase aus *Bordatella Bronchiseptica* ermittelt werden (Gaßmeyer 2015). Allerdings könnten diese Enzymvertreter dennoch als stabilere Grundlage für weitere Enzym-Engineerings mit dem Ziel der Aktivitätssteigerung herangezogen werden.

3.7.3 Option der *in-line* Prozess Analytik

Für die Etablierung eines Bioprozesses im industriellen Maßstab ist es sinnvoll den Reaktionsverlauf direkt, ohne Zeitverluste analysieren zu können. Hierdurch können zu lange Standzeiten vermieden werden, da *in situ* nachgewiesen wird, wann die Reaktion vollständig abgelaufen ist. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Anwendung von online-analytischen Technologien dar. Insbesondere spektroskopische Methoden werden häufig für diese Analysen angewendet, da sie die Produkte nicht zerstören und Daten in Echtzeit liefern (Kara *et al.* 2011) Die Schwingungsspektroskopie ist hierbei eine vielseitige Technologie um Konzentrationsverläufe in der Synthese organischer Verbindungen zu verfolgen. Bewährte Methoden in der Schwingungsspektroskopie sind Infrarot- (nahes, mittleres und fernes IR) (Gebhard *et al.* 2013; Mueller *et al.* 2011) und Raman-Spektroskopie (Bakeev 2005). Während Infrarotspektroskopie in wässriger Lösung Limitierungen aufgrund der breiten und intensiven

Wasser-Absorptionsbande hat, ist bei der Raman Spektroskopie die Wechselwirkung mit Wasser weniger stark ausgeprägt. Raman Spektroskopie wurde bereits erfolgreich für die *in-line* Prozessanalytik in der Herstellung von Pharmaka eingesetzt und besitzt den Vorteil der Messung ohne eine notwendige Probenvorbereitung (Beer *et al.* 2011). Auch für das in dieser Arbeit betrachtete System der AMDase katalysierten Arylpropionsäure-Synthese kommt diese Möglichkeit in Betracht. Die Machbarkeit der Implementierung einer *in-line* Prozessanalytik mittels Raman-Spektroskopie konnte erfolgreich demonstriert werden (Aßmann *et al.* 2017b). Hierbei wurde die freie AMDase-CLGIPL-Mutante in der Umsetzung von Naproxenmalonsäure zu Naproxen mittels einer Sonde in einem Rührkesselreaktor untersucht. Innerhalb des Reaktionsverlaufes zeigte das Raman Spektrum, insbesondere im Bereich von 1350 bis 1450 cm^{-1} , variierende Banden in Hinsicht auf die Intensitäten und Raman Verschiebungen (Abbildung 61, (Aßmann *et al.* 2017b)). Diese Banden der symmetrischen Deformationsschwingung $\delta_s(\text{CH}_3)$ und der Valenzschwingung der C-OH Gruppe der Carbonsäure $\nu(\text{C-OH})$, konnten erfolgreich für die Implementierung einer *in-line* Kontrolle zur Vorhersage der Konzentrationsverläufe mittels Raman Spektroskopie verwendet werden.

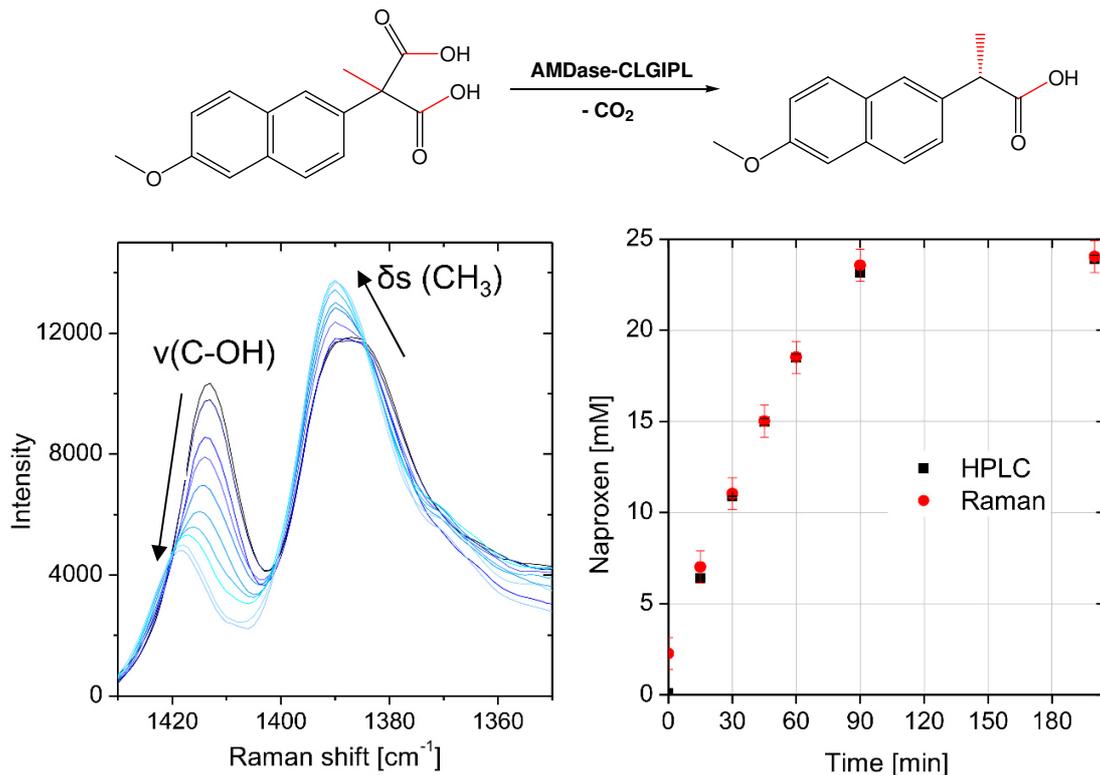


Abbildung 61: Links: Aufgenommenes Raman Spektrum während der enzymatisch katalysierten Naproxensynthese. Die Pfeile zeigen die Verschiebung der Intensitäten über den zeitlichen Verlauf der Reaktion an. Rechts: Durch HPLC und Raman Spektroskopie ermittelte Konzentrationen. Reaktionsbedingungen: 30°C, Startmaterial 25 mM Naproxenmalonsäure, pH 8, 80 mg/L AMDase-CLGIPL.

Die Anwendung von spektroskopischen Methoden für die Prozesskontrolle ist eine vielversprechende Möglichkeit den Bioprozess weiter zu optimieren. Hierbei steht zum einen die Möglichkeit offen, die *in-line* Kontrolle der Raman-Spektroskopie für weitere Zielreaktionen, wie für die Synthese von Flurbiprofen, zu untersuchen. Darüber hinaus gibt es die Option weitere alternative *in-line* Analytikmethoden für dieses System zu untersuchen.

Abschließend kann basierend auf die in dieser Promotionsarbeit generierten Ergebnisse geschlossen werden, dass der entwickelte Bioprozess der AMDase ein vielversprechendes Potential für die Synthese von enantiomerenreinen Pharmaka hat und eine umweltfreundliche Alternative zu den herkömmlichen chemischen Synthesen darstellt. Zusammenfassend sind in Tabelle 19 die Vor- und Nachteile des neuentwickelten Bioprozesses gegenübergestellt.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile des Bioprozesses der AMDase katalysierten Arylpropionsäure-Synthese.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Milde Bedingungen (T, pH) • Cofaktorfrei • Relativ hohe Enzymstabilität durch Immobilisierung an Träger • Hohe Enantiomerenreinheit • Simple Produktaufarbeitung mittels Säurefällung • Durch gezieltes Enzym-Engineering ist Zugang zu neuen chiralen Produkten und Generierung stabilerer Enzymvarianten möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Teilweise sind Arylmalonsäure-Vorläufer schwierig synthetisch zugänglich • Autodecarboxylierung möglich (verringerte Enantiomerenreinheit) • Limitiert durch die Enzymstabilität • Produktinhibierung und verringerte Aktivität des immobilisierten Enzymes setzt die Effizienz der Biokatalyse herab

4 Fazit

- Die Charakterisierung der freien AMDase in Bezug auf die Synthese von Arylpropionsäure-Derivaten zeigte eine hohe Affinität der AMDase-CLGIPL-Mutante in der Naproxenmalonsäure-Synthese.
- Studien des freien Enzymes deckten auf, dass die Stabilität des freien Enzymes unter den gewählten Prozessbedingungen (30 °C; pH 7–8) mit einer Halbwertszeit von 1,2 h vergleichsweise gering ist.
- Mit dem Zusatz von 10 % (v/v) des Polyethylenglycol (PEG₆₀₀) konnte eine Steigerung der Stabilität auf 30 °C von $\tau_{1/2} = 1,2$ h auf $\tau_{1/2} = 5,4$ h des freien Enzymes erreicht werden.
- Mittels Immobilisierung der AMDase aus dem Zelllysate konnte eine 170-fache Stabilitätssteigerung erreicht werden. Insgesamt konnte das immobilisierte Enzym 10-mal rezykliert und erfolgreich für eine Synthese eingesetzt werden.
- Die Synthese im präparativen Maßstab konnte für (*S*)-Flurbiprofen und (*S*)-Naproxen mit einem *ee* von 99 % des (*S*)-Enantiomers demonstriert werden.
- Die Produktaufarbeitung ist durch einfache säureinduzierte Fällung realisierbar und konnte für die (*S*)-Naproxen Synthese mit 92 % isolierten Produktausbeute im präparativen Maßstab gezeigt werden.
- Die Entwicklung des Bioprozesses für die Synthese von optisch reinen Arylpropionsäuren mittels immobilisierter AMDase wurde erfolgreich im Rahmen dieser Promotionsarbeit erreicht und kann für die Synthese von anderen Zielprodukten, katalysiert durch die AMDase, eingesetzt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Germany), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland), Fermentas (Burlington, Canada) und wurden in den jeweils höchsten Reinheitsgrad mit mindestens 98% p.a. erworben. Fertige SDS Gele, Probenpuffer, Laufpuffer und Färbelösung, wurden von Expedeon erworben. Die Substrate Naproxenmalonsäure und Flurbiprofenmalonsäure wurden von der Chiracon (Luckenwalde, Deutschland) bereitgestellt.

5.1.2 Stämme und Plasmide

Für Transformationen wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™) verwendet. Die Plasmide mit den Genen der Zielenzyme wurden von Prof. Robert Kourist (Ruhr Universität Bochum, Deutschland).

Tabelle 20: Verwendete Stämme und Plasmide.

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ omp T gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)λ(DE3[<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])
Plasmide	
pET28a_wtAMDase	Insert der Wildtyp-AMDase aus <i>Bordatella Bronchiseptica</i> , T7 Promotor, Kanamycin Resistenz, N-terminaler His ₆ Tag
pET28a_AMDaseCLGIPL	Insert der AMDase-CLGIPL-Mutante, T7 Promotor, Kanamycin Resistenz, N-terminaler His ₆ Tag

5.2 Methoden

5.2.1 Bereitstellung des Biokatalysators

5.2.1.1 Transformation von DNA in chemisch Kompetente *E. coli*

Die Transformation der plasmidischen DNA in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™) erfolgte nach der Hitzeschock- Methode. Hierfür wurde zu den aufgetauten, auf Eis gelagerten Zellen 1 µl Plasmid DNA gegeben und diese für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock, indem die Zellen für 90 sec auf 42 °C erhitzt wurden. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder für 1 min auf Eis gestellt und mit 950 µl LB-Mediums versetzt und für 45 min in einem Thermoshaker Inkubiert (450 rpm, 37 °C).

Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB- Platten mit Kanamycin (30 µg/mL) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Kolonie der Agarplatte wurde gepickt und eine 5 mL LB-Vorkultur mit Kanamycin (30 µg/mL) angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C, 200 rpm). Die angewachsene Vorkultur wurde anschließend für die Animpfung von Roti®-Store Cryoröhrchen verwendet, welche dann bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert wurden.

5.2.1.2 Proteinexpression

Rekombinante *Escherichia coli* BL21 (DE3) mit einem pET28a-Vektor mit einer N-terminalen His-Tag Sequenz und das Gen des Zielenzymes (Wildtyp-AMDase oder AMDase-CLGIPL-Mutante), wurden in LB-Medium mit Kanamycin (30 µg/mL) kultiviert (37 °C, 200 rpm). Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) gestartet und die Kultur für weitere 20 h inkubiert (30 °C, 200 rpm). Die Konzentration der Zellbiomasse wurde mit Hilfe von Messungen der optischen Dichte mit einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Hierfür wurden die Proben geeignet verdünnt und mit einem Spektrometer vermessen (S11 Visible spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge (UK))). Als Referenz diente das Medium, in welchem die Zellen kultiviert wurden. Nach erfolgter Proteinexpression wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (17 700 × g (10.000 rpm), 4 °C, 20 min) und bei -80 °C gelagert oder direkt verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall Behandlung geöffnet (Sonoplus HD2070 Sonikator, 90 % Intensität, 3x3 min, 5 mm Sonikator Spitze, zwischen den Zyklen wurde die Suspension (0,2 g_{Zellen}/mL) im Eisbad gekühlt). Das Zellysate wurde mittels Zentrifugation von den nicht löslichen Zellbestandteilen befreit (24.000 rpm, 30 min, 4 °C) und anschließend direkt verwendet oder das Zielprotein über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt.

5.2.1.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung erfolgte mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Für die Aufreinigung wurde das Zellysate mit 10 mM Imidazol versetzt und die Säule mit gepacktem Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) mit einem Equilibrierungspuffer vorbereitet (50 mM Tris-Puffer, 20 mM Imidazol, pH 7), anschließend wurde das Zellysate auf die Säule geladen und das angebundene Zielprotein mit einem Waschpuffer gewaschen (50 mM Tris-Puffer, 20 mM Imidazol, pH 7). Das gereinigte Zielprotein wurde dann mit Erhöhen der Imidazol Konzentration im Elutionspuffer von der Säule gelöst (250 mM Imidazol, 50 mM Tris-Puffer, pH 7). Die gesammelten Enzymfraktionen wurden mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit von dem Imidazol befreit (Amicon Ultrafiltrationseinheit, 10 kDa Membran) und mit 50 mM Tris-Puffer pH 7 nachgewaschen. Die Konzentration des Enzyms wurde mit Hilfe eines Bradford Assay nach der Methode von Zor und Selinger ermittelt (Bradford 1976; Zor & Selinger 1996).

Die Qualität der Aufreinigung der AMDase über eine Ni-NTA Affinitätssäule wurde anhand einer Proteinanalyse analysiert. In folgender Abbildung 62 ist beispielhaft eine SDS-PAGE der einzelnen Reinigungs-, Wasch- und Elutionsschritte zu sehen.

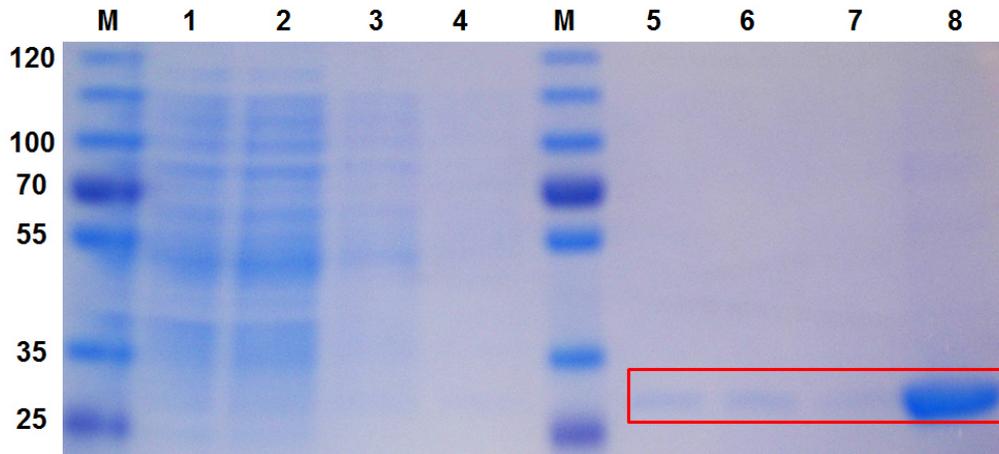


Abbildung 62: SDS-PAGE der AMDase Aufreinigungsschritte über eine Ni-NTA Säule. Bahn 1: Durchfluss nach Beladen der Säule, Bahn 2-4: Waschen der Säule, Bahn 5-7: Elution durch gesteigerte Imidazol Konzentration (250 mM); Bahn 8: AMDase nach Aufkonzentration und Umsalzung über Ultrazentrifugen Röhrchen.

5.2.2 Analytische Methoden

5.2.2.1 Gaschromatographie (GC)

Die Analyse mittels GC erfolgte nach Extraktion und Derivatisierung der Analyten. Die Extraktion wurde mit MTBE, welcher 2 mM (*R/S*) Ibuprofen als internen Standard beinhaltete, durchgeführt. Die Extraktion erfolgte in zwei Schritten, wobei jeweils 400 μ L MTBE zu 500 μ L wässriger Reaktionslösung zugefügt wurden. Anschließend erfolgte jeweils ein Extraktionsschritt mittels Vortexen (20 sec) und die Trennung der Phasen mit Zentrifugation (4 °C, 2 min, 12.100 x g). Die obere MTBE Phase wurde zur weiteren Analyse in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Derivatisierung der Analyte wurden diese an den freien Säurefunktionen methyliert. Hierfür wurde dem MTBE mit den extrahierten Analyten 100 μ L MeOH zugeführt und die Derivatisierung mit 50 μ L Trimethylsilyldiazomethan (TMS) (TCI Germany, 0,6 M in Hexan) durchgeführt (30 min, RT). Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zufügen von 5 μ L Essigsäure gestoppt und die Proben anschließen vollständig getrocknet. Die GC Analytik erfolgte nach Resuspension der Proben mit 200 μ L Ethylacetat, welcher mit Magnesiumsulfat von Wasserresten befreit wurde.

Die Analytik erfolgte mit einer chiralen Säule CP-(Chirasil DEX CB, Varian, Palo Alto, USA) an einem HP 6890 Gaschromatographie System mit FID Detektor. Die Analyse wurde mit

isothermer Temperatur 150 °C für 8 min und einem Injektionsvolumen von 1 µL mit 1:20 Split Verhältnis realisiert. Die Retentionszeit von der methylierten Phenyllessigsäure war 2,1 min, die der methylierten von Phenylmalonsäure war 5,0 min.

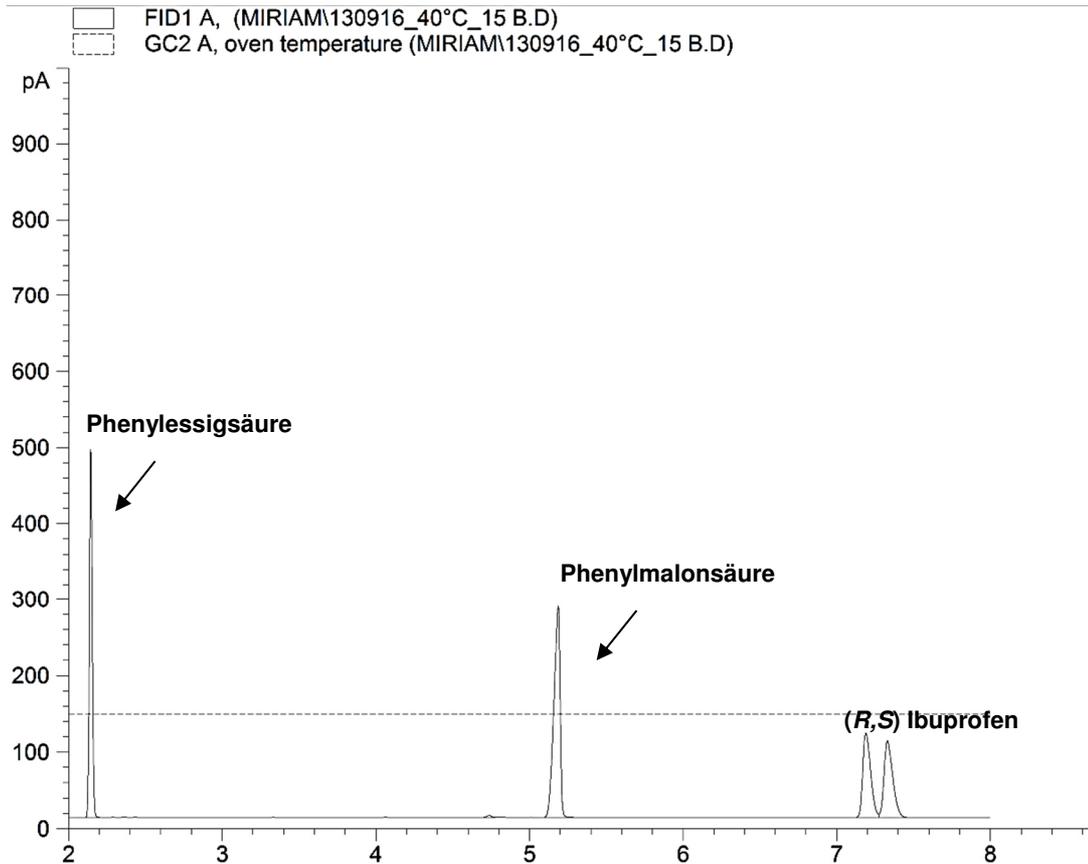


Abbildung 63: Beispiel-Chromatogramm der GC Analyse von Phenylmalonsäure und Phenyllessigsäure.

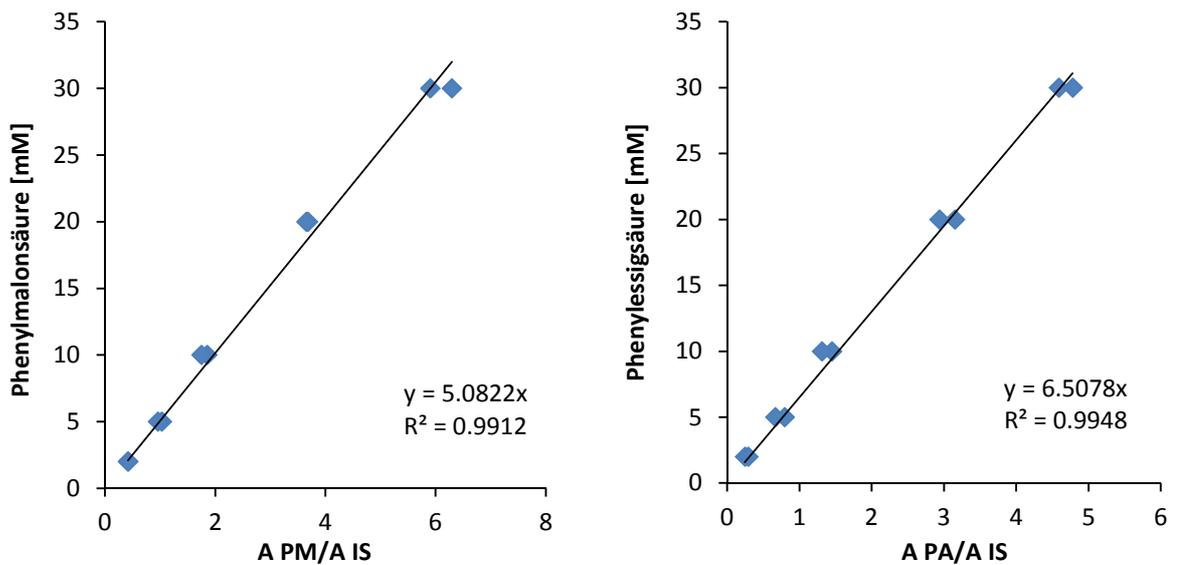


Abbildung 64: Standardkalibration von Phenyllessigsäure und Phenylmalonsäure.

Für die Analytik zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der Arylpropionsäuren wurde 1 mg des isolierten Produktes in 600 μL MTBE resuspendiert. Die Probe wurde anschließend durch Zugabe von 100 μL MeOH und 50 μL Trimethylsilyldiazomethan (TMS) (TCL Germany, 0,6 M in Hexan) derivatisiert (30 min, RT) und nach erfolgter Reaktion mit 5 μL Essigsäure gestoppt. Die derivatisierten Proben wurden anschließend getrocknet und für die Analyse in 200 μL Ethylacetat resuspendiert. Die Proben wurden mittels GC (Shimadzu GC Plus 2010, Duisburg, Deutschland) mit einer FS Hydrodex- β -6TBDM Säule (Macherey-Nagel, Düren, Germany) und einer isothermen Methode bei 160 $^{\circ}\text{C}$ mit einer (1/20) Split Injektion.

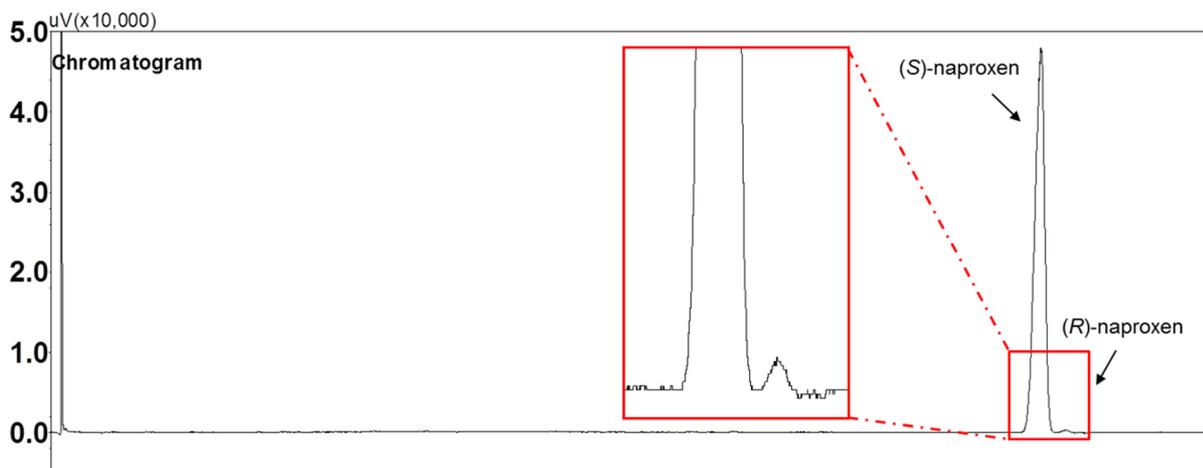


Abbildung 65: Beispielchromatogramm der chiralen GC Analytik zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Naproxen.

5.2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Quantifizierung der Profene und des Modellsystems Phenylmalonsäure/Phenylessigsäure- erfolgte mittels HPLC Analytik an einem Agilent 1100 HPLC System mit einer C18 (RP18) Säule (Nucleodur C18 Pyramid 250/4.6, Macherey Nagel). Die Detektion der Analyten erfolgte mit einem DAD (Dioden Array Detektor) mit einer Wellenlänge von 245 nm. Der Eluent wurde isokratisch mit 0,8 mL/min in einem Verhältnis von ACN:H₂O:TFA (59.025:39.025:0.05) eingesetzt, je nach Intensität der einzelnen Analyten die Injektionsmenge und die Probenvorbereitung variiert.

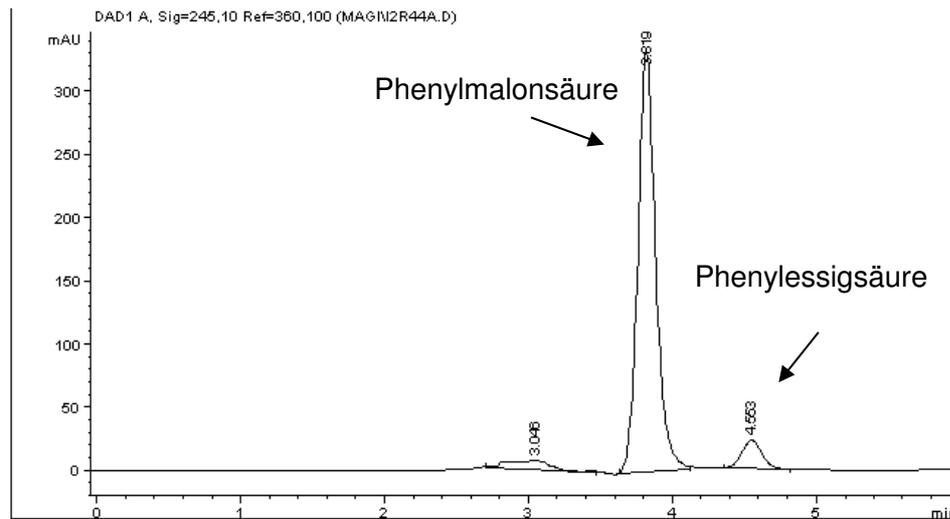


Abbildung 66: Referenz HPLC Chromatogramm von Phenylmalonsäure und Phenyllessigsäure. Die HPLC Analyse erfolgte mit einer RP18 Säule (Nucleodur C18 Pyramid 250/4.6, Machery Nagel) an einem Agilent 1100 HPLC System mit einem isokratischen Fluss mit ACN:H₂O:TFA (59.025:39.025:0.05) mit einer Flussrate von 0,8 mL/min für 6 min. Die Detektion erfolgte mit einem DAD Detektor bei einer Wellenlänge von 245 nm.

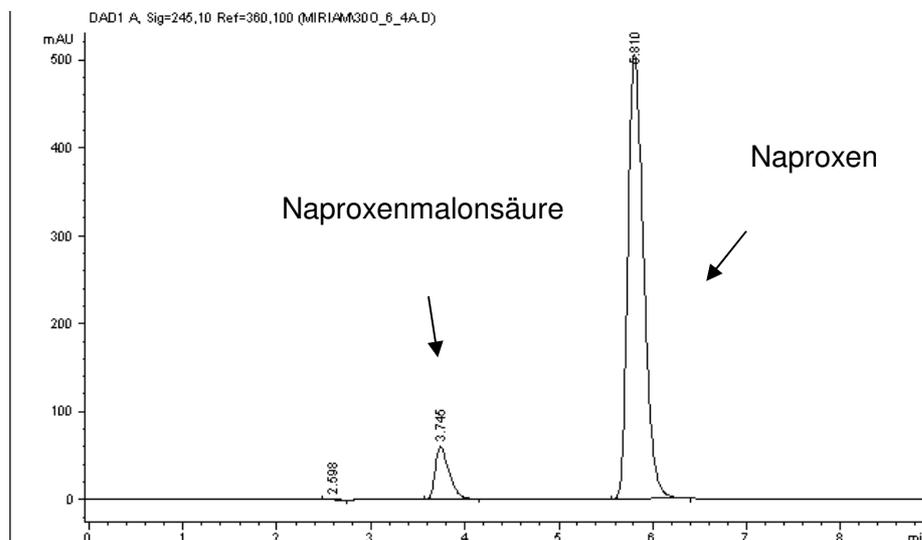


Abbildung 67: Referenz HPLC Chromatogramm von Naproxenmalonsäure und Naproxen. Die HPLC Analyse erfolgte mit einer RP18 Säule (Nucleodur C18 Pyramid 250/4.6, Machery Nagel) an einem Agilent 1100 HPLC System mit einem isokratischen Fluss mit ACN:H₂O:TFA (59.025:39.025:0.05) mit einer Flussrate von 0,8 mL/min für 9 min. Die Detektion erfolgte mit einem DAD Detektor bei einer Wellenlänge von 245 nm.

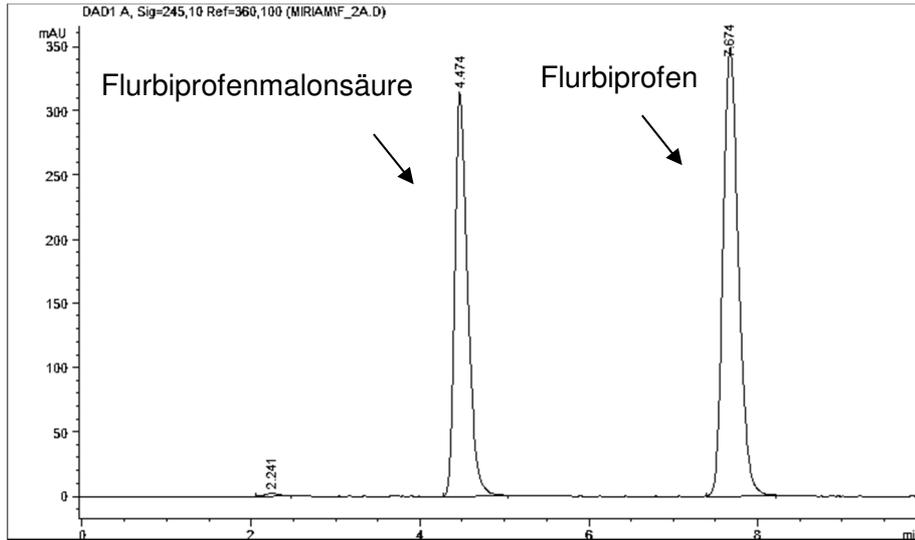


Abbildung 68: Referenz HPLC Chromatogramm von Flurbiprofenmalonsäure und Flurbiprofen. Die HPLC Analyse erfolgte mit einer RP18 Säule (Nucleodur C18 Pyramid 250/4.6, Machery Nagel) an einem Agilent 1100 HPLC System mit einem isokratischen Fluss mit ACN:H₂O:TFA (59.025:39.025:0.05) mit einer Flussrate von 0,8 mL/min für 10 min. Die Detektion erfolgte mit einem DAD Detektor bei einer Wellenlänge von 245 nm.

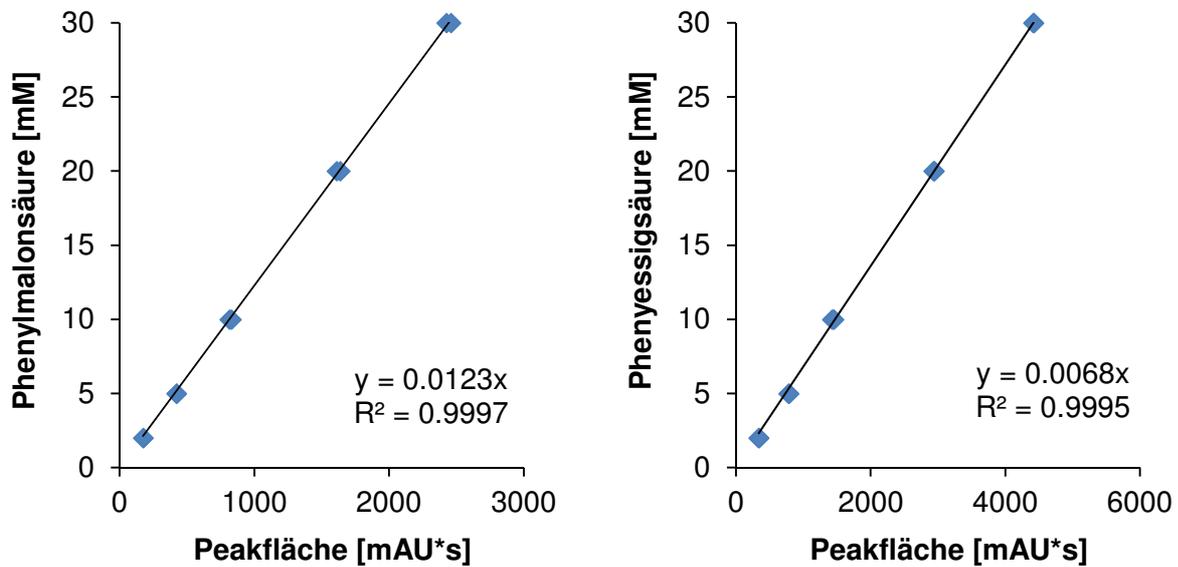


Abbildung 69: Standardkalibration von Phenylmalonsäure und Phenyllessigsäure.

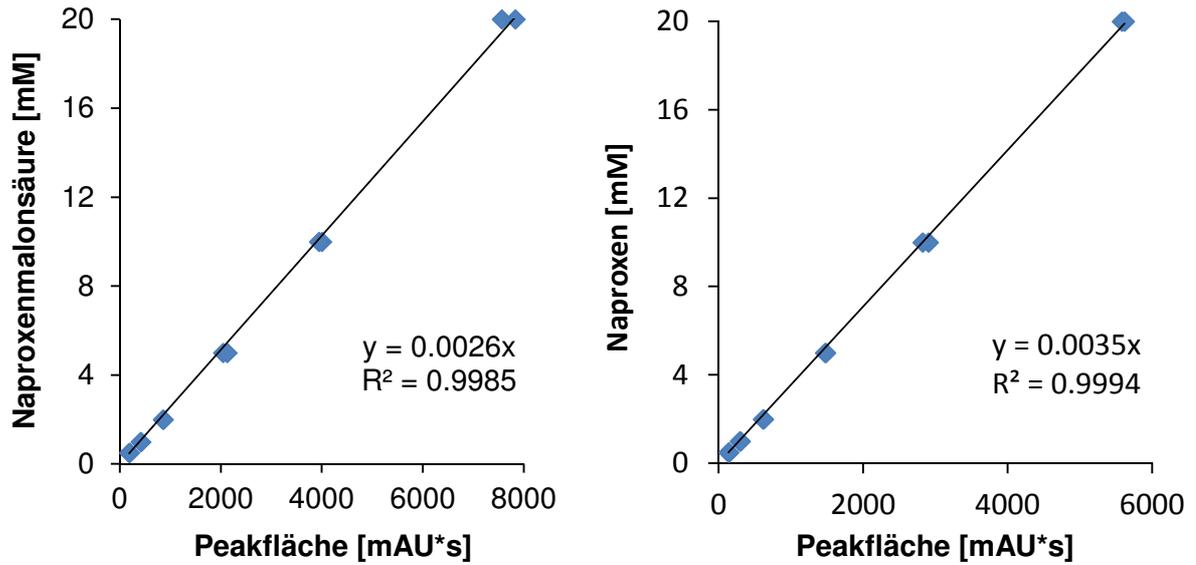


Abbildung 70: Standardkalibration von Naproxenmalonsäure und Naproxen.

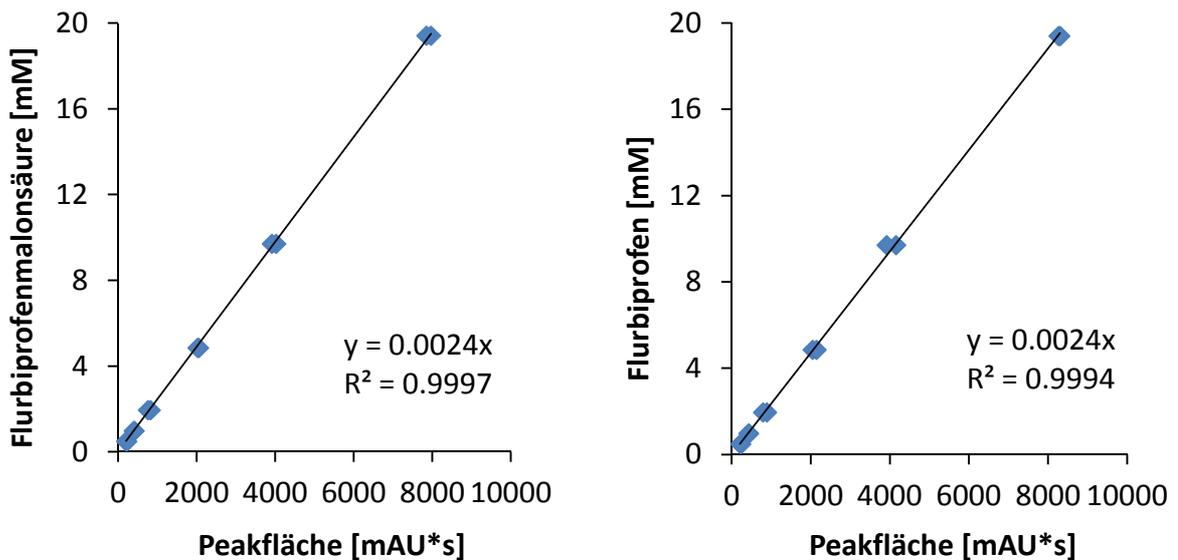


Abbildung 71: Standardkalibration von Flurbiprofen und Flurbiprofenmalonsäure.

5.2.3 Untersuchung der Rahmenbedingungen für die Bioprozessentwicklung

Für die Analyse der Rahmenbedingungen der Reaktion wurde die Wildtyp-AMDase in der Umsetzung von Phenylmalonsäure verwendet. Zunächst wurde die Konzentration des Enzymes für eine geeignete Verfolgung der Reaktion ermittelt, um in einen gut messbaren Bereich für die Analyse zu liegen. Hierbei wurde die Konzentration von 2 mg/L der Wildtyp-AMDase für die Charakterisierung festgelegt. Die Reaktionen wurden im 0,5 mL Maßstab in 1,5 mL Reaktionsgefäßen auf Schüttelinkubatoren mit 500 rpm durchgeführt.

Die pH abhängige Aktivität des freien Enzymes wurde in einem Bereich von pH 5–10 untersucht. Die Reaktionslösung (450 μ L, 50 mM Tris-Puffer, 25 mM Phenylmalonsäure, pH 5–10) wurde auf 30° für 5 min vortemperiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 μ L Enzymlösung (0,02 mg/mL) gestartet (30 °C, 500 rpm). Für die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität wurde diese in einem Bereich von 25 °C bis 55 °C untersucht. Die Reaktionslösung (450 μ L, 50 mM Tris-Puffer, 25 mM Phenylmalonsäure, pH 7) wurde auf die zu analysierende Temperatur vortemperiert und die Reaktion mit Zugabe der Enzymlösung gestartet.

Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von 50 % (v/v) einer 2 M Salzsäure gestoppt und wie in Abschnitt 5.2.2.1 beschrieben aufgearbeitet.

5.2.4 Kinetische Charakterisierung des freien Enzymes

Die kinetische Charakterisierung der Wildtyp-AMDase in der Phenylmalonsäure Umsetzung erfolgte in einem Bereich von 0–80 mM. Die Reaktionslösung (450 μ L, 50 mM Tris-Puffer, 0–80 mM Phenylmalonsäure, pH 7) wurde bei 30 °C vorinkubiert und mit 50 μ L Enzymlösung (2 mg/L, 0,08 μ M) gestartet und mit 250 μ L 2 M HCl gestoppt und wie in Abschnitt 5.2.2.1 analysiert.

Die Analyse der Wildtyp-AMDase in Hinsicht auf die Umsetzung von Naproxenmalonsäure erfolgte mit Konzentrationen in einem Bereich von 0–18 mM Naproxenmalonsäure. Die Reaktionslösung (450 μ L, 50 mM Tris-Puffer, 0–18 mM Naproxenmalonsäure, pH 7) wurde hierbei bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 μ L Enzymlösung gestartet (10 mg/L, 0,4 μ M). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ L Acetonitril gestoppt und wie in Abschnitt 5.2.2.2 beschrieben analysiert.

Die aufgereinigte AMDase-CLGIPL-Mutante wurde ebenfalls auf die Kinetiken in der Phenylmalonsäure Umsetzung (0–21 mM) und Naproxenmalonsäure Umsetzung (0–6 mM) untersucht. Hierbei wurde ebenfalls die Reaktionslösung (450 μ L, 50 mM Tris-Puffer, Substrat in verschiedenen Konzentrationen, pH 7) vortemperiert und mit 50 μ L Enzymlösung gestartet (10 mg/L, 0,4 μ M) und mit 250 μ L Acetonitril gestoppt und wie in Abschnitt 5.2.2.2 beschrieben analysiert.

5.2.5 Stabilitätsuntersuchung des freien Enzymes

Für die Stabilitätsuntersuchung der freien aufgereinigten Wildtyp-AMDase wurde diese mit verschiedenen Konzentrationen des Additivs PEG₆₀₀ versetzt und unter Schütteln inkubiert (2 mg/L Wildtyp-AMDase, pH 7, 200 rpm, 37,5 mM Tris-Puffer, PEG₆₀₀: 0, 5, 10 und 20 % (v/v)). Nach definierten Zeitpunkten wurden Aliquote (0,45 mL) entnommen und diese

auf die verbleibende Aktivität untersucht. Die Reaktion wurde hierbei mit 20 mM Phenylmalonsäure Reaktionslösung auf die verbleibende Anfangsaktivität untersucht (30 °C, 500 rpm, pH 7). Die Reaktion wurde nach 15 min mit 250 mL Acetonitril gestoppt und wie in Abschnitt 5.2.2.2 beschrieben analysiert.

Die Stabilität des freien Enzymes wurde zudem mit verschiedenen Temperaturen analysiert. Hierbei erfolgte die Analyse der Stabilität der AMDase-CLGIPL-Mutante direkt durch Ermittlung der Restaktivitäten in der Umsetzung einer Naproxenmalonsäure Lösung (1 mL Reaktionsvolumen, 120 mM Naproxenmalonsäure, 100 mg/L AMDase-CLGIPL, 500 rpm, pH 8, ohne Puffer mit 1 M NaOH justiert und $T = 22, 25$ und 30 °C. Es wurden kontinuierlich Proben entnommen und diese mit 0,5 Volumeneinheiten Acetonitril abgestoppt, geeignet verdünnt (mit einem Acetonitril Wasser Gemisch (1:1)) und mit HPLC analysiert (Abschnitt 5.2.2.2).

5.2.6 Vergleich verschiedener Enzympräparationen

Für die Immobilisierung des jeweils frisch aufgereinigten Enzymes (Abschnitt 5.2.1.3) wurden verschiedene Trägermaterialien eingesetzt. Diese weisen verschiedene Charakteristika auf (Größe, Anbindung etc.). In Tabelle 21 befindet sich eine Übersicht der verschiedenen Träger mit den jeweiligen Charakteristika. Für Amin funktionalisierten Träger wurde eine Voraktivierung mit einer 2 %igen (w/v) Glutaraldehyd Lösung durchgeführt (1:4 (w/v), 1 h, 8 rpm, RT), anschließend wurde der Träger mit Wasser gewaschen. Für die Immobilisierung wurden jeweils 200 mg Trägermaterial mit 5 mL Enzymlösung ($4\text{--}8 \text{ mg}_{\text{Enzym}}/\text{mL}$ in 50 mM Tris-Puffer, pH 7) für 16–18 h inkubiert (8 rpm, RT). Das Immobilisat wurde über einen Filter von der Lösung getrennt (Porengröße 2, 40–100 μm oder Poren Größe 3, 16–40 μm), zweimal mit 5 mL 50 mM Tris-Puffer pH 7 und einmal mit 5 mL 0,5 M NaCl Lösung gewaschen. Die Fraktionen der einzelnen Schritte wurden für weitere Analysen der Proteinquantifizierung bzw. für Aktivitätsmessungen gesammelt.

Tabelle 21: Charakteristika der verschiedenen Träger.

Träger	Anbindung	Funktionalität (Dichte [$\mu\text{mol/g}$])	Matrix (zusätzliche Beschichtung)	Partikel Durchmesser [μm]	Poren Durchmesser [nm]
Amino C2 Acrylat	kovalent	Amino (1760)	Acrylat	423	119,5
Sepabeads EC-EP	kovalent	Epoxy (>100)	Polymethacrylat	200–500	10–20
Sepabeads EC-HA	kovalent	Hexamethyl-amino (>700)	Polymethacrylat	200–500	10–20
Trisoperl® Poröse Glas Perlen	adsorptiv	/	poröses Glas	100–200	120
Trisoperl® Amino	adsorptiv	/	poröses Glas	100–200	120
EziG1™	komplex	Co(II) oder Fe(III) (>10)	poröses Glas (langkettige Aminoalkyle)	74–125	50
EziG2™	komplex	Co(II) oder Fe(III) (>10)	poröses Glas (Vinylbenzylchlorid)	74–125	50
EziG3™	komplex	Co(II) oder Fe(III) (>10)	poröses Glas (Copolymer aus Styrol und Acrylnitril)	74–125	50

Die Aktivität des immobilisierten Enzymes wurde in Batch-Experimenten in 100 mL Rührkesselreaktoren mit Propellerrührer und Wassertemperiersystem untersucht. Die Aktivität für die erste Untersuchung der immobilisierten Wildtyp-AMDase erfolgte in der Umsetzung von Phenylmalonsäure (20 mM Phenylmalonsäure, 45 mM Tris-Puffer, 200 rpm, 30 °C). Der Verlauf der Reaktion wurde durch kontinuierliche Probenentnahme und HPLC Analytik verfolgt. Nach den Batch-Experimenten wurde der Träger gefiltert, mit Tris-Puffer gewaschen (50 mM Tris-Puffer, pH 7) und bis zur erneuten Anwendung bei 4 °C gelagert.

Die Untersuchung verschiedener Typen komplexierender poröser Glas Trägern erfolgte mit der aufgereinigten immobilisierten AMDase-CLGIPL-Mutante. Zur Immobilisierung wurden hierfür 100 mg Träger mit 5 mL Enzymlösung (2 mg/mL) für 16 h mit 8 rpm inkubiert und wie oben beschrieben gewaschen und auf Enzymbeladungen untersucht. Die Immobilisate wurden hierbei jeweils durch Zentrifugation und Abnahme der Flüssigkeit von den verschiedenen Wasch-Lösungen befreit. Die Analyse auf spezifische Aktivitäten erfolgte in wiederholten Batch-Experimenten in der Phenylmalonsäure Umsetzung mit 50 mL Volumen, 2 g/L Träger, 45 mM Tris-Puffer pH 8, 20 mM Phenylmalonsäure, 400 rpm, 30 °C. Zwischen den Batch-Experimenten wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert, gewaschen und bei 4 °C gelagert.

5.2.7 Immobilisierung der AMDase-CLGIPL-Mutante aus dem Zelllysats

Zur Evaluierung der Enzymimmobilisierung aus dem Zelllysats wurden zwei Ansätze, einer mit aufgereinigtem Enzym und ein zweiter mit einer Immobilisierung des Zelllysats, durchgeführt. Hierfür wurden 100 mg Ezig(III) Fe oder 200 mg Amino C2 Acrylat mit 10 mL aufgereinigter Enzymlösung (5,6 mg/mL) oder 10 mL Zelllysats für 1 h (Ezig(III) Fe) oder 17 h (Amino C2 Acrylat) inkubiert und die Träger anschließend, wie zuvor beschrieben (Abschnitt 5.2.6) gewaschen. Die Aktivität der zwei Präparate wurde anschließend in einem parallelen Ansatz in der Umsetzung von Phenylmalonsäure analysiert (2 g/L Ezig(III) Fe bzw. 4 g/L Amino C2 Acrylat), 30 °C, 50 mL, pH 8, 400 rpm, 25 mM Phenylmalonsäure). Die Analyse erfolgte mittels kontinuierlicher Probenentnahme und HPLC Analytik. Nach erfolgter Reaktion wurde der Träger von der Reaktionslösung separiert, gewaschen und zur Analyse der Wiederverwertbarkeit in erneuten Batch mit gleichen Bedingungen eingesetzt.

5.2.8 Wiederverwertbarkeit des immobilisierten Enzymes

Zur Demonstration der Wiederverwertbarkeit des immobilisierten Enzymes wurde die aufgereinigte AMDase-CLGIPL-Mutante wie oben beschrieben immobilisiert (Abschnitt 5.2.6). In Rundboden Mikroreaktionsgefäßen wurden 100 mg Immobilisat vorgelegt und die Reaktion mit 1,5 mL vortemperierter Naproxenmalonsäure-Lösung gestartet (1,5 mL Reaktionsvolumen, 100 mM Naproxenmalonsäure, 66,7 g/L Amino C2 Acrylat mit aufgereinigter immobilisierter AMDase-CLGIPL-Mutante, Enzym Beladung: 80,7 mg_{Enzyme}/g_{Träger}, 30 °C, 1500 rpm und pH 8,0). Die Reaktion wurde durch kontinuierliche Probenentnahme verfolgt. Nach der Reaktion wurde der Träger durch Zentrifugation von der Reaktionslösung getrennt (12,100 × g, RT, 2 min) und die Flüssigkeit abgenommen. Der Träger wurde mit Wasser mit einem justierten pH von 8 (mittels 1 M NaOH) gewaschen und zur erneuten Anwendung bei 4 °C gelagert.

5.2.9 Analyse des Einflusses von PEG₆₀₀ auf das immobilisierte Enzym

Der mögliche Einsatz von Polyethylenglycol in der Reaktionslösung mit immobilisierter AMDase-CLGIPL-Mutante aus dem Zelllysats an Amino C2 Acrylat wurde in der Phenylmalonsäure-Umsetzung untersucht. Hierbei wurden zwei Ansätze mit jeweils 5 g Immobilisat durchgeführt. Ein Ansatz wurde als Referenz ohne Zusätze realisiert, während in dem anderen eine Zugabe von 10 % (v/v) PEG₆₀₀ in der Reaktionslösung erfolgte. Das Immobilisat wurde auf die spezifischen Aktivitäten und die Wiederverwertbarkeit in wiederholten Anwendungen untersucht. Hierbei wurden die Batch-Experimente in 50 mL Rührkesselreaktoren mit Propeller Rührer realisiert und die Reaktion mit Probenentnahme und

HPLC Analytik verfolgt (10 g/L Träger, 50 mL Reaktionsvolumen, 25 mM Phenylmalonsäure, 0 % oder 10 % (v/v) PEG₆₀₀ pH 8, 30 °C, 400 rpm). Insgesamt wurden fünf parallele Experimente durchgeführt.

5.2.10 Beschichtung des Immobilisats und Aktivitätsanalyse

Die Beschichtung der immobilisierten AMDase-CLGIPL an amino C2 Acrylat aus dem Zelllysat erfolgte mit zwei ionischen Polymeren. Das positiv geladene Polydiallyldimethylammonium Chlorid (PDDA) (Sigma-Aldrich) und das negativ geladene Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) (Sigma-Aldrich). Beide Polymere wurden in einer 0,5 M NaCl Lösung angesetzt (PSS: 2 mg/mL; PDDA: 2 µL/mL). Zur Beschichtung des immobilisierten Enzymes wurden dreimal 100 mg Immobilisat in Mikroreaktionsgefäße abgewogen. Das Immobilisat wurde mit Wasser äquillibriert, gevortext und der Überstand nach Zentrifugation verworfen (12,100 × g, RT, 2 min). Das Immobilisat wurde anschließend zur Beschichtung mit 1 mL der Polymerlösung oder als Referenz mit 1 mL reiner 0,5 M NaCl Lösung versetzt und inkubiert (30 min, 800 rpm, RT). Der Überstand wurde nach Zentrifugation verworfen (12,100 × g, RT, 2 min) und das Immobilisat zuerst mit 1 mL einer 0,5 M NaCl Lösung und mit 1 mL Wasser gewaschen. Die Überstände wurden jeweils nach der Abtrennung mittels Zentrifugation verworfen (12,100 × g, RT, 2 min) und die beschichteten Träger bis zur Anwendung bei 4 °C gelagert.

Für eine mehr-fach Beschichtung des Trägers wurden drei Ansätze mit jeweils 100 mg Immobilisat verwendet. Die Beschichtung erfolgte wie oben beschrieben, wobei für den Referenzträger ohne Beschichtung ebenfalls eine 0,5 M NaCl Lösung eingesetzt wurde. Nach der ersten Polymerschicht wurde das Immobilisat abwechselnd mit positiven und negativen Polymer beschichtet (1 mL PSS: 2 mg/mL oder PDDA: 2 µL/mL in 0,5 M NaCl, 30 min, RT), zwischen den Beschichtungen jeweils vom Überstand getrennt und mit 1 mL 0,5 M NaCl Lösung gewaschen (12,100 × g, RT, 2 min). Nach der fünften Schicht erfolgte ein Waschschritt mit Wasser und der beschichtete Träger wurde nach Abtrennung des Überstandes (12,100 × g, RT, 2 min) bei 4 °C bis zur Anwendung gelagert.

Die Analyse der beschichteten Immobilisate erfolgte in fünf wiederholten Batch-Versuchen in der Naproxenmalonsäure Umsetzung (1 mL, 30 °C, 1500 rpm, pH 8, 25 mM Naproxenmalonsäure, 100 mg/L Immobilisat).

5.2.11 Thermischen Stabilität der immobilisierten AMDase-CLGIPL

Die thermische Analyse erfolgte mit immobilisierter AMDase-CLGIPL aus dem Zelllysat an Amino C2 Acrylat mit den Temperaturen 15, 25, 30 und 35 °C. Dieses Experiment wurde im kleinen Maßstab in Mikroreaktionsgefäßen auf Thermoshakern realisiert. Jeweils 100 mg

Immobilisat wurden in einem Volumen von 1 mL eingesetzt. Die Inkubation erfolgte hierbei bei den jeweiligen Temperaturen (15, 25, 30 und 35 °C) in einer mit pH 8 justierten (mit 1 M NaOH) wässrigen Lösung mit 900 rpm. Die Aktivitäten wurden analysiert, indem das Immobilisat von der Lösung befreit wurde (12,100 × g, 2 min) und die Reaktion mit vortemperierter Reaktionslösung gestartet wurde (1 mL Reaktionsvolumen, 100 g/L Immobilisat, 900 rpm, 25 mM Naproxenmalonsäure, pH 8 (justiert mit 1 M NaOH)). Die Reaktion wurde durch kontinuierliche Probenentnahme unter Analytik mittels HPLC verfolgt. Der Träger wurde anschließend von der Reaktionslösung befreit (12,100 × g, 2 min), mit 1 mL Wasser nachgewaschen und dieses wieder abgetrennt (12,100 × g, 2 min) und weiter mit 1 mL pH 8 justierten Wasser (mit 1 M NaOH) bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert (1 mL, pH 8, 900 rpm).

5.2.12 Kinetische Untersuchung des immobilisierten Enzyms

Die kinetische Untersuchung des immobilisierten Enzymes an Amino C2 Acrylatträger erfolgte im 1 mL Maßstab. Zur Analyse der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in der Naproxenmalonsäure Umsetzung wurden verschiedene Mengen an immobilisiertem Enzym eingesetzt (3,6 mg bis 21,8 mg) und die Umsetzung in Mikroreaktionsgefäßen auf dem Thermoschüttler mit 900 rpm untersucht. Die Reaktion wurde mit 1 mL auf 30 °C vortemperierter Naproxenmalonsäure Lösung in Wasser (pH 8, eingestellt mit 1 M NaOH) mit Konzentrationen von 0,2 mM bis 98,4 mM gestartet.

Die Analyse auf eine Produktinhibierung erfolgte mit 20 mg immobilisierter AMDase-CLGIPL-Mutante an Amino C2 Acrylatträger in 1 mL Reaktionsvolumen. Die Naproxenmalonsäure Konzentration wurde mit 45 mM festgesetzt und verschiedene Naproxen Mengen (0,5 mM bis 67,4 mM) hinzugefügt (pH 8, eingestellt mit 1 M NaOH). Die Reaktionslösungen wurde bei 30 °C vortemperiert und als Start der Reaktion zu dem immobilisierten Enzym hinzugefügt und die Reaktion bei 30 °C auf dem Schüttler mit 900 rpm verfolgt. Proben für die Analyse wurden jeweils doppelt entnommen und geeignet mit einem Acetonitril : Wasser (1:1) (v/v) Gemisch verdünnt, um im linearen Messbereich der HPLC Analytik zu liegen. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (unter 5 % Umsetzung) wurden jeweils zur Berechnung der Kinetiken nach Michaelis-Menten verwendet.

5.2.13 Untersuchung auf externe Stofftransportlimitierungen

Die möglichen Stofftransportlimitierungen wurden mit zwei unterschiedlich hoch gepackten Säulen mit einem jeweiligen Volumen von 1,3 und 3,3 mL in Festbettreaktoren untersucht. Für die Analyse wurde eine 5 mM Flurbiprofenmalonsäure Reaktionslösung in Wasser mit einem

pH Wert von 8 (eingestellt mit 1 M NaOH) eingesetzt. Die Verweilzeiten wurden zu 1, 2, 5, und 6 min eingestellt und die Umsätze, nach Erreichen des Steady State nach über fünf Verweilzeitlängen, untersucht. Die Proben wurden anschließend mittels HPLC analysiert.

5.2.14 Flurbiprofenmalonsäure Synthese in wiederholten Batch-Experimenten

Die Aktivität der immobilisierten aufgereinigten AMDase-CLGIPL an Amino C2 Acrylaträger oder des immobilisierten Zellysats wurde in wiederholten Batch-Experimenten im 1 mL Maßstab in der Flurbiprofenmalonsäure Umsetzung analysiert (1500 rpm, 30 °C, 20 mM Flurbiprofenmalonsäure, 10 mM Tris-Puffer, pH 8,5 (eingestellt mit 1 M NaOH) 20,3 mg Immobilisat mit aufgereinigtem Enzym oder 122,7 mg Immobilisat mit Zellysat). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Flurbiprofenmalonsäure gestartet und der Reaktionsverlauf mit HPLC analysiert. Nach erfolgter Reaktion wurde das Immobilisat von der Reaktionslösung befreit (12,100 × g, 4 °C, 2 min) mit 1 mL Wasser gewaschen und bei 4 °C bis zur nächsten Anwendung gelagert.

5.2.15 Flurbiprofenmalonsäure Synthese im präparativen Maßstab

Die enzymatisch katalysierte Flurbiprofen Synthese wurde für einen präparativen Ansatz im 20 mL Maßstab mit immobilisierter AMDase-CLGIPL an amino C2 Acrylaträger durchgeführt. Hierfür wurden 250,9 mg immobilisiertes Enzym eingesetzt und die Reaktion mit einer 25 mM Flurbiprofenmalonsäure Reaktionslösung (152,2 mg, 526.9 μmol) durchgeführt (30 °C, pH 8,5, 10 mM Tris-Puffer, 600 rpm). Der Reaktionsverlauf wurde durch kontinuierliche Probenentnahme und der Analytik mittels HPLC verfolgt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Träger mit immobilisiertem Enzym von der Flurbiprofen Produktlösung durch Zentrifugation getrennt (6000 rpm, RT) und mit 5 mL 6 M HCl angesäuert. Anschließend erfolgte die Extraktion mit Ethylacetat in drei Extraktionsschritten und Abtrennung über einen Scheidetrichter (3x15 mL). Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mit einem Rotationverdampfer entfernt. Die Enantiomerenreinheit des Endproduktes wurde mittels chiraler GC bestimmt.

5.2.16 Präparative (S)-Naproxen Synthese in wiederholten Batch-Experimenten

Die (S)-Naproxen Synthese in wiederholten Batch-Experimenten wurde in 100 mL Maßstab in zwei Rührkesselreaktoren durchgeführt. Zum einen, ein normaler Rührkesselreaktor mit einem Propellerrührer und zum anderen einen Rührkesselreaktor mit einem Einsatz im Rührerelement für ein gepacktes Festbett (*engl.* Rotating bed reactor (RBR); SpinChem AB, Umeå, Schweden). 45 g/L Amino C2 Acrylat mit immobilisierter AMDase-CLGIPL-Mutante wurden für die jeweiligen Umsetzungen bei 30 °C und 700 rpm eingesetzt. Die Reaktion

erfolgte mit 48,6 mM Naproxenmalonsäure (13,3 g/L) mit einem pH 8,0 (eingestellt mit 1 M NaOH) in einem ungepufferten System. Im Verlauf der Biotransformation zu (*S*)-Naproxen in dem ungepufferten System konnte eine leichte pH-Verschiebung nach 8,3 detektiert werden. Die Reaktionsverläufe wurden mit kontinuierlichen Probenentnahmen verfolgt und mittels HPLC analysiert. Zwischen den Batch-Experimenten wurde das Immobilisat mit 100 mL Wasser gewaschen, gefiltert (STR) und bei 4 °C gelagert bis zur nächsten Anwendung.

Zur Analyse der Produktfällungseffizienz wurde der Einfluss von verschiedenen Salzsäure-Konzentrationen auf die Naproxen-Fällungseffizienz untersucht. Hierfür wurden zu 1 mL einer 105 mM Naproxen Lösung (pH 9,0) 200 µL Salzsäure mit verschiedenen Konzentrationen gegeben (0,25 M bis 10 M). Anschließend wurde die Lösung mittels Vortexen gemischt und zentrifugiert (30 min, RT und 12,100 × g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels HPLC auf die verbleibende Naproxen Konzentration untersucht.

Nach der Umsetzung der Naproxenmalonsäure zu Naproxen in den präparativen Ansätzen wurde die Produktlösung durch dekantieren von dem Träger separiert. Das verbleibende Produkt, an und innerhalb des porösen Materials, wurde mit 100 mL Wasser herausgewaschen. Die Naproxen enthaltene Waschlösung wurde zu der anderen Produkt-Lösung gegeben (pH Bereich 8,3 bis 8,6). Die 200 mL aufgefangene Naproxenlösung (>99,7 % Umsetzung zu Naproxen) wurden mit 40 mL einer 6 M Salzsäure Lösung versetzt (Endkonzentration 1 M Salzsäure). Hierbei wurde das lösliche Natriumsalz des Naproxen in die schwer wasserlösliche freie Säure überführt. Das ausgefallene Naproxen wurde von der Lösung mit einem Filterpapier (Machery-Nagel, Typ 640 d) über einen Büchner Trichter mit einer Vakuum Pumpe getrennt. Das Präzipitat wurde anschließend mit Salzsäure nachgewaschen (100 mL, 1 M) und in einem Vakuum Ofen getrocknet (45 °C, 8 h). Das weiße kristalline Produkt wurde anschließend quantifiziert und die Qualität in Hinsicht auf die Enantiomerenreinheit mittels chiraler GC analysiert und Produktreinheit mittels ¹H NMR untersucht.

6 Anhang

Die Peaks im Spektrum konnten den Protonen des Naproxen folgendermaßen zugeordnet werden:

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.76 – 7.65 (m, 3H), 7.40 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H).

Folgenden Verunreinigungen konnten zugeordnet werden:

[4.89 (s, H_2O), 3.35 (m, CH_3OH), 2.68 (s, 0.002 H) 1.99 (s, 0.09 H), 1.27 (s, 0.03 H, Weichmacher)]

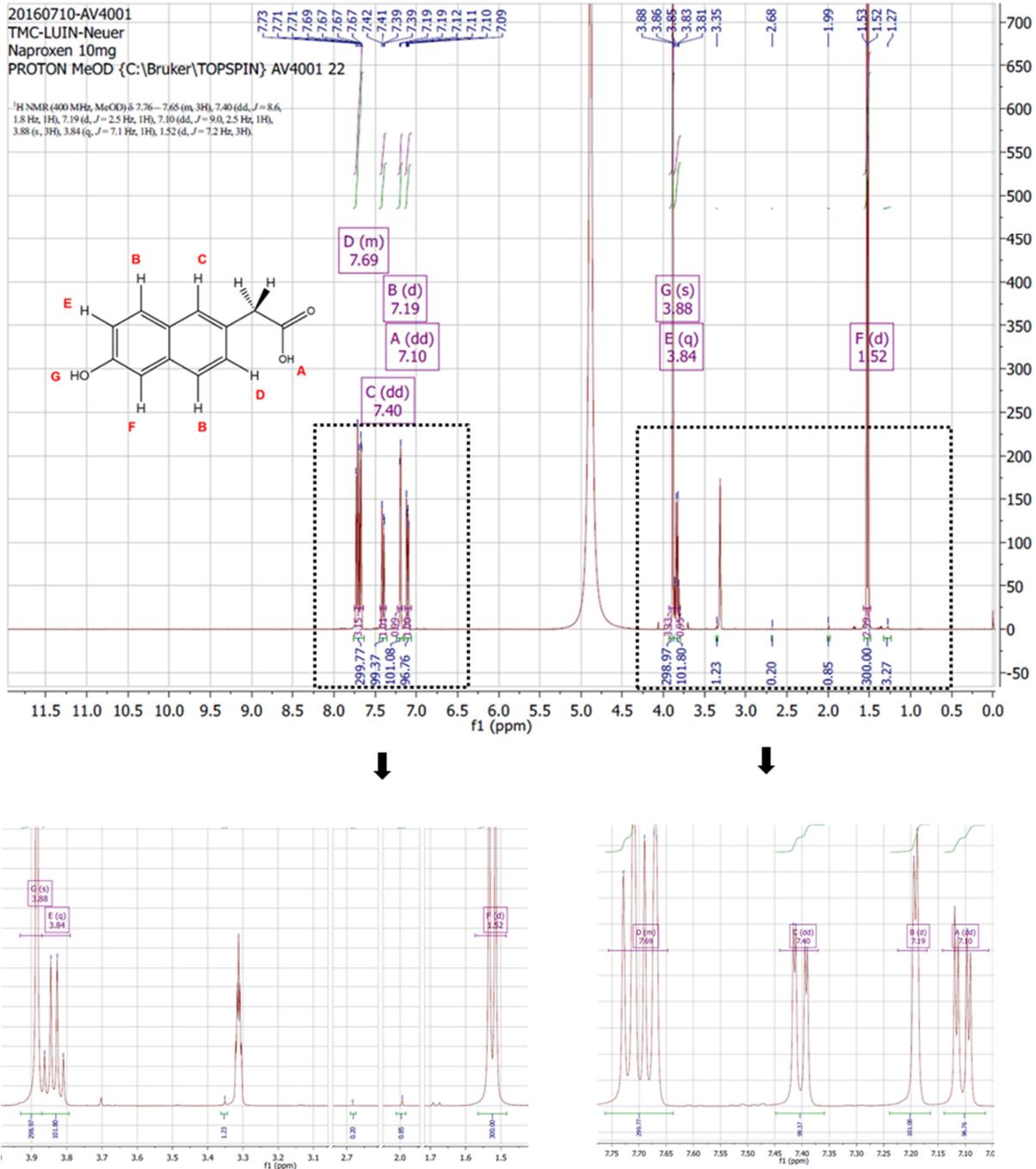


Abbildung 72: ^1H NMR Spektrum des (S)-Naproxen.

Tabelle 22: Daten der verwendeten AMDasen in dieser Arbeit (ProtParam Tool, ExPasy).

	Wildtyp-AMDase	AMDase-CLGIPL-Mutante (G74C/M159L/C188G/V43I/A125P/V156L)
Sequenz (252 Aminosäuren)	MGQMQQASTP TIGMIVPPAA GLVPADGARL YPDLPFIASG LGLGSVTPEG YDAVIESVVD HARRLQKQGA AVVSLMGTSL SFYRGAAFNA ALTVAMREAT GLPCTTMSTA VLNGLRALGV RRVALATAYI DDVNERLAAF LAEESLVPTG CRSLGITGVE AMARVDTATL VDLCVRAFEA APDSDGILLS CGLLTLDAI PEVERRLGVP VVSSSPAGFW DAVRLAGGGA KARPGYGRLF DESGGSHHHH HH	MGQMQQASTP TIGMIVPPAA GLVPADGARL YPDLPFIASG LGLGSITPEG YDAVIESVVD HARRLQKQGA AVVSLMCTSL SFYRGAAFNA ALTVAMREAT GLPCTTMSTA VLNGLRALGV RRVALATPYI DDVNERLAAF LAEESLVPTG CRSLGITGLE ALARVDTATL VDLCVRAFEA APDSDGILLS GGGLLTLDAI PEVERRLGVP VVSSSPAGFW DAVRLAGGGA KARPGYGRLF DESGGSHHHH HH
Molekulargewicht (Da [g/mol])	26075,83	26111,89
Theoretischer pI	5,77	5,77
Aminosäure Zusammensetzung	Ala (A) 36 14,3% Arg (R) 17 6,7% Asn (N) 3 1,2% Asp (D) 13 5,2% Cys (C) 4 1,6% Gln (Q) 5 2,0% Glu (E) 11 4,4% Gly (G) 29 11,5% His (H) 7 2,8% Ile (I) 8 3,2% Leu (L) 28 11,1% Lys (K) 2 0,8% Met (M) 7 2,8% Phe (F) 7 2,8% Pro (P) 14 5,6% Ser (S) 17 6,7% Thr (T) 15 6,0% Trp (W) 1 0,4% Tyr (Y) 5 2,0% Val (V) 23 9,1% Pyl (O) 0 0,0% Sec (U) 0 0,0%	Ala (A) 35 13,9% Arg (R) 17 6,7% Asn (N) 3 1,2% Asp (D) 13 5,2% Cys (C) 4 1,6% Gln (Q) 5 2,0% Glu (E) 11 4,4% Gly (G) 29 11,5% His (H) 7 2,8% Ile (I) 9 3,6% Leu (L) 30 11,9% Lys (K) 2 0,8% Met (M) 6 2,4% Phe (F) 7 2,8% Pro (P) 15 6,0% Ser (S) 17 6,7% Thr (T) 15 6,0% Trp (W) 1 0,4% Tyr (Y) 5 2,0% Val (V) 21 8,3% Pyl (O) 0 0,0% Sec (U) 0 0,0%
Negative geladene Reste Positiv geladener Reste	(Asp + Glu): 24 (Arg + Lys): 19	(Asp + Glu): 24 (Arg + Lys): 19
Instabilitätsindex (II)	43,20 (unstabil)	43,87(unstabil)
Aliphatischer Index	96,47	98,41
Hydrophobizität (GRAVY)	0,248	0,242

7 Literatur

- Adams, S.S., Bough, R.G., Cliffe, E.E., Lessel, B. & Mills, R.F.N. 1969. Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen. *Toxicology and applied pharmacology (Toxicol. appl. Pharm.)* **15**, 310–330.
- Adams, S.S., Cliffe, E.E., Lessel, B. & Nicholson, J.S. 1963. Some Biological Properties of 'Ibufenac', a New Anti-rheumatic Drug. *Nature* **200**, 271–272.
- Ahumada, K., Urrutia, P., Illanes, A. & Wilson, L. 2015. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. *Food Bioprod. Proc.* **94**, 555–560.
- Aksoy, S., Tumturk, H. & Hasirci, N. 1998. Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of biotechnology* **60**, 37–46.
- Andrić, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A. & Dam-Johansen, K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology Advances* **28**, 407–425.
- Asgher, M., Noreen, S. & Bilal, M. 2017. Enhancing catalytic functionality of Trametes versicolor IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres. *Chemical Engineering Research and Design* **119**, 1–11.
- Aßmann, M., Mügge, C., Gaßmeyer, S.K., Enoki, J., Hilterhaus, L., Kourist, R., Liese, A. & Kara, S. 2017a. Improvement of the Process Stability of Arylmalonate Decarboxylase by Immobilization for Biocatalytic Profen Synthesis. *Front. Microbiol.* **8**, 1–8.
- Aßmann, M., Stöbener, A., Mügge, C., Gaßmeyer, S.K., Hilterhaus, L., Kourist, R., Liese, A. & Kara, S. 2017b. Reaction engineering of biocatalytic (S)-naproxen synthesis integrating in-line process monitoring by Raman spectroscopy. *React. Chem. Eng.* **2**, 531–540.
- Aymard, C. & Abia, B. 2000. Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enzyme Microb. Tech.* **27**, 612–618.
- Bakeev, K.A. 2005. Process analytical technology. Blackwell publishing, Oxford.
- Bayne, L., Ulijn, R.V. & Halling, P.J. 2013. Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 9000–9010.
- Beer, T. de, Burggraeve, A., Fonteyne, M., Saerens, L., Remon, J.P. & Vervaet, C. 2011. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *Int. J. Pharm.* **417**, 32–47.
- Behr, D., Clarke, E.E., Wrigley, J.D.J., Martin, A.C.L., Nadin, A., Churcher, I. & Shearman, M.S. 2004. Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target gamma-secretase at a novel site. Evidence for an allosteric mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 43419–43426.

- Bozzini, T., Botta, G., Delfino, M., Onofri, S., Saladino, R., Amatore, D., Sgarbanti, R., Nencioni, L. & Palamara, A.T. 2013. Tyrosinase and Layer-by-Layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity. *Bioorgan. Med. Chem.* **21**, 7699–7708.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Chmiel, H. 2011. Bioprozesstechnik. Springer Spektrum.
- Daniel, R.M. & Danson, M.J. 2013. Temperature and the catalytic activity of enzymes: a fresh understanding. *FEBS Lett.* **587**, 2738–2743.
- Datta, S., Christena, L.R. & Rajaram, Y.R.S. 2013. Enzyme immobilization. An overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **3**, 1–9.
- Engelmark Cassimjee, K., Kadow, M., Wikmark, Y., Svedendahl Humble, M., Rothstein, M.L., Rothstein, D.M. & Bäckvall, J.-E. 2014. A general protein purification and immobilization method on controlled porosity glass: biocatalytic applications. *Chem. Commun.* **50**, 9134–9137.
- Fini, A., Fazio, G. & Feroci, G. 1995. Solubility and solubilization properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Int. J. Pharm.* **126**, 95–102.
- Freeman, A., Woodley, J.M. & Lilly, M.D. 1993. In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Nat. Biotechnol.* **11**, 1007–1012.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, ?n., Fernandez-Lafuente, R. & Rodrigues, R.C. 2011. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2885–2904.
- Garg, N. & Kumar, A. 2008. Immobilization of starch phosphorylase from cabbage leaves: Production of glucose-1-phosphate. *Braz. J. Chem. Eng.* **25**, 229–.
- Gaßmeyer, S.K. 2015. Protein-Engineering und synthetische Anwendung der Arylmalonat-Decarboxylase aus *Bordetella bronchiseptica*.
- Gaßmeyer, S.K., Wetzig, J., Mügge, C., Aßmann, M., Enoki, J., Hilterhaus, L., Zuhse, R., Miyamoto, K., Liese, A. & Kourist, R. 2016. Arylmalonate decarboxylase-catalyzed asymmetric synthesis of both enantiomers of optically pure flurbiprofen. *ChemCatChem* **8**, 916–921.
- Gebhard, J., Sellin, D., Hilterhaus, L. & Liese, A. 2013. Online-Analyse von enzymatischen Polykondensationsreaktionen in Blasensäulenreaktoren mittels ATR-FTIR-Spektroskopie. *Chem. Ing. Tech.* **85**, 1016–1022.
- Guisan, J.M. 2006. Immobilization of enzymes. Humana Press Inc., New Jersey.

- Guruprsad, K., Reddy, B.V.B. & Pandit, M.W. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.* **4**, 155–161.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. & Magner, E. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 453–468.
- Hilterhaus, L., Thum, O. & Liese, A. 2008. Reactor Concept for Lipase-Catalyzed Solvent-Free Conversion of Highly Viscous Reactants Forming Two-Phase Systems. *Org. Process Res. Dev.* **12**, 618–625.
- Homaei, A.A., Sajedi, R.H., Sariri, R., Seyfzadeh, S. & Stevanato, R. 2010. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino acids* **38**, 937–942.
- Ijima, Y., Matoishi, K., Terao, Y., Doi, N., Yanagawa, H. & Ohta, H. 2005. Inversion of enantioselectivity of asymmetric biocatalytic decarboxylation by site-directed mutagenesis based on the reaction mechanism. *Chem. Commun.*, 877–879.
- Ikai, A. 1980. Thermostability and Aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.* **88**, 1895–1898.
- Imbimbo, B.P. 2009. Why did tarenflurbil fail in Alzheimer's disease? *J. Alzheimers Dis.* **17**, 757–760.
- Iyer, P.V. & Ananthanarayan, L. 2008. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* **43**, 1019–1032.
- Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H.B. & Bejar, S. 2016. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 246–258.
- Kahar, U.M., Sani, M.H., Chan, K.-G. & Goh, K.M. 2016. Immobilization of α -Amylase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 on ReliZyme and Immobead Supports. *Molecules* **21**.
- Kara, S., Mueller, J.J. & Liese, L. 2011. Online analysis methods for monitoring of bioprocesses. *Chim. Oggi.* **29**, 38–41.
- Klibanov, A.M. 1983. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* **219**, 722–727.
- Kourist, R., Domínguez de María, P. & Miyamoto, K. 2011. Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens – recent trends and developments. *Green. Chem.* **13**, 2607–2618.
- Lee, L.G. & Whitesides, G.M. 1986. Preparation of Optically Active 1,2-Diols and α -Hydroxy Ketones Using Glycerol Dehydrogenase as Catalyst: Limits to Enzyme-Catalyzed Synthesis due to Noncompetitive and Mixed Inhibition by Product. *J. Org. Chem.* **51**, 25–36.
- Lewin, R., Goodall, M., Thompson, M.L., Leigh, J., Breuer, M., Baldenius, K. & Micklefield, J. 2015. Enzymatic enantioselective decarboxylative protonation of heteroaryl malonates. *Chem. Eur. J.* **21**, 6557–6563.

- Liese, A. & Hilterhaus, L. 2013. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev* **42**, 6236–6249.
- Liese, A., Karutz, M., Kamphuis, J., Wandrey, C. & Kragl, U. 1996. Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: Overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 544–550.
- Lind, M.E.S. & Himo, F. 2014. Theoretical study of reaction mechanism and stereoselectivity of arylmalonate decarboxylase. *ACS Catal.* **4**, 4153–4160.
- Liu, R. 2000. Water-Insoluble Drug Formulaton. Internpharm/CRC Press, Florida.
- Longo, M.A. & Combes, D. 1997. Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J. Biotechnol.* **58**, 21–32.
- Maimanakos, J., Chow, J., Gassmeyer, S.K., Gullert, S., Busch, F., Kourist, R. & Streit, W.R. 2016. Sequence-Based Screening for Rare Enzymes: New Insights into the World of AMDases Reveal a Conserved Motif and 58 Novel Enzymes Clustering in Eight Distinct Families. *Front. Microbiol.* **7**, 1–14.
- Mallin, H., Muschiol, J., Byström, E. & Bornscheuer, U.T. 2013. Efficient Biocatalysis with Immobilized Enzymes or Encapsulated Whole Cell Microorganism by using the SpinChem Reactor System. *ChemCatChem* **5**, 3529–3532.
- Mateo, C., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R. & Guisan, J.M. 2007. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochem. Soc. T.* **35**, 1593–1601.
- Matoishi, K., Ueda, M., Miyamoto, K. & Ohta, H. 2004. Mechanism of asymmetric decarboxylation of α -aryl- α -methylmalonate catalyzed by arylmalonate decarboxylase originated from *Alcaligenes bronchisepticus*. *J. mol. catal. B-enzym.* **27**, 161–168.
- Mazlan, S.Z. & Hanifah, S.A. 2017. Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres. *Int. J. Polym. Sci.* **2017**, 1–8.
- Michaelis, L. & Menten, M.M. 1913. Die Kinetik der Invertin-Wirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333–369.
- Miyamoto, K. & Kourist, R. 2016. Arylmalonate decarboxylase-a highly selective bacterial biocatalyst with unknown function. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 8621–8631.
- Miyamoto, K. & Ohta, H. 1991. Asymmetric decarboxylation of disubstituted malonic acid by *alcaligenes bronchisepticus* KU 1201. *Biocatalysis* **5**, 49–60.
- Miyamoto, K. & Ohta, H. 1992a. Cloning and heterologous expression of a novel arylmalonate decarboxylase gene from *Alcaligenes bronchisepticus* KU 1201. *Appl. Microbiol. and Biotech.*, 234–238.
- Miyamoto, K. & Ohta, H. 1992b. Purification and properties of a novel arylmalonate decarboxylase from *Alcaligenes bronchisepticus* KU 1201. *Eur. J. Biochem.* **210**, 475–481.

- Miyamoto, K., Ohta, H. & Osamura, Y. 1994. Effect of conformation of the substrate on enzymatic decarboxylation of α -arylmalonic acid. *Bioorgan. Med. Chem.* **2**, 469–475.
- Miyamoto, K., Tsuchiya, S. & Ohta, H. 1992. Microbial asymmetric decarboxylation of fluorine-containing arylmalonic acid derivatives. *J. Fluorine Chem.* **59**, 225–232.
- Miyamoto, K., Yatake, Y., Tamura, K., Terao, Y. & Ohta, H. 2007. Purification and characterization of arylmalonate decarboxylase from *Achromobacter* sp. KU1311. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 263–267.
- Miyamoto K. & Ohta H. 1990. Enzyme-mediated asymmetric decarboxylation of disubstituted malonic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 4077–4078.
- Miyauchi, Y., Kourist, R., Uemura, D. & Miyamoto, K. 2011. Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution. *Chem. Commun.* **47**, 7503–7505.
- Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N. & Arnold, F.H. 2000. Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* **297**, 1015–1026.
- Miyazaki, M., Kakidani, H., Hanzawa, S. & Ohta, H. 1997. Cysteine188 revealed as being critical for the enzyme activity of arylmalonate decarboxylase by site-directed mutagenesis. *Biol. Chem. Soc. Jpn.* **70**, 2765–2769.
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F. & Wahab, R.A. 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. biotec. eq.* **29**, 205–220.
- Morley, K.L. & Kazlauskas, R.J. 2005. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* **23**, 231–237.
- Mueller, J.J., Baum, S., Hilterhaus, L., Eckstein, M., Thum, O. & Liese, A. 2011. Simultaneous determination of mono-, di-, and triglycerides in multiphase systems by online Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* **83**, 9321–9327.
- Nicholson, J.S. & Adams, S.S. 1961. Compositions and methods for treating symptoms of inflammation, pain and fever.
- Nicholson, J.S. & Adams, S.S. 1963. Phenyl propionic acids.
- Obata, R. & Nakasako, M. 2010. Structural basis for inverting the enantioselectivity of arylmalonate decarboxylase revealed by the structural analysis of the Gly74Cys/Cys188Ser mutant in the liganded form. *Biochemistry* **49**, 1963–1969.
- Okrasa, K., Levy, C., Hauer, B., Baudendistel, N., Leys, D. & Micklefield, J. 2008. Structure and mechanism of an unusual malonate decarboxylase and related racemases. *Chem. Eur. J.* **14**, 6609–6613.

- Okrasa, K., Levy, C., Wilding, M., Goodall, M., Baudendistel, N., Hauer, B., Leys, D. & Micklefield, J. 2009. Structure-guided directed evolution of alkenyl and arylmalonate decarboxylases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7691–7694.
- Pereira, E.B., Zanin, G.M. & Castro, H.F. 2003. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Braz. J. Chem. Eng.* **20**, 343–355.
- Petrenz, A., María, P.D.d., Ramanathan, A., Hanefeld, U., Ansorge-Schumacher, M.B. & Kara, S. 2015. Medium and reaction engineering for the establishment of a chemo-enzymatic dynamic kinetic resolution of rac-benzoin in batch and continuous mode. *J. mol. catal. B-enzym.* **114**, 42–49.
- Polizzi, K.M., Bommarius, A.S., Broering, J.M. & Chaparro-Riggers, J.F. 2007. Stability of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 220–225.
- Pollard, D.J. & Woodley, J.M. 2007. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* **25**, 66–73.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P. & Mattanovich, D. 2005. Recombinant Protein Production in Yeasts. *Mol. Biotechnol.* **31**, 245–260.
- Rao, P.P.N. & Knaus, E. 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharma. Sci.* **11**, 81s-110s.
- Reichel, C., Brugger, R., Bang, H., Geissinger, G. & Brune, K. 1996. Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzym A epimerase: A key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. *Mol. Pharmacol.* **51**, 576–582.
- Ringborg, R.H. & Woodley, J.M. 2016. The application of reaction engineering to biocatalysis. *React. Chem. Eng.* **1**, 10–22.
- Rodriguez, J., Soria, F., Geronazzo, H. & Destefanis, H. 2014. α -Amylase *Aspergillus oryzae* Immobilized on Modified Expanded Perlite. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **12**, 587–596.
- Rogers, T.A. & Bommarius, A.S. 2010. Utilizing Simple Biochemical Measurements to Predict Lifetime Output of Biocatalysts in Continuous Isothermal Processes. *Chem. Eng. Sci.* **65**, 2118–2124.
- Royter, M., Schmidt, M., Elend, C., Hobenreich, H., Schafer, T., Bornscheuer, U.T. & Antranikian, G. 2009. Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. *Extremophiles* **13**, 769–783.
- Sardar, M., Roy, I. & Gupta, M.N. 2003. A smart bioconjugate of alginate and pectinase with unusual biological activity toward chitosan. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1654–1658.
- Sarrouh, B. 2012. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *J. Bioprocess Biotechniq.*, 1–10.

- Savjani, K.T., Gajjar, A.K. & Savjani, J.K. 2012. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharma*. **2012**, 195727.
- Seabra, I.J. & Gil, M.H. 2007. Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical applications. *Braz. J. Pharm. Sci.* **43**, 535–542.
- Shaw, L.R., Irwin, W.J., Grattan, T.J. & Conway, B.R. 2005. The effect of selected water-soluble excipients on the dissolution of paracetamol and Ibuprofen. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **31**, 515–525.
- Sheldon, R.A. 2007. The E Factor. Fifteen years on. *Green Chem.* **9**, 1261–1384.
- Sheldon, R.A. & van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6223–6235.
- Shi, L.-E., Yi, Y., Tang, Z.-X., Xiong, W.-Y., Mei, J.-F. & Ying, G.-Q. 2010. Nuclease p1 immobilized on deae cellulose. *Braz. J. Chem. Eng.* **27**, 31–39.
- Simons, J.R., Mosisch, M., Torda, A.E. & Hilterhaus, L. 2013. Site directed immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase via thiol-disulfide interchange: influence on catalytic activity of cysteines introduced at different positions. *J. Biotechnol.* **167**, 1–7.
- Soltanpour, S. & Jouyban, A. 2010. Solubility of Acetaminophen and Ibuprofen in Binary and Ternary Mixtures of Polyethylene Glycol 600, Ethanol and Water. *Chem. Pharm. Bull.* **58**, 219–224.
- Straathof, A.J., Panke, S. & Schmid, A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 548–556.
- Tamura, K., Terao, Y., Miyamoto, K. & Ohta, H. 2009. Asymmetric decarboxylation of α -hydroxy- and α -amino- α -phenylmalonate catalyzed by arylmalonate decarboxylase from *Alcaligenes bronchisepticus*. *Biocatal. Biotransfor.* **26**, 253–257.
- Terao, Y., Ijima, Y., Kakidani, H. & Ohta, H. 2003. Enzymatic Synthesis of (R)-Flurbiprofen. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **76**, 2395–2397.
- Terao, Y., Ijima, Y., Miyamoto, K. & Ohta, H. 2007. Inversion of enantioselectivity of arylmalonate decarboxylase via site-directed mutation based on the proposed reaction mechanism. *J. Mol. Catal. B-Enzym* **45**, 15–20.
- Terao, Y., Miyamoto, K. & Ohta, H. 2006a. Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis. *App. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 647–653.
- Terao, Y., Miyamoto, K. & Ohta, H. 2006b. Introduction of single mutation changes arylmalonate decarboxylase to racemase. *Chem. Comm.*, 3600–3602.
- Terpe, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523–533.
- Tischer, W. & Kasche, V. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Tibtech.* **17**, 326–335.

- Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J.S. & Woodley, J.M. 2010. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* **88**, 3–11.
- Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M. & Woodley, J.M. 2011. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org. Process Res. Dev.* **15**, 266–274.
- Ulrich, C.M., Bigler, J. & Potter, J.D. 2006. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 130–140.
- Walker, J.A. 1979. Process for the preparation of hydratropic acids and esters.
- Wohlgemuth, R. 2010. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 283–292.
- Wong, L.S., Okrasa, K. & Micklefield, J. 2010. Site-selective immobilisation of functional enzymes on to polystyrene nanoparticles. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 782–787.
- Woodley, J.M. 2006. Choice of biocatalyst form for scalable processes. *Biochem. Soc. T.* **34**, 301–303.
- Yao, J., Chzen, Q., Zhong, G., Cao, W., Yu, A. & Liu, Y. 2014. Immobilization and Characterization of Tannase from a Metagenomic library and its use for removal of tannins from green tea infusion. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 80–86.
- Yoshida, S., Enoki, J., Hemmi, R., Kourist, R., Kawakami, N. & Miyamoto, K. 2015a. Draft Genome Sequence of *Bordetella bronchiseptica* KU1201, the First Isolation Source of Arylmalonate Decarboxylase. *Genome* **3**, 1.
- Yoshida, S., Enoki, J., Kourist, R. & Miyamoto, K. 2015b. Engineered hydrophobic pocket of (S)-selective arylmalonate decarboxylase variant by simultaneous saturation mutagenesis to improve catalytic performance. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **79**, 1965–1971.
- Zhu, J., Zhang, J., Lai, Q., Jiang, B. & Gong, R. 2013. Covalent Immobilization of Lipase onto Citric Acid-Esterified Loofah Sponge. *BioResources* **8**, 3289–3298.
- Zor, T. & Selinger, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302–308.

Publikationsliste:

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

Reaction engineering of biocatalytic (S)-naproxen synthesis integrating in-line process monitoring by Raman spectroscopy

M. Aßmann, A. Stöbener, C. Mügge, S. Gaßmeyer, L. Hilterhaus, R. Kourist, A. Liese and S. Kara

Reaction Chemistry & Engineering, 2017, 2:531–540

Improvement of the process stability of arylmalonate decarboxylase by immobilization for biocatalytic profen synthesis

M. Aßmann, C. Mügge, S. Gaßmeyer, J. Enoki, L. Hilterhaus, R. Kourist, A. Liese and S. Kara

Frontiers in Microbiology, 2017, 8:448

Arylmalonate decarboxylase-catalyzed asymmetric synthesis of both enantiomers of optically pure flurbiprofen

S. Gaßmeyer, J. Wetzig, C. Mügge, M. Assmann, J. Enoki, L. Hilterhaus, R. Zuhse, K. Miyamoto, A. Liese and R. Kourist

ChemCatChem, 2015, 8: 916–921

Posterpräsentationen:

Environmentally Friendly Synthesis of Profens by AMDase

M. Aßmann, S. Gaßmeyer, R. Kourist, A. Liese

7th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, 2014

Optimization of AMDase Catalyzed Profene Synthesis

M. Aßmann, S. Gaßmeyer, R. Kourist, A. Liese

Himmelfahrtstagung, Hamburg, 2015

Stabilization of Arylmalonate Decarboxylase Catalyzed Synthesis of Profenes

M. Aßmann, S. Gaßmeyer, R. Kourist, A. Liese

FSP „Integrierte Biotechnologie und Prozesstechnik“, Hamburg, 15.12.2014

AMDase Recycling in the Biocatalytic Profene Production

M. Aßmann, S. Gaßmeyer, R. Kourist, A. Liese

FSP „Integrierte Biotechnologie und Prozesstechnik“, Hamburg, 17.02.2016

Mündliche Präsentation:

Environmentally Friendly Synthesis of Optically Pure Profenes

FSP „Integrierte Biotechnologie und Prozesstechnik“, Hamburg, 14.01.2016

Lebenslauf

Persönliches

Name Aßmann
Vorname Miriam Catherine
Geburtstag September 1983
Geburtsort Lüdenscheid, Deutschland

07.1994 – 05.2003 **Adolf-Reichwein Gesamtschule Lüdenscheid**

Schulbildung: Abitur

10.2004 – 09.2010 **Technischen Universität Dortmund**

Bachelorstudium der Chemischen Biologie

10.2010 – 12.2012 **Technischen Universität Dortmund**

Masterstudium der Chemischen Biologie

07.2013 – 06.2016 **Technische Universität Hamburg-Harburg**

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

07.2013 – 11.2018 **Technische Universität Hamburg-Harburg**

Doktorarbeit