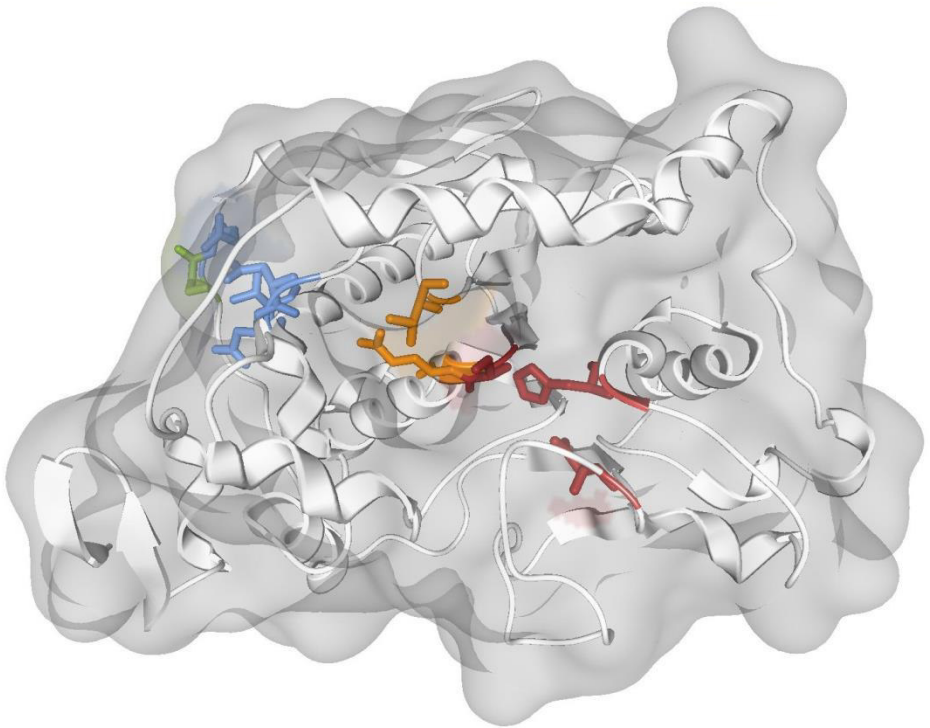


# Modellierung der *Candida antarctica* Lipase B unter nicht-natürlichen Bedingungen



**Tobias Kulschewski**

Institut für Technische Biochemie – Universität Stuttgart



# **Modellierung der *Candida antarctica* Lipase B unter nicht-natürlichen Bedingungen**

Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte  
Abhandlung

Vorgelegt von  
Tobias Kulschewski  
aus Bietigheim-Bissingen

Vorsitzender:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Hauptberichter:	Prof. Dr. Jürgen Pleiss
Mitberichter:	Prof. Dr.-Ing. Joachim Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 2015

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2015

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.  
Alle verwendeten Hilfsmittel und Literatur sind angegeben.

Stuttgart, April 2015

Tobias Kulschewski

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Bernhard Hauer für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Meinem Betreuer, Herrn Professor Jürgen Pleiss, danke ich für die gute Unterstützung dieser Arbeit, für zahlreiche Diskussionen, Anregungen und interessante Projekte.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Joachim Groß, der im Rahmen des SFB716 die Zweitbetreuung dieser Doktorarbeit übernommen hat und mir bei sämtlichen thermodynamischen Problemen stets hilfreich zur Seite stand. Ich danke Herrn M. Sc. Gernot Bauer und Frau Dipl.-Ing. Andrea Hemmen für die gute Zusammenarbeit.

Ferner danke ich Frau Professor Marina Lotti, Herrn Dr. Francesco Secundo und Herrn Dr. Francesco Sasso für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit, die interessanten und anregenden Diskussionen und vor allem für die Experimente, die am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano durchgeführt wurden und die die Vergleichspunkte zu meinen Simulationen darstellten.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen aus dem Sonderforschungsbereich 716, vor allem Herrn Dipl. Inf. Michael Krone und Frau Dipl. Inf. Katrin Scharnowski, für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Diskussionen und die Unterstützung bei zahlreichen Problemen.

Ich danke Frau Dipl. Biol. (t.o.) Meike Hutt für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Bei meinen Kollegen am Institut bedanke ich mich für die gute Atmosphäre und das hervorragende Arbeitsklima.

Abschließend danke ich dem Sonderforschungsbereich 716 für die Finanzierung dieser Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	14
1.1. Enzyme in organischen Lösungsmitteln .....	14
1.2. Lipasen .....	16
1.2.1. <i>Candida antarctica</i> Lipase B (CALB).....	16
1.3. Molekulardynamische Simulation von Proteinen und Lösungsmitteln .....	19
1.4. Molekulardynamische Simulation von organischen Lösungsmitteln .....	22
1.4.1. Molekulardynamische Simulation von Alkoholen .....	22
1.4.2. Molekulardynamische Simulation von grünen Lösungsmitteln .....	25
1.5. Die Rolle des Lösungsmittels .....	26
1.6. Simulation der Proteinstruktur und -flexibilität in organischen Lösungsmitteln.....	28
1.7. Simulation der katalytischen Aktivität und Enantioselektivität.....	31
1.8. Modellierung des molekularen Mechanismus der Deaktivierung .....	33
1.9. Der Effekt thermodynamischer Eigenschaften von Lösungsmittelgemischen .....	37
1.10. Simulation von lösungsmittelinduzierten Konformationsübergängen.....	39
1.11. Wasserbindung an Proteine in organischen Lösungsmittelgemischen .....	41
2. Ergebnisse .....	44
2.1. Molekulardynamische Simulation von Lösungsmitteln .....	44
2.1.1. Molekulardynamische Simulation von aliphatischen Alkoholen .....	44
2.1.1.1. Vergleich des OPLS <i>all-atom</i> - und <i>united-atom</i> -Kraftfelds .....	48
2.1.1.2. Modifizierung der Partialladungen .....	52
2.1.1.3. Optimierung des Glycerolmodells .....	56
2.1.1.4. Temperaturabhängigkeit der Dichte und des Selbstdiffusionskoeffizienten .....	58
2.1.2. Molekulardynamische Simulation von weiteren Lösungsmitteln.....	62
2.1.2.1. Grüne Lösungsmittel.....	62

2.1.2.2. Alkane .....	62
2.1.2.3. Vinylacetat .....	64
2.1.2.4. Toluol .....	64
2.2. Inaktivierung von CALB durch Methanol .....	67
2.2.1. Methanolkonzentration und katalytische Aktivität .....	67
2.2.2. Modellierung der ternären Mischungen aus Methanol, Vinylacetat und Toluol .....	70
2.2.3. Modellierung der Enzymkinetik .....	72
2.2.4. Molekulardynamische Simulation von CALB in ternären Mischungen.....	76
2.3. Unterschiedliche Effekte von Methanol und Ethanol auf die von CALB katalysierte Alkohololyse	77
2.3.1. Kinetik der Alkohololyse .....	77
2.3.2. Inaktivierung von CALB durch Methanol und Ethanol.....	78
2.3.3. Modellierung der Mischungen .....	84
2.3.4. Mischungen aus Alkohol (Methanol bzw. Ethanol), Vinylacetat und Toluol .....	85
2.3.5. Modellierung der Reaktionsgeschwindigkeit.....	89
2.3.6. Methanol als Substrat.....	90
2.3.7. Ethanol als Substrat.....	90
2.3.8. Molekulardynamische Simulation von CALB in Mischungen.....	91
2.4. Bindung von Wasser, Methanol und Ethanol an CALB .....	92
2.4.1. Simulation von CALB in Reinstoffen.....	92
2.4.1.1. Bindung an das gesamte Protein .....	92
2.4.1.2. Bindung an die Bindestelle von CALB.....	94
2.4.2. Simulation von CALB in binären Mischungen.....	96
2.4.2.1. Simulation von CALB in binären Mischungen aus Wasser und Methanol bzw. Wasser und Ethanol .....	96
2.4.2.2. Simulation von CALB in binären Mischungen aus Wasser und Toluol.....	101
2.4.3. Simulation von CALB in ternären Mischungen .....	103

2.4.3.1. Bindung von Methanol an CALB in ternären Mischungen .....	106
2.4.3.2. Bindung von Ethanol an CALB in ternären Mischungen .....	108
2.4.3.3. Bindung von Wasser an CALB in ternären Mischungen.....	110
2.4.3.4. Bindung von Toluol an CALB in ternären Mischungen.....	113
3. Diskussion.....	115
3.1. Simulation und Optimierung von organischen Lösungsmitteln.....	115
3.1.1. Dichte, Diffusion und Partialladungen.....	115
3.1.2. Partialladungen in Mono-, Di- und Trialkoholen.....	117
3.1.3. Systemgröße und Equilibrierungszeit .....	120
3.2. Inaktivierung von CALB .....	121
3.2.1. Inaktivierung von CALB durch Alkohole .....	122
3.2.2. Unterschiede zwischen Methanol und Ethanol.....	125
3.2.2.1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkoholkonzentration .....	127
3.2.3. Zusammenfassung.....	129
3.3. Bindung von Wasser, Methanol, Ethanol und Toluol an das Enzym .....	131
3.3.1. Bindung von Wasser an das Enzym.....	133
3.3.2. Bindung von Methanol und Ethanol an CALB.....	135
4. Material und Methoden.....	136
4.1. Simulation von organischen Lösungsmitteln.....	136
4.1.1. Aufsetzen der Lösungsmittelsysteme.....	136
4.1.2. Minimierung und Equilibrierung .....	137
4.1.3. Simulation und Auswertung.....	137
4.2. Modellierung von CALB in organischen Lösungsmitteln .....	138
4.2.1. Berechnung der thermodynamischen Aktivitäten.....	138
4.2.2. Modellierung der Enzymkinetik .....	139
4.2.3. Molekulardynamische Simulation .....	140



4.3. Experimentelle Methoden .....	143
4.3.1. Materialien .....	143
4.3.2. Alkoholyse und Analyse mittels Gaschromatographie .....	144
4.3.3. Effekte von Methanol und Ethanol auf die Aktivität von CALB .....	145
5. Anhang .....	146
6. Literatur .....	166

## Abkürzungen

Å	Ångström; 0,1 nm
BPTI	<i>bovine pancreatic trypsin inhibitors</i>
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
EtOH	Ethanol
GROMACS	<i>GRO</i> ningen <i>MA</i> chine for <i>C</i> hemical <i>S</i> imulations
kDa	Kilodalton
logP	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
m	Meter
MeOH	Methanol
MC	Monte-Carlo
MD	Molekulardynamisch
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> ; Kernspinresonanz
OPLS	<i>Optimized potentials for liquid simulations</i>
ps	Picosekunde
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> ; Mittlere quadratische Abweichung
SASA	<i>Solvent accessible surface area</i>
SPC/E	<i>Simple point charge extended</i> Wassermodell
TIP	<i>Transferable intermolecular potential functions</i>

## Zusammenfassung

*Candida antarctica* Lipase B (CALB) ist ein für die Biokatalyse wichtiges Enzym, das für die Herstellung von Emulgatoren, Körperpflegeprodukten, Kosmetikartikeln, Geschmacksstoffen und Medikamenten verwendet wird. Allerdings wird diese Lipase durch einige organische Lösungsmittel wie z. B. Methanol bereits bei geringen Konzentrationen inaktiviert, während sie bei deutlich höheren Konzentrationen anderer organischer Lösungsmittel wie z. B. Ethanol noch aktiv ist. Dies ist ein Problem bei Reaktionen, bei denen Methanol als Substrat dient und in hohen Konzentrationen zugegeben wird.

Im Zuge dieser Arbeit sollte der Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf CALB sowie die Inaktivierung und der zugrunde liegende Mechanismus durch molekulardynamische Simulationen untersucht werden. Dies wurde in mehreren Schritten gelöst:

Da das Enzym in organischen Lösungsmitteln simuliert werden sollte, mussten zuerst die verfügbaren Lösungsmittelmodelle auf ihre Eignung überprüft werden. Dazu wurden die Lösungsmittel im OPLS *all-atom* Kraftfeld modelliert und bei Temperaturen zwischen 288 und 338 K auf ihre thermodynamischen, strukturellen und dynamischen Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass die simulierte Dichte in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten war, während es beim simulierten Selbstdiffusionskoeffizienten deutliche Abweichungen zum experimentellen Wert gab. Daraufhin wurden die Partialladungen der Modelle angepasst, was dazu führte, dass sich der Selbstdiffusionskoeffizient signifikant verbesserte, während sich die Dichte nur minimal änderte.

Nachdem diese Vorarbeiten abgeschlossen waren, wurde durch molekulardynamische Simulationen sowie experimentelle Untersuchungen der Einfluss von kurzkettigen Alkoholen auf die von CALB katalysierte Alkohololyse von Vinylacetat durch Methanol und Ethanol in Toluol bei niedrigen Wasseraktivitäten untersucht. Die katalytische Aktivität von CALB wurde von Projektpartnern am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano bei einer konstanten Vinylacetatkonzentration von 15,2 % (vol/vol) und unterschiedlichen Alkoholkonzentrationen in Toluol als Lösungsmittel gemessen. Dabei wurde die höchste katalytische Aktivität bei niedrigen Alkoholkonzentrationen von 0,7 % (vol/vol) Methanol und 2 % (vol/vol) Ethanol beobachtet. Mit zunehmenden Alkoholkonzentrationen nahm die katalytische Aktivität von CALB aufgrund von Substratinhibition ab. Die Wasseraktivität wurde zwischen 0,02 und 0,09 variiert

und hatte nur einen minimalen Effekt auf die katalytische Aktivität von CALB. Der molekulare Mechanismus der Inaktivierung des Enzyms durch Methanol und Ethanol wurde untersucht, indem die experimentellen Daten an ein kinetisches Modell gefittet wurden. Durch Annahme eines Ping-Pong-Bi-Bi-Reaktionsmechanismus und der Annahme einer kompetitiven Inhibition von CALB durch den jeweiligen Alkohol, sowie der Verwendung von thermodynamischen Aktivitäten anstelle von Konzentrationen, war es möglich die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von CALB von der Alkoholkonzentration zu modellieren. Für das kinetische Modell wurden für jede der beiden Reaktionen vier Parameter benötigt. Die beiden Bindungskonstanten für Methanol und Ethanol wurden aus den molekulardynamischen Simulationen berechnet. Wenn die Parameter in thermodynamischen Aktivitäten ausgedrückt wurden, waren die Bindungskonstanten für die beiden Alkohole ähnlich. Die beiden weiteren Parameter, die Bindungskonstante von Vinylacetat und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, wurden erhalten, indem die experimentellen Daten an das kinetische Modell gefittet wurden. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der katalytischen Aktivität des Enzyms von dem jeweiligen Alkohol ist eine Folge der thermodynamischen Eigenschaften der Mischung.

Um ein tieferes Verständnis für den molekularen Mechanismus des Einflusses von organischen Lösungsmitteln auf CALB zu gewinnen, wurde der molekulare Mechanismus der Bindung von Wasser, Methanol und Ethanol an CALB untersucht. Dazu wurde CALB mittels molekulardynamischen Simulationen in ternären Lösungsmittelsystemen aus Wasser, Methanol bzw. Ethanol und Toluol untersucht. Der Anteil der mit Wasser bedeckten Proteinoberfläche bei Wasseraktivitäten von nahe eins betrug in den ternären Mischungen 25 - 30 Prozent. Im Gegensatz dazu war die Oberfläche von CALB bei Alkoholaktivitäten von nahe eins fast vollständig mit dem entsprechenden Alkohol bedeckt. Dies ist ebenfalls eine Folge der Nicht-idealität der ternären Mischungen: Eine Eigenschaft dieser Systeme ist, dass nicht alle drei Komponenten ineinander löslich sind: Wasser und Toluol sind schlecht mischbar, während Wasser und die beiden Alkohole sowie die beiden Alkohole und Toluol gut mischbar sind. Die Löslichkeit von Wasser in Toluol nimmt mit zunehmender Alkoholkonzentration zu. Daher ist es unerlässlich, die Thermodynamik hinter den Lösungsmittelmischungen zu verstehen, um ein quantitatives Modell der enzymatischen Aktivität von der Bindung von Wasser und Alkoholen an das Protein in organischen Lösungsmitteln zu erstellen.

## Abstract

Lipases like *Candida antarctica* lipase B (CALB) are important enzymes in biocatalysis and widely used for the preparation of emulsifiers, of personal care and cosmetic products, of flavours and pharmaceuticals. However, they are already inactivated by moderate methanol concentrations, while they are able to tolerate much higher ethanol concentrations. This is problematic, when methanol is used as a substrate in the respective reaction and thus added in high concentrations. To study the effect of organic solvents on CALB as well as the molecular mechanism of the inactivation, molecular dynamics simulations of CALB were performed.

Several steps were necessary to achieve this goal: First the organic solvents which were needed for the simulations were modelled by molecular dynamics simulations at temperatures from 288 K to 338 K using the OPLS all-atom force field. The density, the radial distribution function, the self-diffusion coefficient, and the dielectric constant were evaluated. The OPLS all-atom force field reliably reproduced the experimentally determined density with deviations of less than 4% over the whole temperature range. In contrast, the modelled self-diffusion coefficient deviated from its experimental value by up to 55%. To modify the force field, the partial charges of the functional group were varied by up to 3%. Using the modified OPLS force field, the deviation of the self-diffusion coefficients from their experimental values decreased to less than 19%, while the densities changed by less than 1%.

In the next step the molecular mechanism of the deactivation of the enzyme by methanol and ethanol was investigated by fitting the experimental data to a kinetic model and by molecular dynamics simulations of *C. antarctica* lipase B in toluene-methanol-water and toluene-ethanol-water mixtures. The highest catalytic activity was observed at low alcohol concentrations at 0.7% (v/v) for methanol and 2% (v/v) for ethanol. For higher concentrations, the reaction rate decreased to a level of 74% and 60% of the peak value, respectively, due to substrate inhibition. A variation of water activity in the range 0.02 - 0.09 had only minor effects. These experimental observations are described by a simple kinetic model using three assumptions: (1) a ping-pong bi-bi mechanism of the enzyme, (2) competitive inhibition by the alcohol substrates, and (3) by describing enzyme kinetics by the thermodynamic activities of the substrates rather than by their concentrations. The kinetic model assumed four parameters for each of the two reactions. Two equilibrium constants for methanol and ethanol were derived by molecular dynamics simulations;  $K_M = 0.22$  and 0.19, respectively, and  $K_i =$

0.44 and 0.38, respectively. Expressed in terms of thermodynamic activity, each equilibrium constant was similar for both alcohols. Two further parameters, the equilibrium constant  $K_M$  toward vinyl acetate and the maximum reaction rate  $v_{\max}$  were obtained by fitting the experimental data by the kinetic model. Thus, the observed concentration dependency of the reaction is a consequence of the thermodynamics of the solvent.

The molecular mechanism of protein hydration of CALB in organic solvent mixtures consisting of varying concentrations of water and methanol or ethanol in toluene was studied by molecular dynamics simulation. For ternary mixtures consisting of water, toluene and methanol or ethanol only 25 to 30 percent of the protein surface were covered with water at water activities approaching 1. In contrast the whole protein surface was covered with alcohol at alcohol activities approaching 1 in these mixtures. This is a consequence of the thermodynamics of these mixtures: While the two alcohols are soluble both in toluene and in water, water is only slightly soluble in toluene. The solubility of water in toluene is increasing with increasing alcohol concentration in the ternary mixtures. Thus understanding the thermodynamics of the solvent mixtures is prerequisite to a quantitative model of both the enzymatic activity and the binding of water and alcohols to the enzyme in organic solvents.

## Liste der Veröffentlichungen

**T. Kulschewski** and J. Pleiss: A molecular model of protein hydration in organic solvent mixtures (manuscript)

F. Sasso, **T. Kulschewski**, F. Secundo, M. Lotti and J. Pleiss: The effect of thermodynamic properties of solvent mixtures on *C.antarctica* lipase B catalyzed alcoholysis: Explaining the difference between methanol and ethanol (manuscript)

K. Scharnowski, M. Krone, G. Reina, **T. Kulschewski**, J. Pleiss, and T. Ertl: Comparative Visualization of Molecular Surfaces Using Deformable Models. In: *Eurographics Conference on Visualization (EuroVis) 2014* Volume 33 (2014), Number 3

**T. Kulschewski**, F. Sasso, F. Secundo, M. Lotti, and J. Pleiss: Molecular mechanism of deactivation of *C.antarctica* lipase B by methanol. In: *Journal of Biotechnology* 168.4 (2013), pp. 462 - 469.

M. Krone, G. Reina, C. Schulz, **T. Kulschewski**, J. Pleiss, and T. Ertl: Interactive extraction and tracking of biomolecular surfaces features. In: *Computer Graphics Forum* 32 (2013), pp. 331 - 340.

**T. Kulschewski** and J. Pleiss.: A molecular dynamics study of liquid aliphatic alcohols: simulation of density and self-diffusion coefficient using a modified OPLS force field. In: *Molecular Simulation* 39.9 (2013), pp. 754 - 767.

**T. Kulschewski** and J. Pleiss: Simulation of enzymes in organic solvents. In: Protein engineering handbook, vol.3. (eds. Lutz, S, Bornscheuer, UT). Wiley-VCH. Weinheim (2012).

M. Hutt, **T. Kulschewski**, and J. Pleiss: Molecular modelling of the mass density of single proteins. In: *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 30.3 (2012), pp. 318 - 327.

## 1. Einleitung

### 1.1. Enzyme in organischen Lösungsmitteln

Die ersten Untersuchungen einer Esterase in Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln wurden vor 75 Jahren durchgeführt [1]. Diese Studien basierten auf früheren Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass die von Glucosidasen katalysierten Reaktionen reversibel sind [2] und dass Lipasen die Synthese von Estern katalysieren können [3]. Die Möglichkeiten, die Enzyme in organischen Lösungsmitteln für die Synthese bieten, wurden erst in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts erkannt. Es wurde gezeigt, dass eine Lipase aus dem Pankreas des Schweins in organischen Lösungsmitteln bei einem Prozent Wassergehalt an Thermostabilität gewinnt. Gleichzeitig verfügte die Lipase über neue katalytische Eigenschaften wie die Alkohololyse von Triacylglyceriden [4] sowie Veresterung, Umesterung und Aminolyse [5]. Veränderte Substratspezifitäten und neue katalytische Eigenschaften wurden auch bei Peroxidasen [6] und Oxidasen [7] gefunden.

Durch diese Ergebnisse wurde bestätigt, dass die katalytische Aktivität des Enzyms vom Wassergehalt der Lösung abhängt. Die optimale katalytische Aktivität wird dabei bei einer Wasserkonzentration von einem Prozent erreicht [8]. Die minimale Wassermenge, die für katalytische Aktivität benötigt wird, ist dabei geringer als die Menge Wasser, die benötigt würde, um das Enzym mit einer Wasserschicht von der Dicke eines Wassermoleküls zu umgeben [6]. Die katalytische Aktivität [9, 10] und die Stereoselektivität [11] hängen dabei stark vom Wassergehalt der Lösung und der Polarität des Lösungsmittels ab. Die Effekte, die das organische Lösungsmittel auf das Enzym hat, werden nicht durch Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel und dem Enzym verursacht, sondern durch Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel und dem Wasser, das am Enzym gebunden ist. Eine geringe Wassermenge wird benötigt, damit das Enzym ausreichend flexibel ist.

Durch computergestützte Modellierung wurde der Effekt von Lösungsmitteln auf die Proteinstruktur und die Dynamik des Proteins untersucht. So sollten die molekularen Grundlagen der Enzymstabilität und -löslichkeit, die katalytische Aktivität, Substratspezifität und Selektivität erforscht werden.

Um Enzyme erfolgreich zu designen, Mutanten vorherzusagen und organische Lösungsmittel für die jeweilige Anwendung auszuwählen, ist ein fundiertes Verständnis der Struktur des Proteins und seiner Faltung, des katalytischen Mechanismus und des Verhältnisses zwischen Proteinbewegung und Funktion nötig. Die Relevanz des aktiven Zentrums für die katalytische Aktivität ist gut untersucht und wird von Elektrostatik dominiert [12]. Durch die Verwendung von quantenchemischen *ab-initio* Berechnungen und der Verknüpfung von quantenchemischen und molekulardynamischen Simulationen



können die Übergangszustände bis auf 1 kcal/mol genau berechnet werden [13]. Es wird vermutet, dass enzym-katalysierte Reaktionen nicht nur über einen oder zwei Übergangszustände verfügen, sondern über ein Ensemble gekoppelter Konformationen, die eine mehr-dimensionale freie Energielandschaft bilden.

Die Übergänge zwischen diesen Konformationen erfolgen in Zeiträumen, die wesentlich kürzer sind als der Millisekunden-Zeitraum, in dem katalytische Aktivität erfolgt. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Proteinbeweglichkeit für die Katalyse [14]. Eine mögliche Erklärung ist, dass organische Lösungsmittel einen Einfluss auf die Dynamik des Proteins haben [15]. Dies erklärt den Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Aktivität und Thermostabilität von Enzymen [4]. Bei geringen Wassermengen ist es daher möglich, dass organische Lösungsmittel die Struktur und Dynamik des katalytischen Zentrums des Enzyms, die Bindetasche des Substrats und auch die Kanäle, durch die das Substrat zum aktiven Zentrum geleitet wird, verändern. Neben direkten Wechselwirkungen mit dem Protein ist es möglich, dass organische Lösungsmittel sich indirekt auf das Protein auswirken, indem sie die Interaktionen zwischen Protein und Wasser beeinflussen. Wenn die Interaktionen zwischen Protein und Wasser verändert werden, ist anzunehmen, dass sowohl die Stabilität als auch die Funktion des Proteins verändert werden, da Wassermoleküle zum einen integraler Bestandteil der Proteinstruktur sind, zum anderen aber auch häufig bei der Katalyse beteiligt sind oder eine Rolle als Substrat oder Reaktionsprodukt spielen. Um die Wechselwirkungen zwischen Protein, organischen Lösungsmitteln und Wasser zu untersuchen und um den Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Struktur und Flexibilität vorherzusagen, wurden molekulardynamische Simulationen von Proteinen in reinen organischen Lösungsmitteln und Mischungen von organischen Lösungsmitteln durchgeführt.

## 1.2. Lipasen

Lipasen werden in der industriellen („weißen“) Biotechnologie als Biokatalysatoren zur Synthese in nicht-wässrigen Lösungsmitteln eingesetzt [16]. Sie gehören zur Familie der Triglycerid-Lipasen (E.C. 3.1.1.3). Dabei handelt es sich um ubiquitäre Enzyme, die in allen Reichen des Lebens gefunden werden. Diese Biokatalysatoren eignen sich für organische Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen [16-18]. Im Gegensatz zu Esterasen verfügen die meisten Lipasen über eine Grenzflächenaktivierung. Dabei nimmt die hydrolytische Aktivität zu, wenn sich das Enzym an einer Wasser/Lipid Grenzschicht befindet [19]. Diese Grenzflächenaktivierung findet sich jedoch nicht bei allen Lipasen: Die in dieser Arbeit untersuchte *Candida antarctica* Lipase B verfügt z. B. über keine Grenzflächenaktivierung [20].

### 1.2.1. *Candida antarctica* Lipase B (CALB)

*Candida antarctica* Lipase B (CALB) ist ein in der industriellen Biotechnologie häufig verwendeter Biokatalysator, da diese Lipase sehr robust gegen viele organische Lösungsmittel und katalytisch sehr aktiv ist und ein breites Substratspektrum und eine hohe Regio- und Stereoselektivität besitzt.

Diese Lipase stammt aus der Hefe *Candida antarctica* [21, 22]. Sie besteht aus 317 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 33 kDa [23]. Bei CALB handelt es sich um ein globuläres Protein mit einer experimentell bestimmten Struktur und einer Oberfläche von ca. 450 Å<sup>2</sup>. Im Gegensatz zu anderen Lipasen hat CALB keinen Lid und keinen hydrophoben Patch auf der Oberfläche [23]. Auch findet bei CALB keine Grenzflächenaktivierung statt [20]. CALB akzeptiert ein breites Substratspektrum [10] und ist auch bei hohen Temperaturen aktiv [24].

CALB gehört der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung [25, 26] an (Abb. 1). Die Enzyme, die dieses Faltungsmuster aufweisen, stammen von einem Vorläufer ab, haben aber keine offensichtliche Sequenzähnlichkeit mehr. Sie katalysieren ein breites Spektrum an chemischen Reaktionen und akzeptieren dabei eine Vielzahl verschiedener Substrate [27].

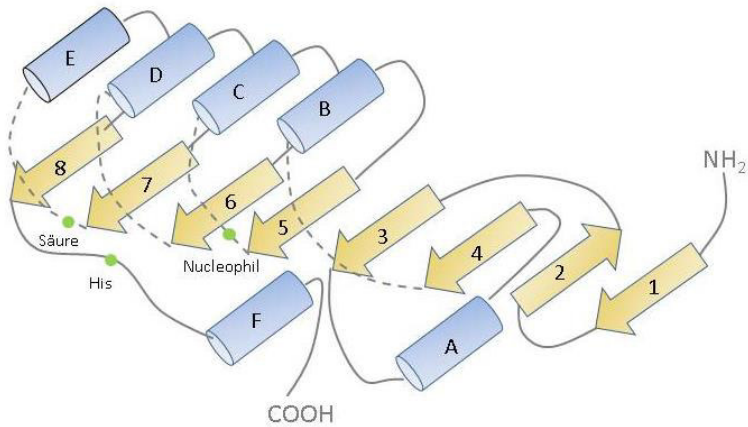
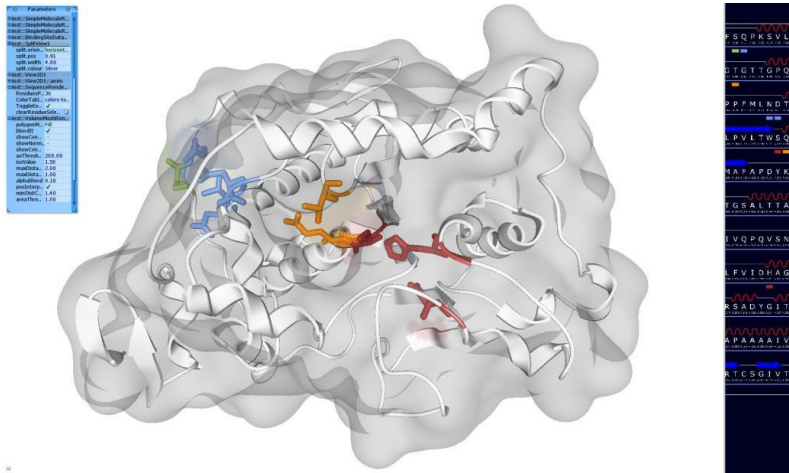


Abb. 1:  $\alpha/\beta$  Hydrolasefaltung nach [26]

Alle Enzyme, die ein  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltungsmuster besitzen, verfügen über eine katalytische Triade [28], die aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin besteht (Abb. 2). Diese katalytische Triade ist sowohl in der Sequenz als auch in der räumlichen Struktur konserviert [25]. Die räumliche Anordnung der Aminosäuren der katalytischen Triade ist für die Funktion des Enzyms essentiell: Das katalytische Serin befindet sich dabei auf dem sogenannten *nucleophilic elbow*, einem exponierten Loop zwischen  $\beta$  5 und  $\alpha$  B. Der *nucleophilic elbow* ist ebenfalls konserviert. Das katalytische Serin befindet sich oftmals in einem GX SXG-Motiv [29]. Allerdings ist dieses Motiv aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit in der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung nicht in allen Enzymen enthalten. Neben der katalytischen Triade verfügen die Enzyme der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung über ein *oxyanion hole*: [25, 30-32]. Es besteht aus zwei Aminosäuren, die das Substrat in seinem Übergangszustand stabilisieren [33]. Der katalytische Mechanismus und die Bedeutung der katalytischen Triade wurde bereits modelliert und ist gut verstanden [34].



**Abb. 2: Das aktive Zentrum von CALB bestehend aus Ser105, Asp187 und His224 (rot). Erstellt von Michael Krone mit MegaMol.**

Der katalytische Mechanismus von CALB ist gut untersucht: Die Enzymkinetik wurde in einer Vielzahl von Lösungsmitteln untersucht [35]. Beim Reaktionsmechanismus handelt es sich um einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus mit kompetitiver Inhibition [33, 35]. Die Enantioselektivität von CALB wurde bereits untersucht und durch Modellierung erklärt [36, 37]. Die Substratbindetasche von CALB ist ein elliptischer, steiler Trichter mit den Ausmaßen 0,95 x 0,45 nm. Die katalytische Triade von CALB befindet sich 1,2 nm von der Oberfläche entfernt, was relativ tief im Vergleich zu anderen Lipasen ist [23, 38]. Auf der Oberfläche von CALB gibt es spezielle Abschnitte, die bei der Bindung des Substrates beteiligt sind und für die Funktion des Enzyms relevant sind. Dazu gehören unter anderem der *hydrophobic dent* [36, 39, 40], der *hydrophilic trench* [41] und der *hydrophobic crevice* [42].

### 1.3. Molekulardynamische Simulation von Proteinen und Lösungsmitteln

Kurz nachdem in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts die ersten Röntgenkristallstrukturen von Proteinen bestimmt wurden [43, 44], wurden molekulare Modelle erfolgreich eingesetzt, um Proteinkonformationen zu berechnen [45]. Die erste Simulation des BPTI wurde mit einem Vorläufer des Kraftfeldes CHARMM [46] durchgeführt. Die Simulation wurde ohne Lösungsmittel über einen Zeitraum von 10 ps durchgeführt und lieferte überraschende Einblicke: Das Innere des Proteins verhält sich wie eine Flüssigkeit und die Bewegungen des Proteins können über Diffusion beschrieben werden [47]. Durch Röntgenbeugung war es möglich, die Kopplung der unterschiedlichen Konformationen über einen weiten Zeitbereich vorherzusagen [48]. Neben dem CHARMM Kraftfeld wurden weitere Kraftfelder für die molekulardynamische Simulation von Proteinen entwickelt, unter anderem OPLS [49], AMBER [50] und GROMOS [51]. Simulationsprogramme wie BOSS/MCPCRO [52], Amber [53], CHARMM [54], GROMOS [55], GROMACS [56], NAMD [57] und Desmond [58] wurden für die Simulation von Biomolekülen eingesetzt. Traditionelle Kraftfelder nehmen paarweise Wechselwirkungspotentiale zwischen den Atomen an, die sich aus gebundenen und nicht-gebundenen Beiträgen zusammensetzen. Aus diesen Potentialen kann die resultierende Kraft abgeleitet werden, die auf das jeweilige Atom wirkt. Die molekulardynamische Simulation selbst besteht aus der iterativen Lösung der zweiten Newton'schen Bewegungsgleichung mit typischen Schrittweiten von 1 bis 5 fs. Bevor die Simulation durchgeführt werden kann, müssen Parameter für die gebundenen und nicht-gebundenen Wechselwirkungen festgelegt werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Parameter im Laufe der Simulation nicht ändern und keine Bindungen gespalten oder gebildet werden. Allerdings ist die Verteilung der Elektronen eines Moleküls abhängig von seiner Umgebung. Dies steht nicht im Einklang mit der Annahme von konstanten Partialladungen. Um den Einfluss von Wasser und organischen Lösungsmitteln auf die Polarisierung des Proteins zu modellieren, wurden Kraftfelder entwickelt, die die Polarisierbarkeit von Bindungen erlauben. Bei einer Simulation eines BPTI in Wasser, bei der ein polarisierbares Kraftfeld zum Einsatz kam, zeigte sich, dass das Muster der Wasserstoff-Bindungen und die strukturellen und dynamischen Eigenschaften des Lösungsmittels von Simulationen abwichen, bei denen nicht-polarisierbare Kraftfelder verwendet wurden. Allerdings war die Struktur des Proteins in beiden Fällen vergleichbar [59]. Weitere Studien sind allerdings nötig, um die Genauigkeit der polarisierbaren Kraftfelder zu untersuchen. Des Weiteren wurden Kraftfelder entwickelt, die durch eine quantenchemische Wellenfunktion beschrieben werden [60]. In diesen Kraftfeldern sind die Polarisierbarkeit und der Transfer von Ladungen bereits implizit enthalten. Dadurch kann diese Methode verwendet werden, um chemische Reaktionen zu modellieren. Eine 50 ps

MD Simulation von BPTI in Wasser zeigte, dass Wasser einen signifikanten Polarisierungseffekt hat und dass ein beachtlicher Ladungstransfer zwischen den Aminosäuren stattfindet. Abhängig davon, an welcher Stelle im Protein sich die Aminosäuren befinden, kann sich die Ladung der Aminosäuren um bis zu 0,1 unterscheiden [60]. Allerdings sind weitere Studien nötig, um die Bedeutung des Ladungstransfers für biochemische und biophysikalische Eigenschaften von Proteinen zu untersuchen.

Um die physikalischen Eigenschaften organischer Lösungsmittel zu modellieren, wurde bereits eine Vielzahl organischer Lösungsmittel untersucht. Das erste transferierbare Kraftfeld, OPLS (*optimized potentials for liquid simulations*), wurde ausgehend von Monte-Carlo-Simulationen entwickelt [61]. Trotz der geringen Anzahl an Atomtypen waren die simulierten Eigenschaften in beachtlicher Übereinstimmung mit experimentellen Daten.

Seitdem wurden weitere Kraftfelder entwickelt und angewandt, sowohl für Monte-Carlo als auch für molekulardynamische Simulationen. Folglich wurde bestätigt, dass molekulardynamische Simulationen im Stande sind, die strukturellen, thermodynamischen und dynamischen Eigenschaften wie Dichte, radiale Verteilungsfunktion, Verdampfungsenthalpie, dynamische Viskosität, isotherme Kompressibilität, Selbstdiffusionskoeffizient und Permittivität korrekt wiederzugeben [62]. Kraftfelder sollten sowohl die Fähigkeit besitzen, eine breite Auswahl an physikalischen Eigenschaften wiederzugeben, als auch übertragbar zu sein. Kraftfeldparameter, die für eine reine Flüssigkeit bei einer Temperatur entwickelt wurden, eigneten sich auch, um Mischungen und den Reinstoff bei anderen Temperaturen zu simulieren [62]. Die am besten untersuchte Flüssigkeit ist dabei Wasser. Für die Simulation von wässrigen Proteinlösungen bei Raumtemperatur und -druck steht eine Vielzahl an Wassermodellen zur Verfügung. Die Modelle unterscheiden sich in der Anzahl der Atome, der Partialladung der Atome und darin, ob das Modell flexibel ist oder nicht. Bei den Modellen SPC [63], TIP3P [64] und SPC/E [65] handelt es sich um Modelle mit 3 Atomen. Andere Modelle wie das TIP4P [64] und das TIP5P [66] haben 4 bzw. 5 Atome. Diese Modelle sind sowohl dafür geeignet, die physikalischen Eigenschaften von reinem Wasser als auch Mischungen von Wasser mit wasser-mischbaren organischen Lösungsmitteln zu beschreiben. Die Dichte, der Selbstdiffusionskoeffizient und die Verdampfungsenthalpie waren in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten für Mischungen aus Wasser-Methanol [67], Wasser-Ethanol [68], Wasser-Aceton [69], Wasser-DMSO [67, 70], Wasser-Harnstoff [71] und Wasser-Acetonitril [72]. Molekulare Modelle organischer Lösungsmittel, die die Mischungen von organischen Lösungsmitteln mit Wasser gut beschreiben, sind

eine Voraussetzung für die Simulation ternärer Systeme, bestehend aus Enzym, organischem Lösungsmittel und Wasser.

## 1.4. Molekulardynamische Simulation von organischen Lösungsmitteln

### 1.4.1. Molekulardynamische Simulation von Alkoholen

In der Vergangenheit wurden bereits umfangreiche molekulardynamische (MD) und Monte-Carlo (MC)-Simulationen durchgeführt, um die Eigenschaften flüssiger aliphatischer Alkohole zu modellieren. In den meisten Studien wurden dabei Methanol [73] und Ethanol [74] untersucht, da sie in chemischen und biochemischen Prozessen weit verbreitet sind und eine einfache Struktur aufweisen. Auch für Ethylenglycol [75] und Glycerol [76] wurden bereits umfangreiche Simulationsstudien durchgeführt. In diesen Studien wurde eine Vielzahl von Kraftfeldern eingesetzt: Das OPLS *all-atom* [74]- und das OPLS *united-atom* [77]-Kraftfeld, Kraftfelder, die von OPLS abgeleitet wurden [78], Kraftfelder, die auf *ab initio*-Modellen beruhen [79] sowie das GROMOS-Kraftfeld [80, 81]. In den meisten Studien wurden Systeme untersucht, die weniger als 2.000 Atome enthielten [74], was in kubischen Boxen mit einer Länge von weniger als 3 nm resultierte. In einigen Studien wurden kleinere Systeme mit nur 26 [82] und 32 Molekülen [73, 83] untersucht. Die durchschnittliche Simulationszeit variierte von weniger als 100 ps [73] bis zu 3,5 ns [74]. Die Temperatur betrug meistens 298 K [79], allerdings wurden die Lösungsmittel in einigen Studien auch über einen weiten Temperaturbereich untersucht [84]. In den meisten Studien betrug der Druck 1 Bar. Für Methanol wurden zudem Studien am superkritischen Punkt bei Drücken zwischen 100 und 300 bar [85] und bei 2,8 kbar [86] durchgeführt. Es wurden sowohl NVT [73]- und NPT [80]-Simulationen durchgeführt. Neben anderen Eigenschaften wurden die Dichte [87], der Selbstdiffusionskoeffizient [76], die Permittivität [80] und der thermische Ausdehnungskoeffizient [80] aus den Simulationen berechnet.

Während die Dichte für fast alle Modelle in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Werten war [79, 88], wich der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient beachtlich von den experimentellen Werten ab: Für Ethanol wich der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient bis zu 25 Prozent [79], für Methanol zwischen 4 Prozent [88] und 50 Prozent [83] und für das SPC-Wassermodell 50 Prozent [65] vom experimentellen Wert ab. Das SPC-Wassermodell wurde durch Veränderung der Partialladungen optimiert. Infolge dessen verbesserte sich der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient bei 300 K beachtlich und wich nur noch 4 Prozent vom experimentellen Wert ab, während sich die Abweichung der Dichte nur geringfügig von 2,5 Prozent auf 0,3 Prozent zum experimentellen Wert änderte [65].

Die Mehrzahl der bereits publizierten Simulationsstudien über aliphatische Alkohole beschränkte sich auf eine einzelne Temperatur (in der Regel zwischen 286 und 300 K) oder die Kraftfeldparameter wurden mit *ab initio* Methoden für einen einzelnen Alkohol entwickelt. Allerdings stellt sich die Frage



nach der Transferierbarkeit des Kraftfeldes: Denn Kraftfeldparameter, die für eine einzelne Temperatur geeignet sind, sind nicht zwangsläufig dafür geeignet, die jeweiligen Eigenschaften über einen breiten Temperaturbereich korrekt wiederzugeben. Zudem sind die Kraftfeldparameter, die über *ab initio*-Methoden für einen Alkohol entwickelt wurden, nicht ohne weiteres für andere Alkohole geeignet.

Das weit verbreitete OPLS (*optimized potential for liquid simulations*)-Kraftfeld [49] wurde entwickelt, um die Dichte [89] und thermodynamische Eigenschaften wie das Dampf-Flüssig-Phasengleichgewicht [89] und den Verteilungskoeffizienten [90] über einen breiten Temperaturbereich zu beschreiben. Zusätzlich wurden im OPLS-Kraftfeld die Anzahl der Atomtypen und Kraftfeldparameter minimiert, wodurch es einfach und hochgradig transferierbar wurde. Obwohl die Dampf-Flüssig-Phasengleichgewichte bei niedrigen Alkoholen in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten waren, gab es stärkere Abweichungen bei höheren Alkoholen [89].

Um die Eignung des OPLS-Kraftfeldes systematisch zu untersuchen, wurden 13 aliphatische Alkohole simuliert (Abb. 3). Ausgehend von diesen Simulationen wurden die Dichte, die radiale Dichteverteilung, der Selbstdiffusionskoeffizient und die Permittivität berechnet. Dabei wurde das OPLS *all-atom*- und das OPLS *united-atom*-Kraftfeld verwendet. Zudem wurden die Partialladungen der Hydroxylgruppe des OPLS *all-atom*-Kraftfelds modifiziert, um die simulierte Dichte und den Selbstdiffusionskoeffizienten zu verbessern. Die Eignung der Modelle wurde in einem Temperaturbereich von 288 K bis 338 K untersucht. Dazu wurden Systeme mit mindestens 75.000 Atomen über einen Zeitraum von mindestens 50 ns simuliert. Für jedes System wurden fünf Simulationen mit unterschiedlichen Anfangsbedingungen durchgeführt.

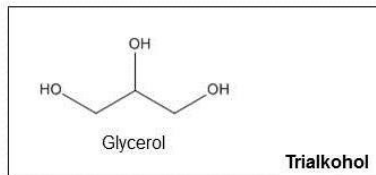
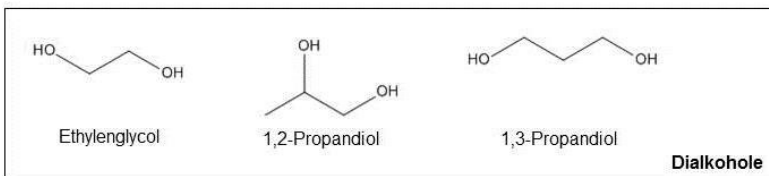
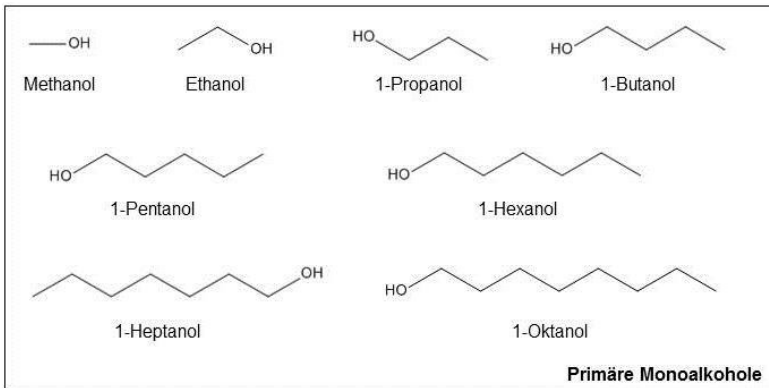


Abb. 3: Übersicht über die untersuchten Alkohole

### 1.4.2. Molekulardynamische Simulation von grünen Lösungsmitteln

Enzymkatalysierte Reaktionen werden meist in wässriger Lösung durchgeführt. Um die Löslichkeit von unpolaren Substraten zu erhöhen oder um unerwünschte Nebenreaktionen mit Wasser auszuschließen, wird seit über 30 Jahren die Biokatalyse in nicht-wässrigen Lösungen intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass viele Enzyme in organischen Lösungsmitteln wie Alkanen, aliphatischen Alkoholen oder Aromaten stabil und katalytisch aktiv sind und unter diesen Bedingungen interessante biochemische Eigenschaften haben können. Der wesentliche Nachteil von organischen Lösungsmitteln ist ihre Toxizität, schlechte Ökobilanz, Flüchtigkeit und Entflammbarkeit. In den letzten Jahren wurde eine vielversprechende Gruppe von Lösungsmitteln intensiv untersucht, die sogenannten grünen Lösungsmittel. Dabei handelt es sich um ungiftige, bioabbaubare Substanzen, die aus erneuerbaren Ressourcen gewonnen werden [91]. Die industrielle und biotechnologische Bedeutung dieser Lösungsmittel nimmt stetig zu [92]. Im Zuge dieser Arbeit wurden bereits zahlreiche grüne Lösungsmittel untersucht (Abb. 4). Es zeigte sich, dass auch bei diesen Modellen sowohl die Dichte als auch der Selbstdiffusionskoeffizient von den experimentellen Daten abwichen und eine Optimierung der Modelle nötig war.

Für die molekulardynamische Simulation von Enzymen in organischen Lösungsmitteln wurden zudem noch weitere Lösungsmittelmodelle benötigt wie Vinylacetat und Toluol. Diese Modelle wurden ebenfalls auf ihre Eignung untersucht.

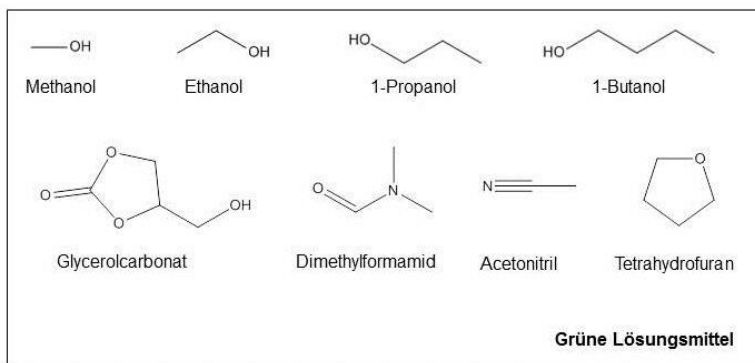


Abb. 4: Grüne Lösungsmittel

## 1.5. Die Rolle des Lösungsmittels

Obwohl gezeigt wurde, dass die Auswahl des Lösungsmittels einen wichtigen Einfluss auf die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des Enzyms hat, ist der molekulare Mechanismus, wie Lösungsmittel die Enzymeigenschaften beeinflussen, noch nicht geklärt und immer noch Gegenstand zahlreicher Diskussionen. In erster Näherung bewirkt der Austausch von Wasser durch ein wasser-freies organisches Lösungsmittel eine drastische Verringerung der Flexibilität. Dadurch wird sowohl die Konformation des Enzyms fixiert als auch der Protonierungszustand der titrierbaren Gruppen. Zudem ist klar geworden, dass organische Lösungsmittel einen direkten Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften, wie katalytische Aktivität und Stereoselektivität, haben. Ausgehend von experimentellen Daten wurden drei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen, wie das Lösungsmittel mit dem Enzym interagiert: Die Permittivität ( $\log P$ , Hydrophobizität) des organischen Lösungsmittels [93], das molekulare Volumen [94] und die Wasseraktivität [95].

Eine weitere ungeklärte Frage ist, ob es sich bei den beobachteten Änderungen des Enzyms um globale oder lokale Effekte handelt. Abhängig von der verwendeten experimentellen Methode wurden sowohl globale (globale Proteinpackung, Flexibilität) als auch lokale Effekte (Beweglichkeit der markierten Aminosäuren, offener oder geschlossener Zustand der Substratbindestelle) beobachtet. Während die Proteinestabilität vermutlich mehr mit den globalen Änderungen des Enzyms verbunden ist, sind Änderungen in der Enantioselektivität vermutlich auf Veränderungen in der Substratbindetasche zurückzuführen. Insgesamt wurden vier molekulare Mechanismen vorgeschlagen, um die Enantioselektivität zu erklären:

1. Änderungen in der Struktur der Substratbindestelle, die durch Lösungsmittelmoleküle verursacht werden.
2. Änderungen in der lokalen Flexibilität des Proteins, die die Selektivität verändern können.
3. Einzelne Moleküle des Lösungsmittels können an die Substratbindestelle binden und mit dem Substrat konkurrieren.
4. Ein Wassermolekül könnte an eine eindeutig definierte Wasserbindestelle in der Nähe des aktiven Zentrums binden, was dazu führen würde, dass die Enantioselektivität abhängig von der Wasseraktivität der Lösung wird.

Ein Sonderfall der lokalen Effekte ist die Bindung des Proteins an eine hydrophobe Flüssigkeit oder eine feste Grenzfläche. Dabei kann es sich um ein Substrat, einen immobilisierten Träger oder die Matrix eines Chromatographen handeln. Es wurde gezeigt, dass der Übergang zwischen zwei Proteinkonformationen von der Anwesenheit einer Grenzfläche getrieben wird. Ein Beispiel für einen solchen Vorgang ist das Öffnen eines beweglichen Lids, wenn die Lipase an eine hydrophobe Substratgrenzfläche bindet [96]. Der Effekt der hydrophoben Grenzfläche auf das Enzym könnte von den unterschiedlichen Permittivitäten der Grenzfläche und des Wassers hervorgerufen werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es feinere Interaktionen zwischen den Molekülen der hydrophoben Phase und dem Enzym gibt.

## 1.6. Simulation der Proteinstruktur und -flexibilität in organischen Lösungsmitteln

Obwohl Enzyme im Allgemeinen ihre Aktivität verlieren, wenn sie aus einer wässrigen Lösung in ein wasserfreies organisches Lösungsmittel überführt werden, behalten viele Enzyme ihre Aktivität und Tertiärstruktur bei [97]. Allerdings reduziert sich dabei die Flexibilität des Enzyms um 20-30 Prozent, was mittels Röntgenkristallographie gezeigt werden konnte [98, 99]. Die Abnahme an Mobilität in wasserfreien organischen Lösungsmitteln konnte auch durch Untersuchungen der Elektronenspinresonanz [100] und durch zeitbezogene Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen [101] von *Subtilisin Carlsberg* gezeigt werden. In wasserfreien organischen Lösungsmitteln nahm die Mobilität der markierten Aminosäuren deutlich ab. Beim Vergleich von fünf unterschiedlichen Lösungsmitteln (Dimethylformamid, Butanon, Aceton, Tetrahydrofuran und Cyclohexan) war die Mobilität am niedrigsten für das unpolare Cyclohexan [101] und nahm bei der Zugabe kleiner Wassermengen leicht zu [100, 101].

Molekulardynamische Simulationen von Proteinen in organischen Lösungsmitteln wurden durchgeführt, um den molekularen Mechanismus des Effekts von organischen Lösungsmitteln auf die Proteinstruktur und -flexibilität zu untersuchen. Dabei wurden die Enzyme BPTI [102], Chymotrypsin [103] und CALB [104, 105] mittels molekulardynamischen Simulationen untersucht. Die Tertiärstruktur blieb dabei erhalten, während sich die Konformation der Seitenketten auf der Proteinoberfläche änderte. Insbesondere wurden dabei die polaren Seitenketten auf die Proteinoberfläche zurückgefaltet, wodurch sich der Anteil der Oberfläche, der dem Substrat zugänglich war, verringerte [104, 106, 107]. Bei den hydrophoben Seitenketten vergrößerte sich der Lösungsmittel-zugängliche Anteil der Oberfläche [103, 104]. Außerdem nahm die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren zu [107]. Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen bei polaren Lösungsmitteln ab, was die Struktur des katalytischen Zentrums beeinflussen könnte [105]. Für einige andere Enzyme, wie die Triosephosphatisomerase [108] und *Subtilisin Carlsberg* [109] wurde jedoch eine Destabilisierung in wasserfreien organischen Lösungsmitteln beobachtet. In diesen Fällen begannen die strukturellen Veränderungen in den Loops auf der Oberfläche, was dazu führte, dass sich Pfade für das Lösungsmittel in den Kern des Enzyms öffneten. Dies führte letztlich zum Kollaps der Sekundär- und Tertiärstruktur.

Für alle bisher untersuchten Proteine konnte gezeigt werden, dass wasserfreie organische Lösungsmittel die Flexibilität des Proteins reduzieren und Diffusionsbewegung abbremsen [93].

Allerdings sind nicht alle Aminosäuren gleichermaßen von diesem Effekt betroffen: polare und geladene Seitenketten werden in der Regel starrer, während hydrophobe Seitenketten auf der Proteinoberfläche beweglicher werden. Dies wurde in Simulationen der Lipase aus *Candida rugosa* in Wasser und Tetrachlormethan bestätigt. Dabei waren polare Seitenketten flexibler in Wasser, aber weniger flexibel in organischen Lösungsmitteln [110]. Im Gegensatz dazu waren hydrophobe Aminosäuren flexibler in organischen Lösungsmitteln, dafür aber weniger flexibel in Wasser. Ein bedeutender Effekt von organischen Lösungsmitteln war die Stabilisierung zweier Salzbrücken und einer Wasserstoffbrücke, was die Beweglichkeit der Lid-Region reduzierte.

In zahlreichen Simulationsstudien wurden Proteine in organischen Lösungsmitteln bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Grad, zu dem das Enzym hydriert ist, eine wichtige Größe ist. Die Triosephosphatisomerase verlor in reinem Decan ihre Sekundärstruktur, die Flexibilität reduzierte sich und das Enzym froh ein. Durch die Zugabe geringer Wassermengen wurde die native Struktur stabilisiert und die Flexibilität des Enzyms war mit Simulationen vergleichbar, in denen das Enzym in reinem Wasser simuliert wurde [108]. In Simulationen von Ubiquitin und Cutinase in Hexan bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten konnte die experimentell bereits gut bestimmte glockenförmige Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Hydratisierung des Enzyms bestätigt werden [111]. Bis zu einem Wassergehalt von 10 Prozent (w/w) waren die Struktur und die Dynamik des Enzyms zunehmend ähnlich zu der Struktur und Dynamik in reinem Wasser. Für höhere Wasseranteile wurde das Protein instabil und partielle Entfaltung wurde beobachtet.

Während sich in unpolaren organischen Lösungsmitteln mit einem hohen logP-Wert das Wasser fast ausschließlich an der Proteinoberfläche befindet, können polare organische Lösungsmittel das Wasser von der Proteinoberfläche abziehen [112, 113]. Der Effekt von organischen Lösungsmitteln auf proteingebundenes Wasser wurde bereits untersucht: Dazu wurde CALB mit 286 gebundenen Wassermolekülen in fünf unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Permittivitäten simuliert [104]. In allen fünf organischen Lösungsmitteln war die Proteinstruktur annähernd identisch, wohingegen die Flexibilität mit der Permittivität des Lösungsmittels abnahm. Die Schlussfolgerung daraus war, dass der Verlust der Flexibilität in unpolaren Lösungsmitteln von einem Netzwerk aus sich langsam austauschenden Wassermolekülen verursacht wird, die einen starren Panzer um die Proteinoberfläche bilden. Als die Hydratisierung erhöht wurde, wurde das Enzymrückgrat flexibler [103]. Der größte Effekt wurde bei den Aminosäuren auf der Oberfläche beobachtet, vor allem

in Loop-Regionen [108]. Allerdings verhielten sich nicht alle Loops gleich, wenn der Wassergehalt erhöht wurde: Einige Loops in der Nähe der Substratbindestelle von CALB wurden flexibler, während andere Loops starrer wurden [114]. BPTI wurde sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in wässriger Lösung simuliert. Dabei wurde die Flexibilität bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt, um zu verstehen, warum Enzyme in organischen Lösungsmitteln stabilisiert werden. Sowohl in wässriger Lösung als auch in organischen Lösungsmitteln nahm die Flexibilität mit zunehmender Temperatur zu. Allerdings war die Zunahme der Flexibilität in Wasser stärker als in organischen Lösungsmitteln. Das war in Übereinstimmung mit der experimentell bestätigten Stabilisierung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln. Die Stabilisierung von Enzymen in unpolaren organischen Lösungsmitteln ist hauptsächlich auf die Zunahme intramolekularer Wasserstoffbrücken, Interaktionen zwischen Ionenpaaren und die Reduzierung der Oberfläche zurückzuführen [103]. Der Effekt von unpolaren Lösungsmitteln ist vergleichbar mit Mutationen, die zu Thermostabilität führen. In thermostabilen Proteinen sind die Fluktuationen bei erhöhten Temperaturen durch verbesserte Packung, Wasserstoffbindungen und Salzbrücken eingeschränkt. Dadurch wird verhindert, dass Wasser in den Proteinkern gelangt und dadurch das Protein entfaltet wird [115].

Polare Lösungsmittel können sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte auf das jeweilige Enzym haben. In wässrigen Lösungen werden Proteine von Polyolen wie Glycerol, Xylitol, Sorbitol, Trehalose oder Saccharose stabilisiert. In Simulationen von Chymotrypsin konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Polyolen in einer höheren Ordnung des proteingebundenen Wassers resultierte, was als Hauptgrund für die Proteinstabilisierung angenommen wurde [116]. Erstaunlicherweise gab es nur sehr wenige Wasserstoffbindungen zwischen den Polyolen und dem Protein selbst. Es ist also unwahrscheinlich, dass das Protein direkt durch die Polyole stabilisiert wird. Im Gegensatz zu den beschriebenen Polyolen führten andere Alkohole wie Methanol zu einer partiellen Entfaltung und Deaktivierung des Proteins. In einer Simulation von Ubiquitin in einer Wasser-Methanol-Mischung konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Methanol die partielle Entfaltung des Enzyms begünstigt, indem Tertiärstrukturen zerbrochen werden, während die Stabilität von Sekundärstrukturen verbessert wird [117]. Im Allgemeinen ist die Stabilität von Enzymen gegenüber Additiven und Cosolventien eng mit der Thermostabilität des Enzyms verknüpft [118]. Demzufolge führen Strategien, die die Thermostabilität des Enzyms durch Mutationen erhöhen, in aller Regel zu einer höheren Stabilität des Enzyms gegenüber schädlichen organischen Lösungsmitteln, Additiven und Cosolventien [119].



## 1.7. Simulation der katalytischen Aktivität und Enantioselektivität

Für die Substratbindung ist zum einen eine wohldefinierte Geometrie des aktiven Zentrums, zum anderen eine gemäßigte Flexibilität des Substrats und des Enzyms nötig. Diese Anforderungen spiegeln sich in den Beiträgen der Enthalpie und der Entropie zur Substratspezifität und Enantioselektivität wider. Untersuchungen des molekularen Mechanismus haben ergeben, dass die Enantioselektivität sowohl von der Enthalpie als auch von der Entropie getrieben werden kann [120]. Sollte die Enthalpie die Triebfeder der Enantioselektivität sein, so könnte die Enantioselektivität durch die Chiralität des katalytischen Zentrums erklärt werden: Das bevorzugte Enantiomer passt dabei besser in die Bindetasche und hat mehr und energetisch günstigere Interaktionen mit dem Enzym als das weniger bevorzugte Enantiomer. Die experimentell beobachtete Stereoselektivität von Lipasen [121, 122] und derer Mutanten [123, 124] konnte modelliert werden, indem der Übergangszustand gedockt wurde.

Durch unterschiedliche Lösungsmittel und die Erhöhung des Drucks kann die Struktur des katalytischen Zentrums verändert werden. Infolgedessen ändert sich auch die Enantioselektivität. In molekular-dynamischen Simulationen der *Candida rugosa* Lipase in organischen Lösungsmitteln bei geringem Wassergehalt konnte gezeigt werden, dass Wassermoleküle an das aktive Zentrum binden und dass diese Wassermoleküle bei erhöhtem Druck sogar die Form des aktiven Zentrums verändern können [125]. Die experimentell beobachtete Abnahme der Enantioselektivität bei erhöhtem Druck kann mit der druckinduzierten Veränderung der Gestalt des aktiven Zentrums, die durch proteingebundene Wassermoleküle verursacht wird, erklärt werden. Die Enantioselektivität der Cutinase wurde mittels freier Energiesimulationen in Hexan bei unterschiedlichen Wassermengen untersucht. Die Simulationen waren in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten [126].

In den meisten Fällen bestimmt die Form der Bindungstasche die Enthalpie der Bindung, welche die Enantioselektivität treibt. Die Entropie ist dabei entgegenwirkend. In einigen Fällen bestimmt jedoch die Entropie die Enantioselektivität. Ein Beispiel ist die experimentell beobachtete Vorliebe von CALB für das (R)-Enantiomer von 3-Hexanol. In MD-Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Vorliebe für das R-Enantiomer dadurch verursacht wird, dass das R-Enantiomer ein höheres Volumen in der Bindetasche einnimmt als das nicht-bevorzugte Enantiomer. Dies war in Übereinstimmung mit der höheren Entropie des R-3-Hexanols im Übergangszustand [120]. Es wurde gezeigt, dass organische Lösungsmittel die Flexibilität von Enzymen beeinflussen können. Dies könnte einen weiteren alternativen Mechanismus darstellen, wie die katalytische Aktivität und Enantioselektivität von organischen Lösungsmitteln verändert wird. Zudem gibt es eine Korrelation zwischen der

Beweglichkeit des Inneren des Proteins und der Enantioselektivität [101]. Gleichmaßen beeinflusst die konformative Flexibilität des Subtilisins seine Fähigkeit, zwischen den Enantiomeren für die enzym-katalysierte Reaktion in organischen Lösungsmitteln zu unterscheiden. Als dritten möglichen Mechanismus, wie organische Lösungsmittel die katalytische Aktivität des Enzyms beeinflussen können, wurde vorgeschlagen, dass Lösungsmittelmoleküle die Substratbindestelle blockieren können. Bei der experimentellen Untersuchung des Einflusses von sechs organischen Lösungsmitteln auf die katalytische Aktivität von CALB in einem Fest/Gas-Reaktor reduzierten zwei Ketone die katalytische Aktivität des Enzyms, während zwei tertiäre Alkohole und zwei Kohlenwasserstoffe keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität hatten. Durch molekulare Modellierung dreier organischer Lösungsmittel konnte vorhergesagt werden, dass ein Keton und ein tertiärer Alkohol an das aktive Zentrum binden, während der Kohlenwasserstoff nicht bindet. Demnach könnte kompetitive Inhibition durch organische Lösungsmittel ein Effekt der organischen Lösungsmittel auf das Enzym sein. Allerdings können nicht nur organische Lösungsmittel spezifisch an die Substratbindestelle des Enzyms binden, sondern auch einzelne Wassermoleküle. Durch molekulare Modellierung von CALB konnte eine Wasserbindestasche identifiziert werden, die die experimentell beobachtete Abhängigkeit der katalytischen Aktivität und Enantioselektivität von der Wasseraktivität erklären könnte [127]. Die Vermutung war, dass ein einzelnes Wassermolekül bei höheren Wasseraktivitäten an eine Wasserbindestelle in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms binden könnte. Die Bindung dieses Wassermoleküls würde dann die Bindung des nicht-bevorzugten Enantiomers verhindern, hätte aber keinen Einfluss auf die Bindung des bevorzugten Enantiomers. Das würde den experimentell beobachteten Anstieg der Enantioselektivität mit der Wasseraktivität erklären.

## 1.8. Modellierung des molekularen Mechanismus der Deaktivierung von CALB durch Methanol

Seit die ersten systematischen Untersuchungen der katalytischen Aktivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurden [1, 8], ist klar, dass in nicht-wässrigen Lösungsmitteln die katalytische Aktivität und die Substratspezifität nicht nur von der Struktur und der Konzentration des Substrates abhängen, sondern auch von der Wahl des organischen Lösungsmittels und dem Wassergehalt [9, 10]. *Solvent Engineering* wurde deshalb als eine vielversprechende Strategie angesehen, um die Leistung von Biokatalysatoren zu verbessern [128, 129]. Es gibt vier Faktoren, wie das organische Lösungsmittel die enzymkatalysierten Reaktionen beeinflussen kann:

- 1) durch eine Veränderung der Struktur oder der Dynamik der Bindestelle des Enzyms
- 2) durch eine kompetitive Bindung der organischen Lösungsmittelmoleküle
- 3) durch das Entfernen von proteingebundenem Wasser
- 4) durch verbesserte Löslichkeit des hydrophoben Substrates

Zahlreiche Modellierungsstudien wurden bereits durchgeführt, um den molekularen Mechanismus dieser Faktoren zu untersuchen.

Der Effekt der Lösungsmittel auf die Struktur und Dynamik von Enzymen wurde bereits gründlich untersucht. Es wurde vorgeschlagen, dass der Effekt von organischen Lösungsmitteln auf das Enzym primär durch Interaktionen zwischen organischen Lösungsmitteln und dem enzymgebundenen Wasser verursacht wird und dass ein geringer Anteil an Wasser benötigt wird, um eine ausreichende Flexibilität des Enzyms zu gewährleisten [8]. Es wurden bereits mehrere Typen an Mechanismen vorgeschlagen, die erklären, wie Lösungsmittel mit dem Enzym interagieren: zum Beispiel die Permittivität (logP, Hydrophobizität) [93] und das molekulare Volumen des Lösungsmittels [94]. Es wurde gezeigt, dass durch einen Wechsel des organischen Lösungsmittels und durch eine Erhöhung des Drucks die Struktur des aktiven Zentrums grundlegend verändert werden kann. Während in den meisten Fällen die Enthalpie (und damit die Form der Bindungstasche) die Enantioselektivität bestimmt, wurden auch Fälle beschrieben, in denen die Entropie die Enantioselektivität bestimmt. Ein Beispiel dafür ist die experimentell beobachtete Vorliebe von CALB für das (R)-Enantiomer von 3-Hexanol. Durch molekuldynamische Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Vorliebe von CALB gegenüber dem (R)-Enantiomer dadurch verursacht wird, dass es ein größeres Volumen im aktiven Zentrum in Anspruch nimmt als das nicht-bevorzugte Enantiomer. Dies ist in Übereinstimmung mit der höheren Entropie von (R)-3-Hexanol in seinem Übergangszustand [120]. Es

wurde gezeigt, dass organische Lösungsmittel einen Einfluss auf die Flexibilität des Enzyms haben, was einen zweiten Mechanismus darstellen könnte, wie die katalytische Aktivität und die Enantioselektivität durch organische Lösungsmittel verändert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen der internen Proteinbeweglichkeit und der Enantioselektivität gibt [101]. Die konformative Flexibilität des Subtilisins hatte einen Einfluss darauf, wie es zwischen Enantiomeren, die als Substrat für die Subtilisin-katalysierte Reaktion in organischen Lösungsmitteln dienen, unterscheiden konnte [130]. Als dritter Mechanismus, wie organische Lösungsmittelmoleküle die katalytische Aktivität beeinflussen können, wurde vorgeschlagen, dass Lösungsmittelmoleküle die Substratbindestelle blockieren. Der Effekt von sechs Lösungsmitteln auf die katalytische Aktivität von CALB wurde in einem Feststoff/Gasreaktor untersucht [131]. Dabei wurde gezeigt, dass zwei Ketone die enzymatische Aktivität reduzierten, während zwei tertiäre Alkohole und zwei Kohlenwasserstoffe keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität hatten. Durch molekulare Modellierung dreier Lösungsmittel konnte gezeigt werden, dass ein Keton und ein tertiärer Alkohol an das aktive Zentrum binden, während der Kohlenwasserstoff dies nicht tut. Die kompetitive Inhibition durch organische Lösungsmittelmoleküle könnte einen Beitrag zu dem Effekt von Lösungsmitteln auf die enzymatische Aktivität haben.

Durch eine Veränderung der thermodynamischen Aktivität des Wassers in organischen Lösungsmitteln wurde bereits gezeigt, dass das am Enzym gebundene Wasser einen großen Einfluss auf die Stabilität, die katalytische Aktivität und die Selektivität des Enzyms hat [95]. Molekulardynamische Simulationen der *C. rugosa* Lipase in organischen Lösungsmitteln bei niedrigem Wassergehalt zeigten, dass die Wassermoleküle die Form des aktiven Zentrums verändern können [125]. Die Enantioselektivität einer Cutinase wurde in Hexan bei unterschiedlichen Wassermengen untersucht, indem Freie-Energie-Simulationen durchgeführt wurden. Diese Simulationen waren in Übereinstimmung mit experimentellen Daten [126]. Die Hydratisierung von Proteinen wurde in Abwesenheit von Lösungsmitteln in einem Gas/Feststoff-Reaktor analysiert. Dadurch wurde die Beeinträchtigung durch organische Lösungsmittel vermieden. In molekulardynamischen Simulationen von Enzymen in der Gasphase wurde bestätigt, dass die Wassermoleküle bei niedrigen thermodynamischen Wasseraktivitäten *patches* auf der Proteinoberfläche bilden, während sie bei hohen Wasseraktivitäten eine Schicht auf dem Enzym bilden [114]. Abgesehen von der bereits besprochenen unspezifischen Bindung von Wassermolekülen an das Enzym können Wassermoleküle auch spezifisch an die Substratbindestelle des Enzyms binden und damit zur katalytischen Aktivität und Enantioselektivität beitragen [127].

Während sich die meisten Studien auf den Effekt von Lösungsmitteln auf die Struktur und die Dynamik des Enzyms beschränken, ist der Effekt der Substratlöslichkeit noch nicht so gut untersucht. In der bahnbrechenden Arbeit von Jongejans wurde gezeigt, dass die katalytische Aktivität zweier Lipasen unabhängig von der Wahl des Lösungsmittels wurde, wenn in den Gleichungen der Enzymkinetik anstelle der Konzentration des Substrats seine thermodynamische Aktivität verwendet wurde [132, 133]. Dies wurde in einer Lipase-katalysierten Alkoholyse bestätigt, die in einem lösungsmittelfreien System durchgeführt wurde. Dabei wurden ein Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus und eine kompetitive Inhibition durch den Alkohol, welcher als Substrat diente, angenommen [134-136]. Allerdings wurden auch Fälle beschrieben, in denen die beobachtete Enzymkinetik nicht allein dadurch erklärt werden konnte, dass thermodynamische Aktivitäten anstelle der Konzentrationen verwendet wurden. Bei der lipase-katalysierten Alkoholyse eines Esters wurde beobachtet, dass die katalytische Aktivität bei niedrigen Alkoholkonzentrationen stark zunahm und dann bei höheren Konzentrationen langsam wieder abnahm [134-136].

Eine der größten Einschränkungen der enzymkatalysierten Alkoholyse, zum Beispiel der enzymatischen Produktion von Biodiesel ist, dass die katalytische Aktivität von Lipasen durch Methanol reduziert wird. Es wurde gezeigt, dass sich Lipasen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Methanol unterscheiden. Dies ist ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung von Prozessen für die Biodieselerstellung [137, 138]. Einer der weit verbreiteten Biokatalysatoren, CALB, wird zum Beispiel bei hohen Methanolkonzentrationen inaktiviert [139-141]. Allerdings ist dieser Biokatalysator in zahlreichen anderen organischen Lösungsmitteln stabil und katalytisch aktiv [24]. Infolge dessen wird Methanol schrittweise zugegeben [139, 141]. Dies verhindert die Deaktivierung des Enzyms, resultiert aber in längeren Produktionszeiten. Die Verfügbarkeit eines effizienten und günstigen Biokatalysators und optimierter Prozesse sind grundlegende Voraussetzungen für die Wettbewerbsfähigkeit dieses biokatalytischen Prozesses. Es ist daher wichtig, den Mechanismus hinter der Enzymdeaktivierung zu untersuchen und zu verstehen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Simulationen und von Projektpartnern am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano Experimente eines Modellsystems durchgeführt, in dem sich CALB, die Substrate Vinylacetat und Methanol sowie das organische Lösungsmittel Toluol befanden. Anhand dieser Systeme sollten die Effekte beschrieben werden, die eine Erhöhung der Alkoholkonzentration auf die spezifische Aktivität der Lipase hat. Die beobachtete Abhängigkeit der Aktivität von der Methanolkonzentration konnte durch drei einfache Annahmen erklärt werden: einen Ping-Pong-Bi-Bi-Reaktionsmechanismus, eine kompetitive Substratinhibition durch Methanol und die

Verwendung thermodynamischer Aktivitäten anstelle von Konzentrationen für Methanol und Vinylacetat.

## **1.9. Der Effekt thermodynamischer Eigenschaften von Lösungsmittelgemischen auf die Aktivität von CALB: Unterschiede zwischen Methanol und Ethanol**

Biokatalysatoren können zur Produktion ökonomisch relevanter Verbindungen eingesetzt werden. Ob sich diese Prozesse als erfolgreich erweisen, hängt von mehreren Faktoren ab. Unter anderem von der Optimierung zahlreicher Parameter hinsichtlich des Enzyms, Substrats, Lösungsmittels und den Bedingungen während des Prozesses. Enzyme, die als Biokatalysatoren eingesetzt werden, sind spezifisch und umweltfreundlich. Da es sich bei Enzymen um Proteine handelt, können sie durch Substrate und Produkte im Reaktionsmedium inaktiviert werden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Enzyme durch ungünstige Reaktionsbedingungen denaturiert werden. Die Enzyme, die als Biokatalysatoren eingesetzt werden sollen, müssen unter den chemischen und physikalischen Prozessbedingungen stabil und aktiv sein, damit der Prozess wettbewerbsfähig ist.

Die Wahl der Lösungsmittel ist somit ein wichtiger Faktor. Zum einen müssen die Substrate gelöst werden, zum anderen muss eine mögliche Aktivierung bzw. Inaktivierung des Enzyms durch das Lösungsmittel berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Alkoholen auf die von CALB katalysierte Alkohololyse untersucht. Alkoholysereaktionen werden bei der Herstellung von Emulgatoren, kosmetischen Produkten, Geschmacksstoffen und Medikamenten verwendet [142-145].

Eine gut untersuchte Alkoholysereaktion ist die Produktion von Biodiesel durch enzymatische Transesterifikation. Die Auswahl des Alkohols, der als Substrat bei der Herstellung von Biodiesel dient, hat Auswirkungen auf die Eigenschaften des produzierten Biodiesels, wie Fließeigenschaften, Viskosität und Flammpunkt [137]. Ein Hauptaugenmerk ist allerdings der Preis des eingesetzten Alkohols. Der Alkohol, der für die Biodieselproduktion eingesetzt werden soll, muss billig sein, um billige Produktionskosten zu gewährleisten. Zu den am häufigsten verwendeten Alkoholen zählen Methanol, Ethanol, Propanol, n- und iso-Butanol [146, 147]. Alkohole mit einem höheren Molekulargewicht haben eine höhere Dichte und eine höhere Siedetemperatur. Die Ausbeute an Ester ist dabei weitestgehend unabhängig vom verwendeten Alkohol. Methanol und Ethanol werden üblicherweise in der Biodieselproduktion verwendet, da sie deutlich günstiger als andere Alkohole sind und auch in großem Maßstab hergestellt werden. Methanol ist dabei günstiger und reaktiver als Ethanol. Zudem sind die entstehenden Methylester weniger viskos als die entsprechenden Ethylester. Allerdings ist Methanol toxisch und hat im Vergleich mit anderen Alkoholen einen stärkeren inaktivierenden Effekt auf die Aktivität des Biokatalysators. Zudem hat Methanol einen geringen Siedepunkt, was zu einem hohen Explosionsrisiko in Verbindung mit Methanoldämpfen führt [148].

Ethanol hingegen ist weniger toxisch und ist auch im Stande, das eingesetzte Öl in der Biodieselproduktion besser zu lösen. Zudem kann Ethanol einfach aus nachwachsenden Rohstoffen durch Fermentation produziert werden, während Methanol hauptsächlich aus nicht-erneuerbaren Quellen gewonnen wird [149]. Hinsichtlich ihrer Eignung als Treibstoff gibt es geringfügige Unterschiede zwischen den Methyl- und Ethylestern: Ethylester haben eine höhere Viskosität und einen höheren Schmelz- und Siedepunkt als die vergleichbaren Methylester [150]. Sowohl Methanol als auch Ethanol sind stärkere Denaturierungsmittel als die längerkettigen Alkohole und inaktivieren infolgedessen Enzyme [151]. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass kurzkettige Alkohole, wie Methanol und Ethanol Proteine inaktivieren. Dies wurde auch für die Bedingungen, die bei der Biodieselherstellung vorliegen, gezeigt [152, 153]: Der inaktivierende Effekt von Methanol ist dabei aber geringer als der von Ethanol. Ein Ansatz, um das Problem der Inaktivierung zu Umgehen, war die schrittweise Zugabe des jeweiligen Alkohols. Der Effekt mehrerer Alkohole auf die Aktivität von CALB wurde bereits untersucht [152]. Dabei wurden unverzweigte Alkohole (Methanol, Ethanol, Propanol und Butanol) und verzweigte Alkohole (Isopropanol, 2-Butanol und Isobutanol) verwendet. Die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass (a) die Inaktivierung durch den Alkohol mit zunehmendem Molekulargewicht abnahm und (b) verzweigte Alkohole das Enzym weniger stark inaktivierten als Unverzweigte.



## 1.10. Simulation von lösungsmittelinduzierten Konformationsübergängen

Konformationsübergänge, die durch organische Lösungsmittel oder eine hydrophobe Substratgrenzschicht ausgelöst werden, wurden hauptsächlich an Lipasen untersucht, die einen beweglichen Lid haben, der aus einer oder zwei Helices besteht. In wässrigen Lösungen ist dieser Lid geschlossen und blockiert so das aktive Zentrum, während der Lid in einer unpolaren Umgebung geöffnet ist, um den Zugang zum aktiven Zentrum zu gewährleisten. In Simulationen der *Rhizomucor miehei* Lipase im Vakuum, in Wasser und im Substrat Methylhexanoat [107, 154] wurde beobachtet, dass das Substrat Methylhexanoat die Mobilität des Lids erhöht. Eine partielle Öffnung des Lids wurde beobachtet, was es den Substratmolekülen ermöglichte, zum aktiven Zentrum zu diffundieren. Der Lid der *R. miehei* Lipase besteht aus einer einzelnen  $\alpha$ -Helix, der sich beim Kontakt mit der Substratgrenzfläche öffnet. Im Falle der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase wurde die Bewegung zweier Segmente in einer MD Simulation über 20 ns an einer Wasser-Oktan-Grenzschicht beobachtet. Der helicale Lid wurde auch über Röntgenstrukturbestimmung identifiziert. Ein weiterer kurzer Loop war in Kontakt mit dem Lid und war daran beteiligt, das aktive Zentrum in der geschlossenen Konformation zu blockieren. Auch in einer 4 ns Simulation der *C. rugosa* Lipase an unterschiedlichen Alkan-Wasser-Grenzschichten wurde das Öffnen des Lids beobachtet [155]. Als Ausgangspunkt wurde dabei die Konformation mit geschlossenem Lid verwendet. Der Lid bewegte sich an einer Hexan-, Oktan- und Decan-Grenzschicht um jeweils 0,8, 1 und 1,3 nm. Abgesehen vom Öffnen des Lids wurden keine anderen Konformationsänderungen beobachtet. Dies wurde auch in mehrfachen MD Simulationen der *Burkholderia cepacia* Lipase über 20 - 30 ns in Toluol [156], Oktan [157] und an einer Oktan-Wasser-Grenzschicht [157] bestätigt. Während die geschlossene Konformation in Wasser stabil war, öffnete sich der Lid in organischen Lösungsmitteln schrittweise. Das schrittweise Schließen des Lids wurde auch beobachtet, als die offene Konformation in Wasser simuliert wurde. Die Konformationsänderungen konnten simuliert werden, ohne dass eine externe Kraft angelegt werden musste. Der Vorgang des Öffnens und Schließens wurde dabei durch das Lösungsmittel getrieben. Bis heute gibt es sehr wenige Simulationsstudien, in denen die Interaktion einer Lipase mit einer realistischen Substratgrenzfläche untersucht wurde. Der Lid der *Thermomyces lanuginosa* Lipase fungiert als Anker an einer Tributyrin-Grenzfläche. Wenn die Lipase mit der Substratgrenzschicht interagiert, entfaltet eine Helix, und eine Zunahme in der Flexibilität wurde beobachtet [158]. Infolgedessen konnte das Substrat zum aktiven Zentrum gelangen. Zusätzlich bildet sich ein zweiter polarer Kanal, wenn die Lipase an die Grenzfläche bindet. Dieser zweite Kanal spielt vermutlich eine

wichtige Rolle bei der Regulation des Wassergehalts im aktiven Zentrum. Die Vermutung, dass es auch in CALB Wasserkanäle gibt, wurde durch Mutationen bestätigt, die diese Kanäle blockieren [159].

### 1.11. Wasserbindung an Proteine in organischen Lösungsmittelgemischen

Enzyme sind mächtige Werkzeuge, die eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren können, die von industrieller Relevanz sind. Einer der vielen Nachteile von Enzymen ist ihr relativ hoher Preis. Deshalb trägt jede Verbesserung in der Stabilisierung und Wiederverwendbarkeit dieser biologischen Katalysatoren zu einer Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der biokatalytischen Prozesse bei. Da es sich bei Enzymen um Proteine handelt, können sie leicht durch Chemikalien oder ungünstige physikalische Bedingungen (z. B. hohe Temperatur) beschädigt werden. Der Effekt von organischen Lösungsmitteln, allen voran Methanol, auf die Aktivität und Struktur ist vor allem für Lipasen relevant. Lipasen werden für die biologische Produktion von Biodiesel eingesetzt [12, 137, 143]. In dieser Reaktion werden die Fettsäuren aus Triglyceriden mit Alkoholen umgesetzt und es entstehen Fettsäurealkylester (Biodiesel).

Neben der Konzentration des Alkohols, der bei der Reaktion eingesetzt wird, ist auch der Anteil des Wassers im Reaktionsmedium relevant: Ein hoher Wasseranteil begünstigt die unerwünschte Nebenreaktion der Hydrolyse der Triglyceride, bei der freie Fettsäuren entstehen. Bei der Untersuchung des Effekts von Alkoholen auf das Enzym muss berücksichtigt werden, dass die Wassermoleküle eventuell einen schützenden Effekt auf das Enzym haben, wenn es sich in organischen Lösungsmitteln befindet. Dies ist besonders in polaren organischen Lösungsmitteln der Fall, die essentielle Wassermoleküle von der Proteinoberfläche abziehen können. Es ist bekannt, dass Lipasen eine gewisse Wassermenge benötigen, um ihre katalytische Aktivität ausüben zu können. Diese Wassermenge ist aber abhängig von der jeweiligen Lipase. Es wurde gezeigt, dass Wasser unterschiedliche Effekte auf unterschiedliche Lipasen hat: Die von CALB katalysierte Synthese von Alkylestern nahm mit steigendem Wassergehalt ab [160], während ein höherer Wassergehalt die Ausbeute von Reaktionen verbesserte, die von *Rhizopus oryzae*, *Candida sp.* und *Pseudomonas cepacia* katalysiert wurden [143, 161].

Kurzkettige Alkohole sind ein notwendiges Substrat für die oben beschriebene Transesterifikation. Theoretisch sollte eine Erhöhung ihrer Konzentration dazu führen, dass die Reaktion in Richtung des Produkts verschoben wird. Allerdings haben kurzkettige Alkohole einen Effekt auf den Katalysator [143] und es wurde bereits für mehrere Fälle gezeigt, dass hohe Methanolkonzentrationen schädlich sind und dass selbst das für die Reaktion benötigte stöchiometrische Verhältnis nicht umsetzbar ist. Dies gilt insbesondere für Reaktionen, die von CALB katalysiert werden. Dieses Enzym wird häufig eingesetzt, da es eine sehr hohe Aktivität in der Alkohololyse besitzt und auch unterschiedliche

Triglyceride als Substrat akzeptiert. Allerdings wird dieses Enzym durch Methanolkonzentrationen inaktiviert, die weitaus geringer sind als das optimale molare Verhältnis, das für die Umsetzung benötigt wird [139]. Die Inaktivierung von CALB durch hohe Methanolkonzentrationen ist interessant, da dieses Enzym in einer Vielzahl anderer organischer Lösungsmittel [24] stabil ist. Unglücklicherweise reduziert Methanol nicht nur die Aktivität von CALB, sondern auch von zahlreichen anderen Lipasen, wenn es unter Konzentrationen eingesetzt wird, die optimal für die Alkoholysereaktion wären. Die molekulare Ursache dieses Problems ist allerdings immer noch nicht verstanden. Dieses Verständnis ist nicht nur für die Produktion von Biodiesel, sondern auch für eine Vielzahl anderer Reaktionen (z. B. Herstellung von Kosmetika) von Bedeutung.

Ethanol hingegen ist weniger schädlich und führt auch bei hohen Konzentrationen nicht zu einer Inaktivierung von CALB.

Bereits Mitte der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden systematische Studien der katalytischen Aktivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei wurde auch die Bedeutung geringer Wassermengen für die katalytische Aktivität erkannt [1]. Es wurde beobachtet, dass die katalytische Aktivität und Selektivität vieler Enzyme vom Wassergehalt des Reaktionsmediums abhängt. Zusätzlich wurde beobachtet, dass es eine Korrelation zwischen dem  $\log P$  des Lösungsmittels und der Enzymaktivität gibt [9].

Es gibt zwei Erklärungsansätze, wie das organische Lösungsmittel die katalytische Aktivität von Enzymen beeinflussen könnte. Da sich die Lösungsmittel hinsichtlich ihres  $\log P$ -Wertes unterscheiden, unterscheidet sich auch die Menge des Enzym-gebundenen Wassers in dem jeweiligen Lösungsmittel. Dies könnte einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms haben [162]. Daraufhin wurden umfangreiche Studien durchgeführt, um die Menge des enzym-gebundenen Wassers zu quantifizieren und mit der katalytischen Aktivität zu korrelieren. In Gas/Feststoff-Reaktoren wurden systematische Studien durchgeführt, um die Wasserbindung an Proteine zu quantifizieren [114, 163]. Bis zu einer Wasseraktivität von 0,5 nahm die Anzahl der protein-gebundenen Wassermoleküle linear mit der Wasseraktivität zu, während bei höheren Wasseraktivitäten eine exponentielle Zunahme beobachtet wurde. Nach Kenntnisstand des Autors wurden keine experimentellen Studien durchgeführt, bei denen die Wasserbindung an Proteine in organischen Lösungsmitteln bei niedrigen Wasseraktivitäten untersucht wurde. Sämtliche Untersuchungen wurden in wässrigen Mischungen durchgeführt, bei denen die thermodynamische Aktivität des Wassers annähernd 1 betrug [164].

Der inaktivierende Effekt von Methanol auf die meisten Enzyme ist bekannt und wurde bereits vielfach diskutiert. Allerdings beschäftigten sich die meisten Untersuchungen mehr damit, Möglichkeiten zu finden, die experimentellen Einschränkungen zu umgehen. Informationen über die molekularen und kinetischen Effekte von Methanol auf Enzyme sind deshalb immer noch rar.

Lipasen können durch zwei unterschiedliche Mechanismen durch kurzkettige Alkohole deaktiviert werden. Hohe Konzentrationen kurzkettiger Alkohole können zu einer (partiellen) Entfaltung des Enzyms und so zu einer irreversiblen Deaktivierung führen. So wurde bereits in molekulardynamischen Simulationen gezeigt, dass durch die Adsorption von Alkoholmolekülen an hydrophoben Oberflächen in Ethanol-Wassermischungen die hydrophoben Wechselwirkungen des Proteins gestört werden [165]. Dies wurde auch experimentell durch statische Lichtstreuungsmessungen [166] bestätigt. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Zugabe von Alkoholen zum Reaktionsmedium dazu führt, dass das Protein in einen stärkeren helikalen Zustand übergeht [167]. Des Weiteren agieren viele organische Lösungsmittel als kompetitive Inhibitoren bei Lipasen [131]. Allerdings werden in vielen Publikationen diese beiden Effekte nicht immer klar getrennt.

Die geringe katalytische Aktivität einiger Lipasen (z. B. CALB) bei der Alkoholyse von Triglyceriden [137, 139] wird durch Inhibition erklärt. Dieser Verhalt wurde bereits genauer betrachtet.

Allerdings unterscheiden sich Lipasen beachtlich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Methanol. Während CALB bereits von geringen Methanolkonzentrationen inaktiviert wird, haben andere Lipasen wie die Lipase aus *Burkholderia sp.* eine hohe Methanolstabilität. Dementsprechend nimmt die Ausbeute der Transesterifikation mit zunehmender Methanolkonzentration zu [138, 161].

Um den Effekt von Methanol auf das Enzym besser zu verstehen, wurden molekulardynamische Simulationen von CALB in unterschiedlichen Mischungen mit Methanol bzw. Ethanol durchgeführt und ausgewertet.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Molekulardynamische Simulation von Lösungsmitteln

#### 2.1.1. Molekulardynamische Simulation von aliphatischen Alkoholen

Ein breites Spektrum an 13 aliphatischen Alkoholen, die von industrieller Bedeutung sind, wurde mittels molekulardynamischen Simulationen bei Temperaturen zwischen 288 und 338 K untersucht. Die untersuchten Alkohole decken einen weiten Bereich des logP-Werts ab, der von  $\log P = -0,82$  für Methanol bis  $\log P = 2,9$  für Oktanol reicht. Zu den untersuchten Alkoholen zählen primäre und sekundäre Alkohole, sowie Mono-, Di- und Trialkohole (Abb. 3). Um verlässliche Simulationsergebnisse zu erhalten wurde eine große Anzahl an Molekülen unter konstantem Druck für 50 ns unter periodischen Randbedingungen simuliert. Jedes System wurde dabei fünf Mal simuliert und die Ergebnisse gemittelt. Das OPLS-Kraftfeld wurde verwendet. Dabei wurde das OPLS *all-atom*-Kraftfeld mit dem OPLS *united-atom*-Kraftfeld verglichen. Im OPLS *all-atom*-Kraftfeld werden alle Atome explizit betrachtet, während im OPLS *united-atom*-Kraftfeld die CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen als ein einziges, virtuelles Atom betrachtet werden. Während die simulierte Dichte in Einklang mit experimentellen Werten war, zeigten sich beim Selbstdiffusionskoeffizienten massive Abweichungen. Die Lösungsmittelmodelle wurden deshalb angepasst, indem die Partialladung der Hydroxylgruppe modifiziert wurde. Vier Eigenschaften des molekularen Systems (Dichte, radiale Dichteverteilung, Selbstdiffusionskoeffizient und Permittivität) wurden bei fünf Temperaturen zwischen 288 und 388 K simuliert und mit experimentellen Daten verglichen.

Um qualitativ hochwertige und reproduzierbare Simulationen zu gewährleisten, mussten drei Faktoren berücksichtigt werden:

- (1) Für Systeme des SPC/E-Wassermodells waren die simulierte Dichte (Abb. 43) und der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient (Abb. 44) nur für große Systeme mit mehr als 75.000 Molekülen unabhängig von der Systemgröße. Die simulierte Dichte betrug  $0,996 \text{ g/cm}^3$  und wich nur 0,24 Prozent vom experimentellen Wert ab, während der simulierte Wert des Selbstdiffusionskoeffizienten  $2,746 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  betrug und 16 Prozent vom experimentellen Wert abwich. Für kleine Systeme waren die Dichte und der Selbstdiffusionskoeffizient abhängig von der Größe des Simulationssystems. Für kleine Systeme, bestehend aus 800 Molekülen SPC/E-Wasser, erhöhte sich die Dichte um 0,05 Prozent auf  $0,996 \text{ g/cm}^3$  und der Selbstdiffusionskoeffizient nahm um 6,6 Prozent auf  $2,585 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  ab im Vergleich zu einem System bestehend aus 75.000 Molekülen. Es zeigte sich, dass der

Selbstdiffusionskoeffizient stärker von der Systemgröße abhing als die Dichte. Deshalb wurde eine minimale Systemgröße von 75.000 Atomen verwendet, um sicherzustellen, dass die untersuchten Eigenschaften der Lösungsmittel unabhängig von der Systemgröße sind.

- (2) Die benötigte Equilibrierungszeit, die für eine zuverlässige und reproduzierbare Simulation benötigt wird, ist nicht universell, sondern hängt von der Eigenschaft ab, die untersucht werden soll. Die Dichte erreichte ihren endgültigen Wert von  $0,996 \text{ g/cm}^3$  bereits nach 0,5 ns. Dieser Wert änderte sich auch für längere Simulationszeiten nicht mehr (Abb. 45). Im Gegensatz dazu waren 15 ns nötig, damit der Selbstdiffusionskoeffizienten den endgültigen Wert von  $2,755 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  erreichte und unabhängig von der Equilibrierungszeit wurde. Für kurze Equilibrierungszeiten (1 - 3 ns) war der Selbstdiffusionskoeffizient sehr stark von der Equilibrierungszeit abhängig und wich um mehr als 2 Prozent vom Endwert ab (Abb. 46). Im Gegensatz zur Dichte, die sich kontinuierlich dem Endwert näherte, war der Selbstdiffusionskoeffizient stark von der Equilibrierungszeit abhängig, wenn Letztere nicht ausreichend lang war. Um den Selbstdiffusionskoeffizienten zuverlässig und reproduzierbar zu simulieren, wurde deshalb eine Equilibrierungszeit von 50 ns verwendet. Für die zuverlässige Simulation der Permittivität wurden noch längere Equilibrierungszeiten benötigt: Für kleine Moleküle wie Methanol und Ethanol waren 10 ns Equilibrierungszeit ausreichend, während für Oktanol und Heptanol mindestens 20 ns benötigt wurden. Für die Berechnung der Permittivität war es zudem sehr wichtig, dass über ein ausreichend langes Zeitintervall gemittelt wurde. Wurde die Permittivität nur über einen Zeitraum von 1 ns berechnet, so zeigten sich starke Fluktuationen der simulierten Permittivität von bis zu 50 Prozent (Abb. 47). Um die Permittivität zuverlässig und reproduzierbar zu berechnen, musste über einen Zeitraum von 30 ns gemittelt werden.
- (3) Während die Dichte und die Permittivität experimentell mit hoher Genauigkeit bestimmt werden können, liegt der experimentelle Fehler beim Selbstdiffusionskoeffizienten bei ungefähr 10 Prozent [168, 169]. Diese experimentellen Fehler sollten berücksichtigt werden, wenn die simulierten und experimentellen Werte verglichen werden.
- (4) Für jeden Alkohol wurden fünf Simulationen durchgeführt und ausgewertet. Für die Dichte und den Selbstdiffusionskoeffizienten betragen die Abweichungen zwischen den einzelnen Simulationen weniger als 1, bzw. 5 Prozent (Tab. 1, Tab. 2). Im Gegensatz dazu war die Berechnung der Permittivität weniger reproduzierbar und variierte zwischen den einzelnen Simulationen bis zu 20 Prozent.

Tab. 1: Vergleich von simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten unter Verwendung des OPLS *all-atom*-Kraftfeldes

Alkohol	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
<b>Primäre Monoalkohole</b>						
Methanol	0,7745 ± 0,0009	0,7918 [170]	2,1	3,12 ± 0,04	2,3 [171] 2,32 [172] 2,42 [173] 2,44 [169]	35 34 29 28
Ethanol	0,793 ± 0,002	0,7856 [170]	0,5	1,38 ± 0,08	0,946 [174] 1,01 [172] 1,075 [173] 1,16 [169]	46 37 28 19
1-Propanol	0,7946 ± 0,002	0,8034 [170]	-1,1	0,898 ± 0,05	0,552 [175] 0,59 [169] 0,627 [168]	63 52 43
1-Butanol	0,796 ± 0,001	0,8098 [170]	-1,7	0,400 ± 0,007	0,416 [176] 0,426 [175] 0,456 [168]	-4 -6 -12
1-Pentanol	0,803 ± 0,001	0,8144 [170]	-1,4	0,360 ± 0,006	0,286 [177] 0,296 [176]	26 22
1-Hexanol	0,809 ± 0,001	0,8136 [170]	-0,6	0,222 ± 0,006	0,218 [176]	2
1-Heptanol	0,815 ± 0,001	0,8187 [170]	-0,5	0,149 ± 0,005	0,172 [176]	-13
1-Oktanol	0,827 ± 0,001	0,824 [170]	0,4	0,11 ± 0,004	0,138 [176] 0,138 [175]	-20 -20
<b>Sekundäre Monoalkohole</b>						
2-Propanol	0,799 ± 0,001	0,786 [170]	1,7	0,638 ± 0,06	0,582 [169]	9
<b>Dialkohole</b>						
Ethylenglycol	1,072 ± 0,001	1,1132 [170]	-3,7	0,138 ± 0,007	0,0961 [178]	43
1,2-Propandiol	1,031 ± 0,001	1,036 [170]	-0,5	0,018 ± 0,004	0,041 [179]	-54
1,3-Propandiol	1,0449 ± 0,0009	1,0597 [170]	-1,4	0,022 ± 0,004	0,041 [179]	-44
<b>Trialkohole</b>						
Glycerol	1,1865 ± 0,001	1,2633 [170]	-6,1	0,251 ± 0,006	0,0013 [180]	-



Tab. 2: Vergleich von simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten unter Verwendung des modifizierten OPLS *all-atom*-Kraftfeldes.

Alkohol	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
<b>Primäre Monoalkohole</b>						
Methanol	0,775 ± 0,0008	0,7918 [170]	-2,1	2,41 ± 0,04	2,3 [171]	5
					2,32 [172]	4
					2,42 [173]	-1
					2,44 [169]	-1
Ethanol	0,791 ± 0,001	0,7856 [170]	0,7	1,16 ± 0,08	0,946 [174]	22
					1,01 [172]	15
					1,075 [173]	8
					1,16 [169]	0,0
1-Propanol	0,7989 ± 0,001	0,8034 [170]	-0,6	0,617 ± 0,05	0,552 [175]	12
					0,59 [169]	5
					0,627 [168]	-26
1-Butanol	0,798 ± 0,001	0,8098 [170]	-1,5	0,452 ± 0,007	0,416 [176]	9
					0,426 [175]	6
					0,456 [168]	-1
1-Pentanol	0,804 ± 0,001	0,8144 [170]	-1,3	0,301 ± 0,006	0,286 [177]	5
1-Hexanol	0,809 ± 0,001	0,8136 [170]	-0,6	0,218 ± 0,006	0,296 [176]	0,5
1-Heptanol	0,814 ± 0,001	0,8187 [170]	-0,6	0,175 ± 0,005	0,218 [176]	0,0
1-Oktanol	0,819 ± 0,001	0,824 [170]	-0,6	0,136 ± 0,004	0,172 [176]	1,7
					0,138 [176]	-2
					0,138 [175]	-2
<b>Sekundäre Monoalkohole</b>						
2-Propanol	0,798 ± 0,001	0,786 [170]	1,5	0,571 ± 0,06	0,582 [169]	-1,9
<b>Dialkohole</b>						
Ethylenglycol	1,079 ± 0,001	1,1132 [170]	-2,7	0,095 ± 0,007	0,0961 [178]	-0,7
1,2-Propandiol	1,031 ± 0,001	1,036 [170]	-0,9	0,041 ± 0,004	0,041 [179]	-1,2
1,3-Propandiol	1,0449 ± 0,0009	1,0597 [170]	-1,8	0,041 ± 0,004	0,041 [179]	-0,8
<b>Trialkohole</b>						
Glycerol	1,2108 ± 0,0005	1,2633 [170]	-3,1	0,0017 ± 0,0005	0,0013 [180]	24,1

### 2.1.1.1. Vergleich des OPLS *all-atom*- und *united-atom*-Kraftfelds

Für Monoalkohole war das OPLS *all-atom*-Kraftfeld in der Lage, die experimentell bestimmte Dichte mit Abweichungen zwischen 0,4 und 2,2 Prozent wiederzugeben (Tab. 1). Im Gegensatz dazu wich der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient um bis zu 43 Prozent von den experimentellen Werten ab. Für Dialkohole war dies noch stärker ausgeprägt: Die Abweichung der Dichte lag zwischen 0,5 und 4 Prozent, während die Abweichung des Selbstdiffusionskoeffizienten zwischen 44 und 54 Prozent lag. Glycerol war der einzige Alkohol, bei dem auch die Dichte mit 6,1 Prozent stark vom experimentellen Wert abwich. Der Selbstdiffusionskoeffizient wurde hier um drei Größenordnungen überschätzt. Es wurde keine Korrelation zwischen der Abweichung der Dichte und des Selbstdiffusionskoeffizienten oder zwischen der Abweichung der Dichte und des Molekulargewichts des jeweiligen Alkohols beobachtet. Allerdings gab es einen Trend bei der Abweichung des Selbstdiffusionskoeffizienten: Während der Selbstdiffusionskoeffizient bei Methanol 28 Prozent über dem experimentellen Wert lag, nahm die Abweichung mit zunehmendem Molekulargewicht ab. Bei Hexanol war der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient dann fast deckungsgleich mit dem experimentellen Wert, während er bei Oktanol 20 Prozent unter dem experimentellen Wert lag.

Für sieben aliphatische Alkohole wurden Simulationen mit dem OPLS *united-atom*-Kraftfeld durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass die Dichte für alle Alkohole mit Abweichungen unter 4,5 Prozent gut wiedergegeben wurde. Glycerol war auch hier die Ausnahme mit einer Abweichung von 62 Prozent. Im Gegensatz dazu wurde der Selbstdiffusionskoeffizient um den Faktor 3 überschätzt. Für Glycerol war der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient um den Faktor 1.000 höher als der experimentelle Wert (Tab. 3).

Die geringen Abweichungen zwischen der simulierten Dichte und den experimentellen Werten lassen darauf schließen, dass die lokale Struktur der Alkohole durch beide Kraftfelder korrekt wiedergegeben wird. Dies wurde durch die Analyse der radialen Dichteverteilung bestätigt, die zwischen dem primären bzw. sekundären Kohlenstoffatom der primären bzw. sekundären Alkohole berechnet wurde (Abb. 48). Die radiale Dichteverteilung war für beide Kraftfelder ähnlich und in Bezug auf die Position und Amplitude der Minima und Maxima in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten.

**Tab. 3: Vergleich von simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten unter Verwendung des OPLS *united-atom*-Kraftfeldes**

Alkohol	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusions- koeffizient [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
Methanol	0,7612 ± 0,0004	0,7918 [45]	-3,6	2,70 ± 0,02	2,3 [171]	17
					2,32 [172]	16
					2,42 [173]	12
					2,44 [169]	11
Ethanol	0,7503 ± 0,0006	0,7856 [45]	-4,5	2,15 ± 0,04	0,946 [174]	127
					1,01 [172]	113
					1,075 [173]	100
					1,16 [169]	85
1-Propanol	0,7812 ± 0,0006	0,8034 [45]	-2,7	1,33 ± 0,03	0,552 [175]	141
					0,59 [169]	125
2-Propanol	0,7778 ± 0,0006	0,786 [45]	-1,1	0,99 ± 0,03	0,627 [168]	112
1-Butanol	0,8014 ± 0,0005	0,8098 [45]	-0,1	1,00 ± 0,01	0,582 [169]	70
					0,416 [176]	140
					0,426 [175]	135
1-Oktanol	0,8411 ± 0,0006	0,83 [45]	1,3	0,51 ± 0,02	0,456 [168]	119
					0,138 [176]	270
Glycerol	0,473 ± 0,0005	1,2633 [45]	-62,4	1,11 ± 0,06	0,138 [175]	270
					0,0013 [180]	NA

Während beide OPLS-Kraftfelder in der Lage waren, die lokale Struktur zuverlässig zu reproduzieren, unterschied sich ihre Fähigkeit, die dynamischen Eigenschaften des Systems zu beschreiben. Es gibt zwei grundlegende Unterschiede zwischen dem OPLS *all-atom*- und dem OPLS *united-atom*- Kraftfeld:

- (1) Im *united-atom* Kraftfeld sind die CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen zu einem virtuellen Atom zusammengefasst, während im *all-atom*-Kraftfeld jedes Atom explizit behandelt wird.
- (2) Die beiden Kraftfelder unterscheiden sich in den Partiaalladungen. Während im *all-atom*-Kraftfeld die Partiaalladung des Sauerstoffs in der Hydroxylgruppe -0,683 beträgt, hat sie im *united-atom*-Kraftfeld eine Ladung von -0,690.

Um herauszufinden, welcher der beiden Faktoren für die starken Abweichungen des Selbstdiffusionskoeffizienten im *united-atom*-Kraftfeld verantwortlich ist, wurden Simulationen durchgeführt, bei denen die Partiaalladungen des *all-atom*-Kraftfeldes auf die Lösungsmittelmodelle des *united-atoms*-Kraftfelds übertragen wurden. Dies führte zu einer beachtlichen Verbesserung des Selbstdiffusionskoeffizienten, während sich die Dichte nur minimal veränderte. Für alle Alkohole, mit der Ausnahme von Methanol, verbesserte sich der Selbstdiffusionskoeffizient (Tab. 4). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Partiaalladungen einen starken Einfluss auf die dynamischen Eigenschaften haben und daher geeignet sind, die Lösungsmittelmodelle zu optimieren.

Tab. 4: Vergleich von simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten unter Verwendung des *united-atom*-Kraftfeldes mit den Partialladungen des *all-atom*-Kraftfeldes

Alkohol	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusions- koeffizient [10 <sup>-9</sup> •m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> •m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
<b>Primäre Monoalkohole</b>						
Methanol	0,7550 ± 0,0003	0,7918 [45]	-4,4	3,787 ± 0,0048	2,3 [174]	65
					2,32 [172]	63
					2,42 [173]	56
					2,44 [169]	55
Ethanol	0,7483 ± 0,0004	0,7856 [45]	-5,1	1,034 ± 0,0218	0,946 [174]	9
					1,01 [172]	2
					1,075 [173]	-4
					1,16 [169]	-10
1-Propanol	0,7833 ± 0,0004	0,8034 [45]	-2,1	0,538 ± 0,002	0,552 [175]	-3
					0,59 [169]	-9
2-Propanol	0,7866 ± 0,0004	0,786 [45]	0,8	0,594 ± 0,002	0,582 [169]	-14
1-Butanol	0,754 ± 0,097	0,8098 [45]	-6,9	0,445 ± 0,013	0,416 [176]	7
					0,426 [175]	4
					0,456 [168]	-2
1-Oktanol	0,892 ± 0,002	0,83 [45]	7,5	0,009 ± 0,0008	0,138 [176]	-93
					0,138 [175]	-93

### 2.1.1.2. Modifizierung der Partialladungen

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Veränderung der Partialladungen auf die Dichte und den Selbstdiffusionskoeffizienten hat, wurden die Partialladungen der *all-atom*-Alkoholmodelle verändert. Dazu wurde die Polarität der Hydroxylgruppe leicht erhöht, während die Partialladung der CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen konstant gehalten wurde. Durch gleichzeitiges Ändern der Partialladungen des Sauerstoff- und des Wasserstoffatoms wurde die Dichte und der Selbstdiffusionskoeffizient verändert. Für Methanol wurde die Partialladung des Sauerstoffatoms um 2,2 Prozent gegenüber der OPLS *all-atom*-Partialladung von -0,683 auf -0,699 erhöht. Infolgedessen nahm die Dichte um 0,1 Prozent zu, während der Selbstdiffusionskoeffizient um 29 Prozent von  $3,12 \cdot 10^{-9}$  auf  $2,41 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s abnahm, was annähernd dem experimentellen Wert von  $2,44 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s entsprach (Tab. 2). Die Empfindlichkeit der Dichte und des Selbstdiffusionskoeffizienten gegenüber der Polarität der Hydroxylgruppe unterschied sich um mehr als zwei Größenordnungen. Die Sensitivität bzw. Empfindlichkeit ist definiert als das Verhältnis der prozentualen Änderung der jeweiligen Eigenschaft (Dichte, Selbstdiffusionskoeffizient) und der prozentualen Änderung der Partialladung des Sauerstoffs. Bei Methanol beträgt die Empfindlichkeit der Dichte ( $S_{\text{Dichte}}$ ) 0,05, während sie für den Selbstdiffusionskoeffizienten 48 beträgt ( $S_{\text{Diffusion}}$ ). Für alle anderen aliphatischen Alkohole - mit Ausnahme vom Glycerol - wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Durch Veränderungen der Polarität der Hydroxylgruppe zwischen 0,3 und 3,2 Prozent (Tab. 5) konnten molekulare Modelle erstellt werden, deren simulierte Dichte und Selbstdiffusionskoeffizienten weniger als 3 Prozent bzw. 2 Prozent von den entsprechenden experimentellen Werten abweichen (Tab. 2). Es wurde bei keinem Alkohol beobachtet, dass einer Veränderung der Polarität der Hydroxylgruppe zu einer Veränderung der radialen Dichteverteilung führt. Allerdings wurden leichte Veränderungen der Permittivität beobachtet. Mit Ausnahme von 1,3-Propanediol wird die Permittivität bei allen Alkoholen durch das OPLS *all-atom*-Kraftfeld unterschätzt (Tab. 6). Indem die Polarität der Hydroxylgruppe erhöht wurde, wurde auch die Permittivität größer und näherte sich dem experimentellen Wert an. Die Permittivität von Methanol verbesserte sich von 25 (OPLS) auf 27 (modifiziert) und war dadurch näher am experimentellen Wert von 32,63. Die Empfindlichkeit der Permittivität gegenüber der Polarität der Hydroxylgruppe war dabei höher als die Empfindlichkeit der Dichte, aber geringer als die Empfindlichkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten. Die Modifikation der Partialladung des OPLS Modelles führte bei

Methanol dazu, das sich die Permittivität um 7,7 Prozent erhöhte, woraus eine Empfindlichkeit von 3,4 resultierte.

**Tab. 5: Partiaalladung der Hydroxylgruppe der modifizierten Alkoholmodelle**

Alkohol	modifizierte Partiaalladung des Wasserstoffatoms	modifizierte Partiaalladung des Sauerstoffatoms	Unterschied zu OPLS in %
<b>Primäre Monoalkohole</b>			
Methanol	0,433	-0,698	-2,2
Ethanol	0,425	-0,690	-1,0
1-Propanol	0,433	-0,698	-2,2
1-Butanol	0,428	-0,693	-1,5
1-Pentanol	0,426	-0,691	-1,2
1-Hexanol	0,420	-0,685	-0,3
1-Heptanol	0,409	-0,674	1,3
1-Oktanol	0,405	-0,670	1,9
<b>Sekundäre Monoalkohole</b>			
2-Propanol	0,422	-0,687	-0,6
<b>Dialkohole</b>			
Ethylenglycol	0,433	-0,698	-2,2
1,2-Propandiol	0,396	-0,661	3,2
1,3-Propandiol	0,406	-0,671	1,7

**Tab. 6: Partiaalladung des Glycerols in unterschiedlichen Kraftfeldern**

Atom	Ladung OPLS [49]	Ladung Blicck [76]	Ladung in dieser Arbeit
C1, C3	0,145	0,182	0,182
C2	0,205	0,055	0,055
Hydroxyl O	-0,683	-0,6048	-0,6948
Hydroxyl H	0,418	0,4158	0,5058
Nicht-hydroxyl H1 und H3	0,06	0,026	0,026
Nicht-hydroxyl H2	0,06	0,04	0,04



Es wurden zwei systematische Trends beobachtet:

- (1) Die Abweichung des simulierten Selbstdiffusionskoeffizienten vom experimentellen Wert korreliert mit dem Molekulargewicht des jeweiligen Alkohols, wenn das unmodifizierte OPLS *all-atom* Kraftfeld verwendet wird (Tab. 1). Die Partialladungen des modifizierten OPLS Kraftfelds waren deswegen abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Alkohols (Tab. 5), während im OPLS Kraftfeld die Partialladungen bei allen Alkoholen identisch sind. Für kurzkettige Alkohole, wie Methanol, Ethanol und 1-Propanol waren die modifizierten Partialladungen ungefähr 0,015 negativer als die Partialladungen des OPLS *all-atom* Kraftfeldes. Für Hexanol waren die Partialladungen im unmodifizierten und im modifizierten OPLS *all-atom* Kraftfeld annähernd identisch, während für Oktanol die Partialladung im modifizierten Kraftfeld 0,01 positiver war als im OPLS *all-atom*-Kraftfeld. Für primäre Alkohole nahm die Empfindlichkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten ( $S_{\text{Diffusion}}$ ) mit zunehmendem Molekulargewicht ab: Für Methanol betrug sie 48, während sie für Oktanol 2 betrug (Abb. 49). Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass das OPLS *all-atom* Kraftfeld sehr gut dazu geeignet ist, die Dichte und den Selbstdiffusionskoeffizienten der n-Alkane zu modellieren (Daten nicht gezeigt). Für langkettige Alkohole wie Oktanol ist es anzunehmen, dass der Anteil der Alkylgruppe die Eigenschaften des molekularen Systems dominiert. Bei kurzkettigen Alkoholen ist der Beitrag der Hydroxylgruppe allerdings stärker.
- (2) Die Partialladungen für primäre und sekundäre Hydroxylgruppen unterschieden sich im modifizierten Kraftfeld. Die Partialladung im modifizierten Kraftfeld betrug für das Sauerstoffatom des 2-Propanol-Modells -0,687 und war damit 1,5 Prozent positiver als die Partialladung des Sauerstoffatoms in der primären Hydroxylgruppe des 1-Propanols (-0,698). Allerdings waren beide Partialladungen negativer als die entsprechenden Partialladungen im unmodifizierten OPLS Kraftfeld (-0,683). Die modifizierten Partialladungen der Sauerstoffatome betragen bei Ethylenglycol -0,698 und waren damit negativer als die entsprechenden Partialladungen für Ethanol (-0,690). Für 1- und 2-Propanol betragen die modifizierten Partialladungen -0,698 und -0,687. Die Partialladungen für 1,3- und 1,2-Propandiol waren mit -0,661 und -0,671 deutlich positiver. Die Partialladungen der Dialkohole waren folglich nicht übertragbar: Die

modifizierten Partialladungen des Sauerstoffs in 1,2-Propanediol waren 5,3 und 3,8 Prozent positiver als die entsprechenden Partialladungen in 1- und 2-Propanol.

### 2.1.1.3. Optimierung des Glycerolmodells

Für die Optimierung des Glycerolmodells wurde zuerst von den OPLS *all-atom*-Partialladungen ausgegangen. Allerdings war es nicht möglich, die Partialladungen der drei Hydroxylgruppen so zu modifizieren, dass sowohl die Dichte als auch der Selbstdiffusionskoeffizient in Einklang mit experimentellen Daten war (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde ein bereits publizierter Satz an Partialladungen für Glycerol verwendet [76, 181] (Tab. 7), der es ermöglichte, die Dichte mit einer Abweichung von 5,3 Prozent zum experimentellen Wert zu simulieren. Allerdings wich der Selbstdiffusionskoeffizient immer noch um den Faktor 20 ab (Tab. 7). Dieser Satz an Partialladungen wurde als Ausgangspunkt für die weitere Optimierung verwendet. Die Partialladung des Sauerstoffs wurde um 15 Prozent von  $-0,6048$  auf  $-0,6948$  erniedrigt, wodurch der Selbstdiffusionskoeffizient von  $0,024 \cdot 10^{-9}$  auf  $0,0017 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  abnahm, was in der Nähe des experimentellen Wertes war. Die Dichte nahm dabei nur um 2 Prozent zu und wich nach der Optimierung nur noch 3 Prozent vom experimentellen Wert ab. Die Empfindlichkeit der Dichte ( $S_{\text{Dichte}}$ ) betrug somit 0,25, während die Empfindlichkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten ( $S_{\text{Diffusion}}$ ) 100 betrug und somit um zwei Größenordnungen größer war.

**Tab. 7: Vergleich von simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten für das Glycerolmodell unter Verwendung unterschiedlicher Partiaalladungen**

Kraftfeld	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimentelle Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentuale Abweichung	simulierter Selbst-diffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> •m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Selbst-diffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> •m <sup>2</sup> /s]	prozentuale Abweichung
OPLS	1,1865 ± 0,002	1,261 [170]	-6,1	0,251 ± 0,0059	0,00137 [180]	> 100
Blieck et al. [76]	1,194 ± 0,001	1,261 [170]	-5,3	0,024 ± 0,007	0,00137 [180]	> 100
Diese Arbeit	1,2108 ± 0,0005	1,261 [170]	-3,1	0,0017 ± 0,0006	0,00137 [180]	24,1

**Tab. 8: Thermischer Ausdehnungskoeffizient für das OPLS *all-atom*- und das modifizierte Kraftfeld**

Alkohol	$\gamma$ (experimentell) [1/K]	$\gamma$ (OPLS) [1/K]	prozentuale Abweichung	$\gamma$ (modifiziert) [1/K]	prozentuale Abweichung
Methanol	0,1209 [170]	0,1587	31	0,1439	19
Ethanol	0,1106 [170]	0,1469	33	0,1280	16
1-Propanol	0,0228 [170]	0,0346	52	0,0325	43
2-Propanol	0,1208 [170]	0,1421	18	0,1675	39
1-Butanol	0,0201 [170]	0,0312	56	0,0293	46
1-Pentanol	0,1379 [170]	0,1245	-10	0,1202	-13
1-Hexanol	0,1917 [170]	0,0298	-84	0,0285	-85
Ethylenglycol	0,0097 [170]	0,0187	93	0,0233	140
Glycerol	0,0011 [170]	0,0033	208	0,0017	58

#### **2.1.1.4. Temperaturabhängigkeit der Dichte und des Selbstdiffusionskoeffizienten**

Die Optimierung der Lösungsmittelmodelle wurde bei 298 K durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die optimierten Lösungsmittelmodelle auch für einen breiteren Temperaturbereich geeignet sind. Dazu wurden Simulationen im Temperaturbereich von 288 K bis 338 K durchgeführt. Dabei wurde das OPLS *all-atom*-Kraftfeld mit dem Kraftfeld mit den optimierten Partialladungen verglichen. Die Dichte und der Selbstdiffusionskoeffizient wurden für beide Kraftfelder berechnet und mit experimentellen Daten verglichen, soweit diese verfügbar waren.

Im Temperaturbereich von 288 K bis 338 K nahm die Dichte linear mit der Temperatur ab. Die Steigung entsprach dabei dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten (Tab. 8, Abb. 50).

**Tab. 9:  $E_a$  Fit für den Selbstdiffusionskoeffizienten für das OPLS *all-atom*- und das modifizierte Kraftfeld**

	$E_a$ (experimentell) [kJ/mol]	$E_a$ (OPLS) [kJ/mol]	Abweichung vom experimentellen Wert [%]	$E_a$ (modifiziert) [kJ/mol]	Abweichung vom experimentellen Wert [%]
Methanol	-12,9 [177]	-14,5	12,9	-15,3	16,0
Ethanol	-19,0 [177]	-18,2	-4,2	-18,8	-1,1
1-Propanol	-21,7 [177]	-20,8	-4,3	-22,9	5,1
2-Propanol	-24,1 [177]	-24,2	0,5	-23,8	-1,5
1-Butanol	-22,8 [177]	-22,1	-3,1	-23,5	3,0
Glycerol	-56,2 [177]	-38,0	-32,4	-45,3	-24,0

Für die Alkohole, die mit den modifizierten Partialladungen simuliert wurden, wich der simulierte thermische Ausdehnungskoeffizient zwischen 10 und 56 Prozent von den experimentellen Werten ab. Für alle Alkohole - mit Ausnahme von Pentanol und Hexanol - war der simulierte Wert größer als der experimentell bestimmte Wert. Für die meisten Alkohole verbesserte sich der thermische Ausdehnungskoeffizient um ca. 15 Prozent, wenn die modifizierten Partialladungen anstelle der OPLS-Partialladungen verwendet wurden. Eine Ausnahme bildete hier Ethylenglycol, dessen thermischer Ausdehnungskoeffizient um 93 Prozent (OPLS) bzw. 140 Prozent (modifizierte Partialladungen) überschätzt wurde. Im Gegensatz dazu wich der thermische Ausdehnungskoeffizient von Glycerol mit den modifizierten Kohlenstoff und Sauerstoffpartialladungen nur um 58 Prozent von den experimentellen Werten ab. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für eine weitere Verbesserung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten auch die Partialladungen der Kohlenstoffatome des Ethylenglycols verändert werden müssen, so wie dies für Glycerol der Fall war. Um den Effekt der Temperatur auf den Selbstdiffusionskoeffizienten zu untersuchen, wurde die Steigung des Selbstdiffusionskoeffizienten über die Temperatur gefittet und die Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) [182] berechnet. Mit Ausnahme von Glycerol wichen diese Werte um weniger als 16 Prozent von den experimentellen Werten ab (Tab. 10). Im Gegensatz zum Selbstdiffusionskoeffizienten, der stark von den Partialladungen abhing, war die Temperaturabhängigkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten weniger stark von den Partialladungen abhängig.

**Tab. 10: Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Permittivität für das OPLS *all-atom*-Kraftfeld und das modifizierte Kraftfeld**

Alkohol	Permittivität (experimentell)	Permittivität (OPLS)	Abweichung vom experimentellen Wert [%]	Permittivität (modifiziert)	Abweichung vom experimentellen Wert [%]
Methanol	32,6 [183]	25,2	-22,8	27,7	-15,1
Ethanol	24,3 [183]	18,3	-24,7	18,9	-22,2
1-Propanol	20,1 [183]	13,1	-34,8	14,5	-27,9
2-Propanol	18,3 [183]	12,4	-32,2	13,0	-29,0
1-Butanol	17,1 [183]	10,7	-37,4	11,4	-33,3
1-Pentanol	13,9 [183]	5,2	-62,6	8,9	-36,0
1-Hexanol	13,3 [183]	8,1	-39,1	8,6	-35,3
1-Heptanol	12,1 [183]	8,2	-32,2	8,9	-26,4
1-Oktanol	10,3 [183]	3,7	-64,1	2,9	-71,8
Ethylenglycol	37,0 [183]	16,8	-54,6	18,5	-50,0
1,2-Propandiol	32,0 [183]	12,6	-60,6	10,1	-68,4
1,3-Propandiol	35,0 [183]	42,1	20,3	37,2	6,3
Glycerol	42,5 [183]	18,6	-56,2	40,0	-5,9

**Tab. 11: Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten unter Verwendung des OPLS *all-atom*-Kraftfeldes**

Lösungsmittel	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
Tetrahydrofuran	0,786	0,791	0,6	4,342	4,77	9,0
Acetonitril	0,746	0,786	5,1	4,941	4,30	-14,9
Dimethylformamid	0,911	0,948	3,9	1,474	1,64	10,1
Aceton	0,786	0,791	0,6	4,342	4,77	9,0

## 2.1.2. Molekulardynamische Simulation von weiteren Lösungsmitteln

### 2.1.2.1. Grüne Lösungsmittel

Aus der biotechnologisch interessanten Gruppe der grünen Lösungsmittel wurden vier Vertreter (Tetrahydrofuran, Acetonitril, Dimethylformamid und Aceton) ausgewählt und mit dem OPLS *all-atom*-Kraftfeld parametrisiert. Auch hier zeigte sich, dass die Dichte in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten war, während der Selbstdiffusionskoeffizient zwischen 9 und 15 Prozent vom experimentellen Wert abwich (Tab. 11).

Analog zur Optimierung der Alkohole wurde bei den grünen Lösungsmitteln die Partialladung der funktionellen Gruppe optimiert. Es zeigte sich, dass der Selbstdiffusionskoeffizient mit dieser Methode für fast alle Modelle auf den experimentellen Wert eingestellt werden kann (Tab. 12). Für Dimethylformamid, Tetrahydrofuran und Aceton wurde die Partialladung der funktionellen Gruppe um jeweils 2 Prozent reduziert, während sie für Acetonitril um 2 Prozent erhöht wurde.

Allerdings zeigen die optimierten Modelle Abweichungen von 1,5 bis 5,4 Prozent in der Dichte. Diese Abweichungen konnten durch eine Änderung der Partialladungen nicht reduziert werden. Für eine weitere Optimierung müssten die Partialladungen der anderen Atome des jeweiligen Moleküls in den Optimierungsvorgang mit einbezogen werden.

### 2.1.2.2. Alkane

Da CALB eine hohe Stabilität und Aktivität in Heptan und Oktan zeigt, sollte auch die Gruppe der Alkane untersucht werden. Für unverzweigte Alkane zeigten die Modelle des OPLS *all-atom*-Kraftfelds Abweichungen von 3 Prozent in der Dichte und 11 Prozent beim Selbstdiffusionskoeffizienten. Für verzweigte Alkane und zyklische Alkane betragen die Abweichungen unter Verwendung des OPLS *all-atom*-Kraftfelds hingegen 12 Prozent für die Dichte und 21 Prozent für den Selbstdiffusionskoeffizienten (Tab. 13). Dies lässt darauf schließen, dass die Alkylgruppe im OPLS Kraftfeld sehr gut parametrisiert ist, sowohl was die thermodynamischen als auch die dynamischen Eigenschaften angeht. Für eine weitere Optimierung müssten hier die Partialladungen der Kohlenstoffe und Wasserstoffe berücksichtigt werden.



**Tab. 12: Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten unter Verwendung des modifizierten Kraftfeldes**

Lösungsmittel	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
Tetrahydrofuran	0,841	0,889	5,4	2,840	2,84	0,0
Acetonitril	0,759	0,786	3,4	4,217	4,30	1,9
Dimethylformamid	0,905	0,948	4,5	1,667	1,64	-1,7
Aceton	0,779	0,791	1,5	4,618	4,77	3,2

**Tab. 13: Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Dichten und Selbstdiffusionskoeffizienten der Alkane unter Verwendung des OPLS *all-atom*-Kraftfeldes**

Lösungsmittel	simulierte Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	experimenteller Wert [g/cm <sup>3</sup> ]	prozentualer Unterschied	simulierter Selbstdiffusionskoeffizient [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	experimenteller Wert [10 <sup>-9</sup> ·m <sup>2</sup> /s]	prozentualer Unterschied
<b>Unverzweigte Alkane</b>						
Pentan	0,6137 ± 0,0009	0,63	-2,6	5,0 ± 0,1	5,62	-10,5
Hexan	0,651 ± 0,001	0,654	-0,5	NA	ND	NA
Heptan	0,678 ± 0,001	0,68	-0,2	2,7 ± 0,1	3,1	-11,4
<b>Verzweigte und zyklische Alkane</b>						
Isopentan	0,673 ± 0,001	0,62	8,6	3,83 ± 0,03	4,85	-20,9
Isooctan	0,725 ± 0,001	0,691	4,9	NA	ND	NA
Cyclohexan	0,869 ± 0,001	0,778	11,7	1,5 ± 0,6	1,424	11,8

### 2.1.2.3. Vinylacetat

Vinylacetat ist ein weiteres wichtiges Lösungsmittel. Dieses Lösungsmittel diente im Experiment als Substrat und wurde in Konzentrationen von 15,2 Prozent (vol/vol) zur Reaktionsmischung zugegeben, um die Reaktion zu starten. Deshalb wurde das Modell von Vinylacetat im OPLS *all-atom*-Kraftfeld parametrisiert und auf seine Eignung untersucht. Es wurde eine Abweichung von 0,6 Prozent in der Dichte und 4,2 Prozent beim Selbstdiffusionskoeffizienten beobachtet. Da diese Werte bereits in guter Übereinstimmung mit experimentellen Werten waren, wurde auf eine Optimierung des Modells verzichtet und das OPLS *all-atom*-Modell für die weiteren Simulationen verwendet.

### 2.1.2.4. Toluol

Da die Simulation von CALB in einer nicht-wässrigen Lösung bei geringen Wasseraktivitäten durchgeführt werden sollte, musste ein nicht-wässriges, im Experiment inertes Lösungsmittel ausgewählt werden. Die Wahl fiel aufgrund seiner Eignung im Experiment auf Toluol. Für Toluol standen bereits drei publizierte Kraftfelder zur Verfügung. Für jedes Kraftfeld wurde ein Modell erstellt, simuliert und die Dichte und der Selbstdiffusionskoeffizient mit experimentellen Dichten verglichen (Tab. 14).

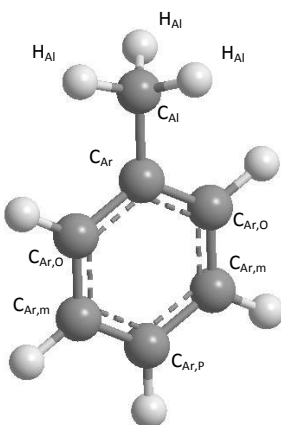
**Tab. 14: Vergleich der unterschiedlichen Kraftfelder für Toluol**

	OPLS	Kim [184]	Fioroni [185]	Literatur
Dichte	0,894 + 0,001 (+3,1%)	0,935 + 0,001 (+7,8%)	0,877 + 0,001 (+1,1%)	0,8669
Selbstdiffusionskoeffizient	1,48 + 0,02 (-34,8%)	0,707 + 0,04 (-68,8%)	2,3896 + 0,0297 (+4,84%)	2,27

Es zeigte sich, dass sowohl die Dichte als auch der Selbstdiffusionskoeffizient des OPLS *all-atom*-Modells vom experimentellen Wert abwichen. Das publizierte Kraftfeld von Fioroni [185] resultierte in deutlich geringeren Abweichungen. Bei der Betrachtung der Partialladungen der Toluolmodelle fiel auf, dass im OPLS *all-atom*-Kraftfeld alle fünf Kohlenstoffatome des Rings die gleiche Partialladung haben, während nur das Kohlenstoffatom, das mit der Methylgruppe verbunden ist, eine andere Partialladung hat. Bei Kim und Fioroni unterscheiden sich die Partialladungen der C-Atome und zeigen ein alternierendes Verhalten (Tab. 15).

**Tab. 15: Partialladungen für Toluol in den unterschiedlichen Kraftfeldern**

	OPLS	Kim [184]	Fioroni [185]
C <sub>ar</sub>	-0,115	-0,007	0,25
C <sub>ar,o</sub>	-0,115	-0,163	-0,223
C <sub>ar,m</sub>	-0,115	-0,141	-0,045
C <sub>ar,p</sub>	-0,115	-0,16	-0,128
C <sub>al</sub>	-0,065	-0,339	-0,278
H <sub>ar,o</sub>	0,115	0,144	0,113
H <sub>ar,m</sub>	0,115	0,147	0,075
H <sub>ar,p</sub>	0,115	0,145	0,108
H <sub>al</sub>	0,06	0,129	0,079



**Abb. 5: Darstellung von Toluol mit den oben erwähnten Atomtypen**

Da die Modelle allerdings nicht nur als Reinstoff von Interesse waren, sondern in ternären Mischungen zum Einsatz kommen sollten, wurde zusätzlich der Verteilungskoeffizient des Toluols in einer Mischung aus Wasser und Toluol bestimmt. Dazu wurde ein zweiphasiges System aus 65.300 Molekülen Toluol und 985.860 Molekülen Wasser über einen Zeitraum von 250 ns simuliert. Anschließend wurde über die letzten 100 ns der Simulation gemittelt, wieviel Moleküle sich in der jeweils anderen Phase befanden.

Der experimentelle Wert für die Löslichkeit von Toluol in Wasser betrug 0,52 g/l, was einem Stoffmengenanteil von  $1,02 \cdot 10^{-4}$  entsprach. Dieser Wert wurde zudem mit dem UNIFAC-Modell [186] berechnet, was einen Stoffmengenanteil von  $9,31 \cdot 10^{-5}$  lieferte. Der theoretische Wert lag dabei 8,6 Prozent unter dem experimentellen Wert. Für die Löslichkeit von Wasser in Toluol betrug die Löslichkeit 0,03 Prozent (vol/vol), was einem Stoffmengenanteil Wasser von  $1,761 \cdot 10^{-3}$  entsprach. Das UNIFAC-Modell [186] lieferte hier einen Wert von  $1,671 \cdot 10^{-3}$ , was 5,1 Prozent vom experimentellen Wert abwich.

Bei Verwendung des OPLS *all-atom*-Kraftfelds und des SPC/E-Wassermodells wurde die Löslichkeit von Wasser in Toluol um 2,5 Prozent und die Löslichkeit von Toluol in Wasser um 1,6 Prozent unterschätzt. Das Modell von Fioroni [185] unterschätzte die Löslichkeit von Wasser in Toluol um 90 Prozent und die Löslichkeit von Toluol in Wasser um 99,7 Prozent (eine Größenordnung) (Tab. 16). Für das Modell von Kim [184] wurde die Löslichkeit nicht durch molekulardynamische Simulationen untersucht, da das Modell sowohl in der Dichte als auch in der Diffusion stark von experimentellen Werten abwich.

**Tab. 16: Vergleich des OPLS *all-atom* und des Fioroni-Modells für Toluol für die Löslichkeit**

	Wasser in Toluol	Toluol in Wasser	Stoffmengenanteil Wasser	prozentuale Abweichung	Stoffmengenanteil Toluol	prozentuale Abweichung
<b>OPLS</b>	111,81	93,27	0,00171225	2,5	0,00009461	1,6
<b>Fioroni</b>	10,86	5,21	0,00016631	-90,0	0,00000528	-99,7

Auf eine weitere Optimierung des Toluol-Modells auf Grundlage des OPLS *all-atom*-Modells für Toluol wurde verzichtet. Für die Optimierung hätte das Alternieren der Partialladungen, wie es im Fioroni-Modell zu beobachten war, in die Optimierung integriert werden müssen, um sowohl die Dichte als auch den Selbstdiffusionskoeffizienten korrekt wiederzugeben. Zudem hätten vermutlich die van-der-Waals-Parameter bei der Optimierung angepasst werden müssen.

Für die weiteren Simulationen wurde das OPLS *all-atom*-Modell von Toluol verwendet. Die Entscheidung basierte darauf, dass der simulierte Verteilungskoeffizient und die mit dem UNIFAC-Modell berechnete Löslichkeit in guter Übereinstimmung waren.

## 2.2. Inaktivierung von CALB durch Methanol

### 2.2.1. Methanolkonzentration und katalytische Aktivität

Die spezifische Aktivität von CALB wurde experimentell von Herrn Dr. Francesco Sasso in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Marina Lotti bei Methanolkonzentrationen zwischen 0,7 und 60 Prozent (vol/vol) bei drei unterschiedlichen Wasseraktivitäten (0,02, 0,05, 0,09) gemessen. Für jede der drei Wasseraktivitäten nahm die spezifische Aktivität um ca. 60 Prozent ab, wenn die Methanolkonzentration von 0,7 auf 10 Prozent (vol/vol) erhöht wurde. Bei einer weiteren Erhöhung der Methanolkonzentration blieb die katalytische Aktivität allerdings annähernd konstant (Abb. 6).

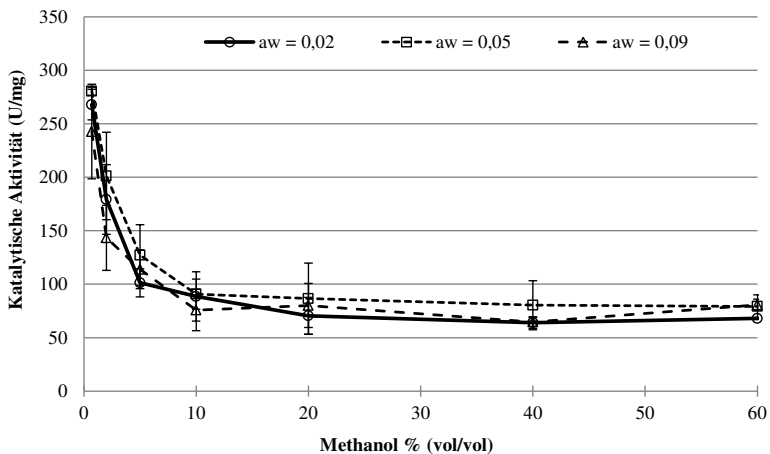


Abb. 6: Katalytische Aktivität von CALB in Abhängigkeit der Methanolkonzentration. Gemessen von Herrn Dr. Francesco Sasso.

CALB wies selbst bei den höchsten Methanolkonzentrationen (60 Prozent (vol/vol)) eine katalytische Aktivität auf, die 30 Prozent der maximal erreichten katalytischen Aktivität entsprach. Die Werte, die bei den drei unterschiedlichen Wasseraktivitäten gemessen wurden, waren annähernd überlagerbar, was darauf schließen lässt, dass der Effekt der Wasseraktivität auf die durch Methanol verursachte Abnahme der katalytischen Aktivität vernachlässigbar ist. Während die Kurven, die bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten gemessen wurden, demselben

Verlauf folgten, wurden kleine Unterschiede beobachtet: Bei geringen Methanolkonzentrationen nahm die katalytische Aktivität mit zunehmender Wasseraktivität ab, während die katalytische Aktivität bei hohen Methanolkonzentrationen geringfügig mit zunehmender Wasseraktivität anstieg (vgl. den geringen Anstieg der spezifischen Aktivität zwischen 50 und 60 Prozent (vol/vol) Methanol (Abb. 6)).

Der Einfluss von Methanol auf die kinetische Stabilität von CALB wurde ebenfalls experimentell am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano untersucht, um die Gründe für die drastische Deaktivierung herauszufinden. Dazu wurde CALB zunächst für 24 Stunden in der jeweiligen Methanol/Toluol-Mischung inkubiert, bevor die Reaktion durch die Zugabe von Vinylacetat gestartet wurde.

Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurde für drei Methanolkonzentrationen (0,7 Prozent (vol/vol), 10 Prozent (vol/vol) und 60 Prozent (vol/vol)) und für zwei Wasseraktivitäten ( $a_w = 0,02$  und  $a_w = 0,09$ ) (Abb. 7, Abb. 51, Abb. 52) gemessen. Bei beiden Wasseraktivitäten  $a_w$  hatte eine Präinkubation in einer Mischung mit 0,7 und 10 Prozent (vol/vol) Methanol annähernd keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität von CALB im Vergleich mit der Kontrollprobe. Im Gegensatz dazu führte eine Präinkubation in 60 Prozent (vol/vol) Methanol zu einer Deaktivierung des Enzyms. Dieser Effekt war bei geringen Wasseraktivitäten stärker ausgeprägt als bei hohen Wasseraktivitäten (Abb. 51). Eine Präinkubationszeit von 180 Minuten bei einer Wasseraktivität von 0,02 führte zu einer Abnahme der Anfangsgeschwindigkeit um 70 Prozent, während bei einer Wasseraktivität von 0,09 lediglich eine Abnahme um 30 Prozent beobachtet wurde (Abb. 7).

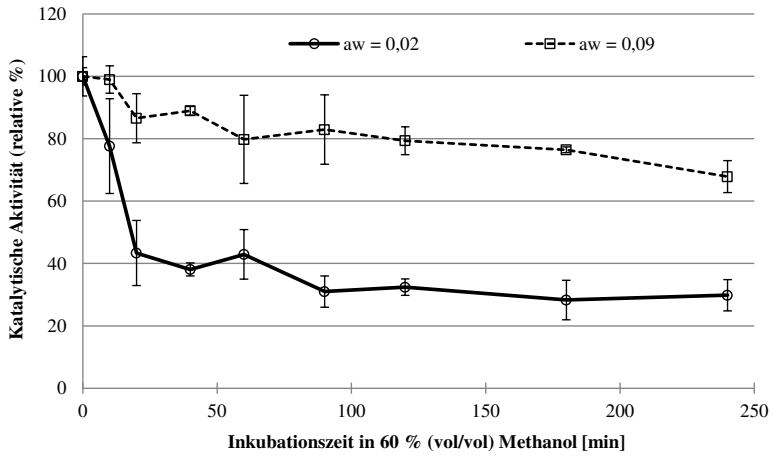


Abb. 7: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von CALB von der Inkubationszeit bei einer konstanten Methanolkonzentration von 60 % (vol/vol) bei zwei Wasseraktivitäten. Gemessen von Herrn Dr. Francesco Sasso.

## 2.2.2. Modellierung der ternären Mischungen aus Methanol, Vinylacetat und Toluol

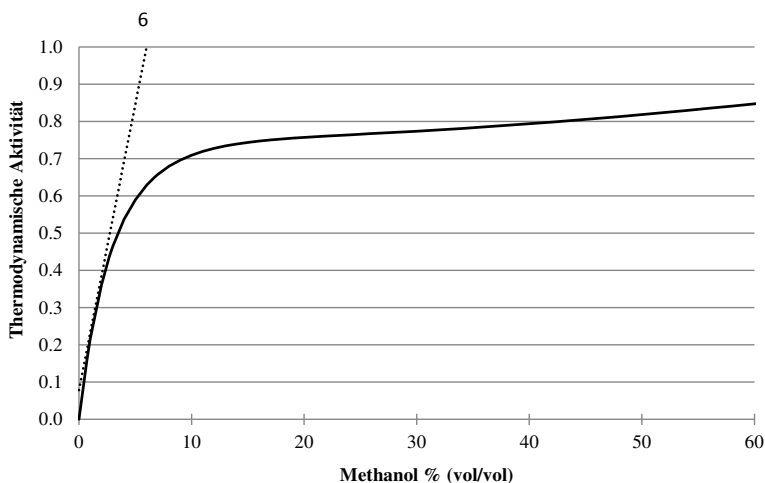
Im Zuge dieser Studie wurden 30 unterschiedliche ternäre Mischungen bestehend aus Methanol, Vinylacetat und Toluol untersucht und die thermodynamischen Aktivitäten von Methanol und Vinylacetat berechnet (Tab. 17).

**Tab. 17: Zusammensetzung der experimentell untersuchten Systeme**

Methanol		Vinylacetat		Toluol	
$c_{\text{MeOH}}$ (V/V)	$x_{\text{MeOH}}$	$c_{\text{VAC}}$ (V/V)	$x_{\text{VAC}}$	$c_{\text{TOL}}$ (V/V)	$x_{\text{TOL}}$
0,7	0,02	15,2	0,19	82	0,79
2	0,05	15,2	0,18	82	0,77
5	0,12	15,2	0,17	79	0,71
10	0,22	15,2	0,16	75	0,62
20	0,37	15,2	0,14	66	0,49
40	0,62	15,2	0,11	46	0,27
60	0,78	15,2	0,1	25	0,12

Die Konzentration von Vinylacetat war in allen Mischungen konstant und betrug 15,2 Prozent (vol/vol), während die Konzentration von Methanol von 0 auf 80 Prozent (vol/vol) erhöht wurde. Würde es sich bei den ternären Mischungen aus Methanol, Toluol und Vinylacetat um ideale Mischungen handeln, so wäre anzunehmen, dass die thermodynamische Aktivität von Methanol proportional mit dem Stoffmengenanteil von Methanol in der Mischung zunimmt, während die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat konstant ist. Allerdings handelt es sich bei diesen Mischungen um nicht-ideale Systeme. Die thermodynamische Aktivität von Methanol steigt deshalb nicht linear an, sondern zeigt einen sigmoidalen Verlauf (Abb. 8).





**Abb. 8: Abhängigkeit der thermodynamischen Aktivität von Methanol (durchgezogene Linie) in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration.**

Zwischen 0 und 10 Prozent (vol/vol) Methanol steigt die thermodynamische Aktivität von Methanol steil auf 0,75 an. Jenseits von 10 Prozent (vol/vol) Methanol steigt die thermodynamische Aktivität von Methanol allerdings nur gemäßigt an. Zudem variiert die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat, obwohl die Konzentration von Vinylacetat konstant 15,2 Prozent (vol/vol) ist (Abb. 54). Die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat nimmt mit zunehmender Methanolkonzentration ab, erreicht bei einer Methanolkonzentration von 11 bis 19 Prozent (vol/vol) ein Minimum und steigt für höhere Methanolkonzentrationen wieder an. Letzteres ist auf einen Anstieg des thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten bei hohen Methanolkonzentrationen zurückzuführen. Eine Erhöhung der thermodynamischen Wasseraktivität von 0,02 auf 0,09 hatte dabei nur einen vernachlässigbar kleinen Effekt auf die thermodynamische Aktivität von Methanol und Vinylacetat (Abb. 53, Abb. 54, Abb. 55).

### 2.2.3. Modellierung der Enzymkinetik

Die lipase-katalysierte Alkohololyse von Vinylacetat durch Methanol in Toluol wurde durch einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus (Abb. 9) modelliert, wobei eine kompetitive Inhibition durch Methanol angenommen wurde.

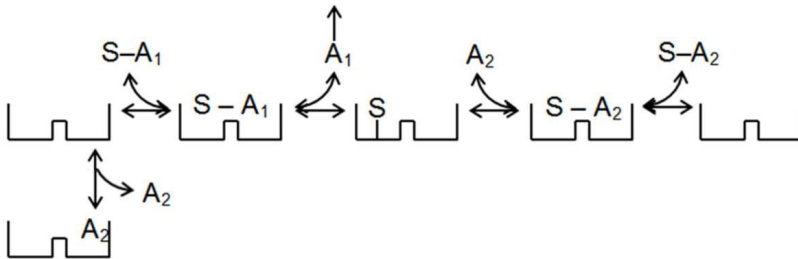
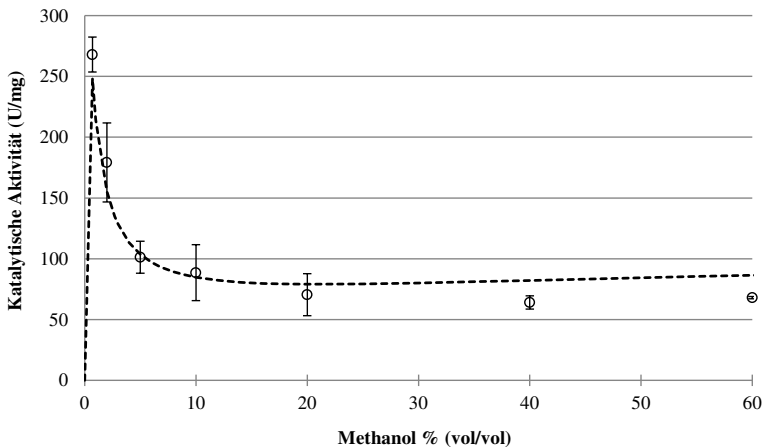


Abb. 9: Schematische Darstellung des Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus

Insgesamt waren vier Parameter nötig, um die katalytische Aktivität zu modellieren: Die Michaelis-Konstante von Methanol ( $K_{M,MeOH}$ ), die Inhibierungskonstante von Methanol ( $K_{i,MeOH}$ ), die Michaelis-Konstante von Vinylacetat ( $K_{M,VA}$ ) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ). Aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten im Bereich der sehr niedrigen Alkoholkonzentrationen, dem Fehlerbalken des Peaks und der konstanten Vinylacetatkonzentration, die in den Experimenten verwendet wurde, war es nicht möglich, alle vier Parameter unabhängig voneinander zu bestimmen, indem die experimentellen Daten auf Gleichung 3 gefittet wurden, da die Parameter gekoppelt sind. Deswegen wurden zwei Parameter ( $K_M$  und  $K_i$ ) aus den Simulationsdaten berechnet: Die Bindung des jeweiligen Alkohols an die Alkoholbindestelle (Asp134, Thr138 und Gln157) und an die Acetatbindestelle (Gly39, Thr40, Ser105, Gln106, Ile189, Val190, His224, Leu278, Ala281, Ala282) wurde verwendet, um  $K_M$  und  $K_i$  zu berechnen. Die beiden verbleibenden Parameter,  $v_{max}$  und  $K_{M,VA}$ , wurden an die experimentellen Daten gefittet, indem die mittlere quadratische Abweichung zwischen den experimentellen Daten und dem Modell minimiert wurde. Allerdings sind auch diese beiden Parameter gekoppelt, was auf die konstante Konzentration des Vinylacetats zurückzuführen ist. Infolge der Kopplung hatten kleine Änderungen in den Parametern keine Auswirkungen auf die Qualität des Fits auf die experimentellen Daten. Selbst bei der Änderung eines Parameters um

den Faktor zwei und dem anschließenden Fit von  $v_{\max}$  bzw.  $K_{M,VA}$  blieb die Form der gefitteten Kurve robust und die mittlere quadratische Abweichung änderte sich nur geringfügig.

Die katalytische Aktivität wurde gemäß Gleichung 3 modelliert, wobei zwei Parameter aus den molekulardynamischen Simulationen und zwei Parameter durch einen Fit der experimentellen Daten bestimmt wurden. Mit diesem Modell ließ sich der experimentell beobachtete Verlauf der katalytischen Aktivität in Abhängigkeit der Alkoholkonzentration beschreiben: Das Maximum der katalytischen Aktivität bei niedrigen Methanolkonzentrationen und die darauffolgende Abnahme der katalytischen Aktivität auf einen konstanten Wert wurden durch das Modell (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12) beschrieben.



**Abb. 10: Katalytische Aktivität von CALB in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Wasseraktivität von 0,02. Experimentelle Datenpunkte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie). Die experimentellen Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.**

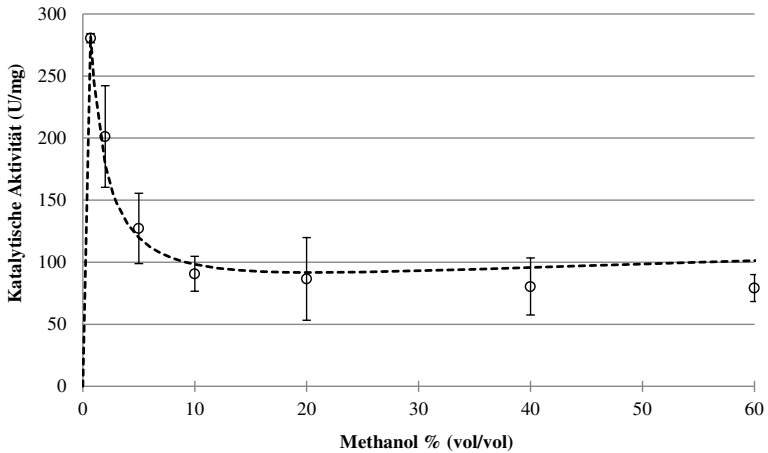


Abb. 11: Katalytische Aktivität von CALB in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Wasseraktivität von 0,05. Experimentelle Datenpunkte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie). Die experimentellen Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.

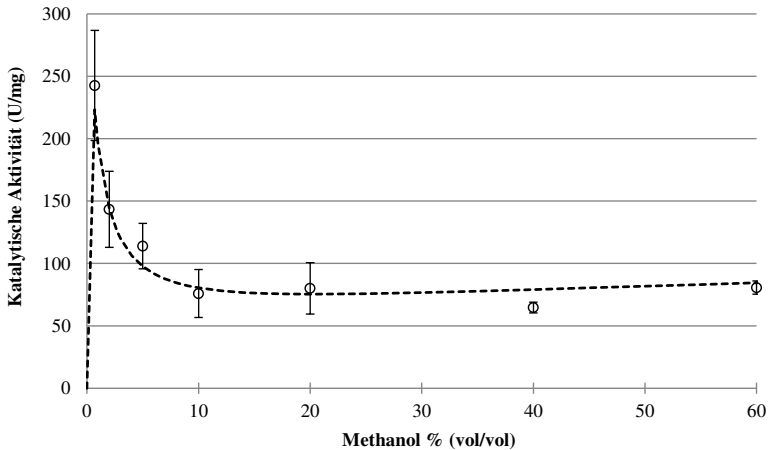


Abb. 12: Katalytische Aktivität von CALB in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration bei einer Wasseraktivität von 0,09. Experimentelle Datenpunkte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie). Die experimentellen Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.

Für die ersten fünf Datenpunkte (0,7 bis 20 Prozent (vol/vol) Methanol) waren die experimentellen Daten und das Modell in guter Übereinstimmung. Für Methanolkonzentrationen über 20 Prozent (vol/vol) überschätzte das Modell allerdings die experimentellen Daten für die Wasseraktivitäten von 0,02 und 0,05 (Abb. 10, Abb. 11). Für die Wasseraktivität von 0,09 waren die experimentellen und modellierten katalytischen Aktivitäten in guter Übereinstimmung (Abb. 12) und auch die leichte Zunahme der katalytischen Aktivität bei hohen Methanolkonzentrationen wurde beobachtet.

#### 2.2.4. Molekulardynamische Simulation von CALB in ternären Mischungen

Molekulardynamische Simulationen von CALB in ternären Mischungen aus Methanol, Toluol und Wasser wurden durchgeführt, um die molekulare Grundlage der experimentell beobachteten Deaktivierung von CALB durch Methanol zu untersuchen. CALB wurde dazu in einer Umgebung simuliert, die hinsichtlich der Alkohol- und Wasseraktivität mit den experimentellen Bedingungen vergleichbar war. Das System wurde über 50 ns simuliert. In diesem Zeitraum konnten keine Änderungen in der Flexibilität und der Struktur des Enzyms beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden 5 Simulationen auf 300 ns fortgesetzt, um langsamere Effekte zu studieren. In einer dieser Simulationen mit 40 Prozent (vol/vol) Methanol und einer Wasseraktivität von 0,01 wurde die Entfaltung des N-Terminus beobachtet. Die Flexibilität des Enzyms hing weder von der Wasseraktivität noch von der Alkoholaktivität ab. Dabei wurden keine Änderungen in der Konformation beobachtet.

Die Bindung der Methanolmoleküle an die Alkoholbindestelle von CALB (Asp134, Thr138 und Gln157) wurde für drei Wasseraktivitäten (0,02, 0,05, 0,09) untersucht (Abb. 56, Abb. 57, Abb. 58).

Eine einfache Bindungsgleichung (Gleichung 4) wurde verwendet, um die Bindung von Methanol zu beschreiben. Dazu wurde von einer beschränkten Anzahl Methanolbindestellen in der Alkoholbindestelle von CALB ausgegangen. Das Fitten der Simulationsdaten in diese Gleichung ergab eine maximale Anzahl  $N_{\max}$  von proteingebundenen Methanolmolekülen von 6,6, 5,8 und 6,6 und eine Bindungskonstante  $K_{M,MeOH}$  von 0,05, 0,05 und 0,06 für die drei Wasseraktivitäten  $a_w = 0,02, 0,05, 0,09$  (Abb. 56, Abb. 57, Abb. 58).

Die Bindung von Methanol an die Acetatbindestelle (Gly39, Thr40, Ser105, Gln106, Ile189, Val190, His224, Leu278, Ala281 und Ala282) wurde analog dazu untersucht und ergab eine maximale Anzahl gebundener Methanolmoleküle  $N_{\max}$  von 37,6, 35,2 und 38,4 und eine Inhibitionskonstante  $K_{i,MeOH}$  von 0,22, 0,23 und 0,25 für die drei Wasseraktivitäten  $a_w = 0,02, 0,05, 0,09$  (Abb. 59, Abb. 60, Abb. 61). Die Wasseraktivität hatte nur einen geringen Einfluss auf die Bindung von Methanol an die Alkohol- und Acetatbindestelle.

## **2.3. Unterschiedliche Effekte von Methanol und Ethanol auf die von CALB katalysierte Alkohololyse**

Um die Effekte von Methanol und Ethanol auf CALB zu untersuchen, wurden von Francesco Sasso am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano Reaktionen mit Methanol und Ethanol als Substrat durchgeführt. Die Reaktionen mit Methanol und Ethanol als Substrat wurden parallel mit derselben Stammlösung des Enzyms und denselben Chargen Chemikalien durchgeführt. So wurde erreicht, dass die Ergebnisse möglichst vergleichbar waren. Bei diesen Messungen sollten nicht einfach die bereits beschriebenen Messungen wiederholt werden, sondern aufbauend auf den Erkenntnissen aus diesen Messungen wurden Experimente durchgeführt, mit denen das Enzym und die Effekte der beiden Alkohole auf das Enzym besser untersucht werden konnten. Dazu wurden mehrere Messungen bei niedrigen Alkoholkonzentrationen durchgeführt, um die bereits beschriebene Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkoholkonzentration besser charakterisieren zu können. Da bereits gezeigt wurde, dass der Effekt der Wasseraktivität auf die katalytische Aktivität vernachlässigbar klein ist, wurden alle Reaktionen bei einer konstanten Wasseraktivität  $a_w$  von 0,09 durchgeführt.

### **2.3.1. Kinetik der Alkohololyse**

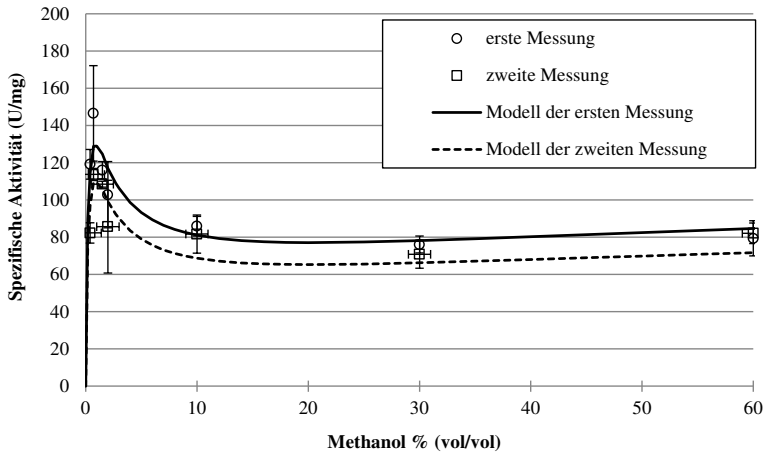
Die Kinetik der Produktbildung mit den Substraten Methanol und Ethanol wurde bei Alkoholkonzentrationen zwischen 0,4 und 60 Prozent (vol/vol) und einer konstanten Wasseraktivität  $a_w$  von 0,09 untersucht. Im Konzentrationsbereich von 20 bis 60 Prozent (vol/vol) ist die Anfangsgeschwindigkeit für beide Alkohole in den ersten 100 Minuten der Umsetzung konstant. Für Alkoholkonzentrationen von 0,7 Prozent (vol/vol) ist die Anfangsgeschwindigkeit sehr hoch, nimmt allerdings nach 40 Minuten ab. Die Aktivität von CALB für die Alkohololysereaktion mit Methanol bzw. Ethanol wurden deshalb aus den ersten 2-3 Minuten berechnet.

### **2.3.2. Inaktivierung von CALB durch Methanol und Ethanol**

Die spezifische Aktivität von CALB wurde bei einer Wasseraktivität  $a_w$  von 0,09 bestimmt. Dabei wurden sowohl Methanol als auch Ethanol als Substrate verwendet. Abgesehen davon waren die Reaktionsmischungen identisch: Es wurden jeweils die gleiche Stammlösung des Enzyms und die gleiche Charge Chemikalien verwendet. So konnte gewährleistet werden, dass die Ergebnisse vergleichbar sind und die Effekte von Methanol und Ethanol auf das Enzym verglichen werden konnten. Sämtliche Messungen wurden mit einer zweiten Stammlösung des Enzyms und einer neuen Charge Chemikalien wiederholt, um die Wiederholgenauigkeit der Messungen beurteilen zu können. In Übereinstimmung mit den oben bereits gezeigten Ergebnissen wurde die höchste spezifische Aktivität bei Methanolkonzentrationen von 0,7 Prozent (vol/vol) gemessen. Die spezifische Aktivität nahm daraufhin um 52 Prozent im Vergleich zur höchsten gemessenen spezifischen Aktivität ab, wenn die Methanolkonzentration auf 30 Prozent (vol/vol) erhöht wurde. Für höhere Methanolkonzentrationen blieb die katalytische Aktivität annähernd konstant.



A



B

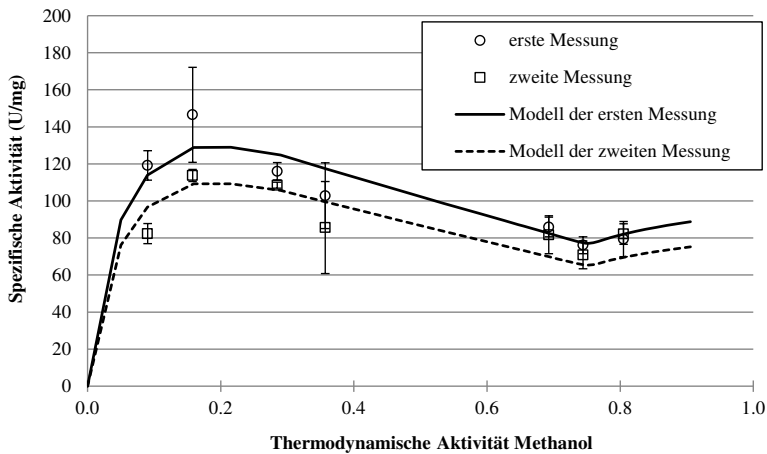
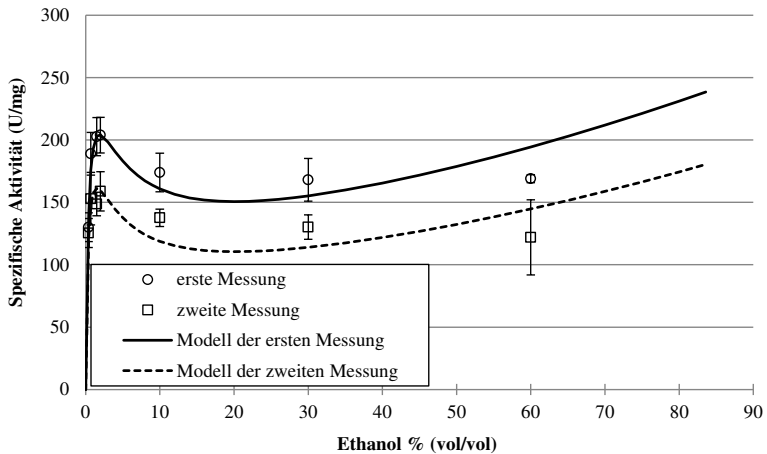


Abb. 13: Katalytische Aktivität von CALB bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen (A) und unterschiedlichen Methanolaktivitäten (B). Experimentelle Werte (Kreise/Quadrate) und modellierte Werte (durchgezogene Linie/gestrichelte Linie). Vergleich der ersten (Kreise und durchgezogene Linie) und zweiten (Quadrate und gestrichelte Linie) Messung. Die experimentellen Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.

Bei Reaktionen mit Ethanol wurde die höchste spezifische Aktivität bei einer Ethanolkonzentration von 2 Prozent (vol/vol) gemessen. Die katalytische Aktivität nahm um 15 Prozent im Vergleich zur höchsten gemessenen katalytischen Aktivität ab, wenn die Ethanolkonzentration von 2 auf 10 Prozent (vol/vol) erhöht wurde. Bei höheren Ethanolkonzentrationen war die katalytische Aktivität konstant. Diese Effekte wurden bei allen Messungen von CALB in Methanol und Ethanol beobachtet.

A



B

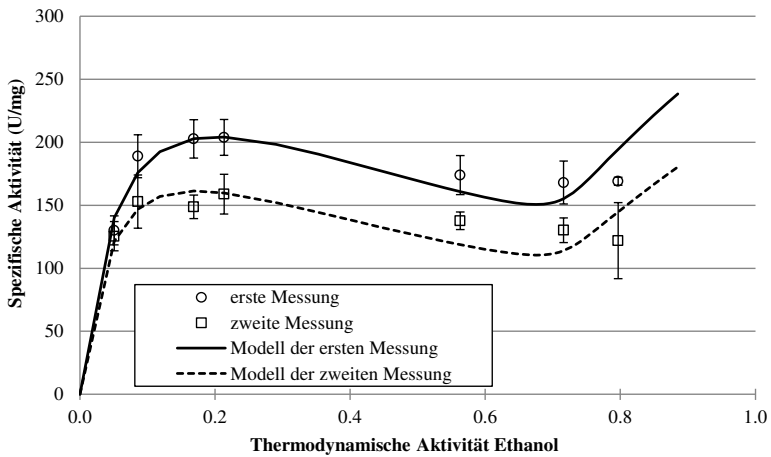


Abb. 14: Katalytische Aktivität von CALB bei unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen (A) und unterschiedlichen Ethanolaktivitäten (B). Experimentelle Werte (Kreise/Quadrate) und modellierte Werte (durchgezogene Linie/gestrichelte Linie). Vergleich der ersten (Kreise und durchgezogene Linie) und zweiten (Quadrate und gestrichelte Linie) Messung. Die experimentellen Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.

Der Effekt der Präinkubation von CALB in Methanol und Ethanol wurde ebenfalls von Francesco Sasso am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine Präinkubation von CALB in Methanol bei Konzentrationen von 0,7 bzw. 10 Prozent (vol/vol) zu einer Zunahme der Enzymaktivität von 40 bzw. 8 Prozent führt, während eine Präinkubation des Enzyms in 60 Prozent (vol/vol) Methanol in einer Abnahme der Enzymaktivität von 30 Prozent resultiert. Die Präinkubation des Enzyms in Ethanol hatte einen unterschiedlichen Effekt: Für Ethanolkonzentrationen von 1,5 und 26 Prozent (vol/vol) nahm die katalytische Aktivität des Enzyms um 100 bzw. 80 Prozent zu, während sie bei 65 Prozent (vol/vol) um 3 Prozent abnahm.

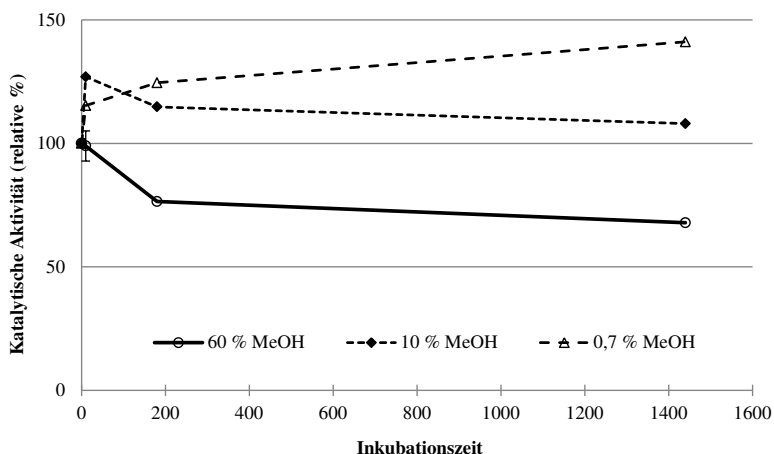
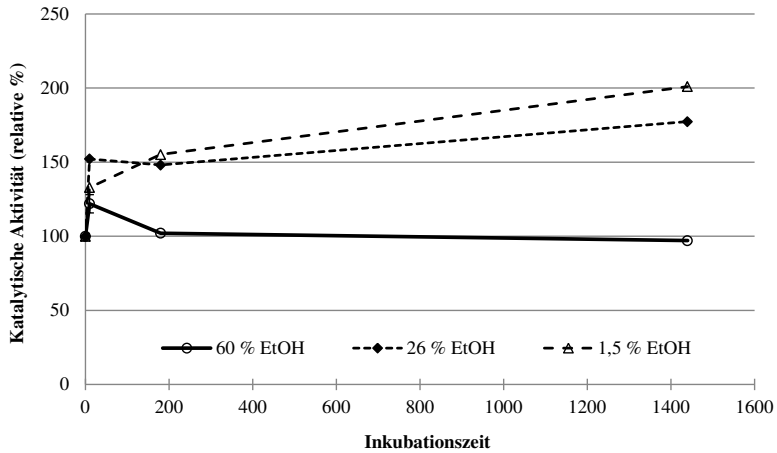


Abb. 15: Vergleich der spezifischen Aktivität von CALB nach unterschiedlichen Präinkubationszeiten in 0,7 (Dreieck), 10 (Raute) und 60 % (Kreis) Methanol bei einer Wasseraktivität von 0,09. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messungen berechnet. Die Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.



**Abb. 16:** Vergleich der spezifischen Aktivität von CALB nach unterschiedlichen Präinkubationszeiten in 1,5 (Dreieck), 26 (Raute) und 60 % (Kreis) Ethanol bei einer Wasseraktivität von 0,09. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messungen berechnet. Die Messungen wurden von Francesco Sasso durchgeführt.

### **2.3.3. Modellierung der Mischungen**

Insgesamt wurden jeweils 30 unterschiedliche Mischungen aus Methanol, Vinylacetat und Toluol sowie Ethanol, Vinylacetat und Toluol untersucht und die thermodynamische Aktivität jeder Komponente berechnet. Die Konzentration des Vinylacetats betrug konstant 15,2 Prozent (vol/vol), während die Wasseraktivität konstant bei 0,09 gehalten wurde. Die Konzentration von Methanol (und Ethanol) wurde zwischen 0 und 80 Prozent (vol/vol) variiert. Wenn es sich bei diesen Mischungen um ideale Mischungen handeln würde, so wäre die thermodynamische Aktivität jeder Komponente der Mischung proportional zu ihrem Stoffmengenanteil in der Mischung und die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat wäre konstant. Da es sich bei diesen Mischungen allerdings nicht um ideale Mischungen handelt, zeigen die thermodynamischen Aktivitäten der Komponenten ein nicht-ideales Verhalten.

### **2.3.4. Mischungen aus Alkohol (Methanol bzw. Ethanol), Vinylacetat und Toluol**

Insgesamt wurden 30 Mischungen aus Methanol, Toluol und Vinylacetat untersucht: Die thermodynamische Aktivität von Methanol als Funktion des Stoffmengenanteils des Methanols in der Mischung zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Zwischen 0 und 10 Prozent (vol/vol) stieg die thermodynamische Aktivität von Methanol auf 0,75. Im Konzentrationsbereich von 10 bis 60 Prozent (vol/vol) nahm die thermodynamische Aktivität nur geringfügig zu.

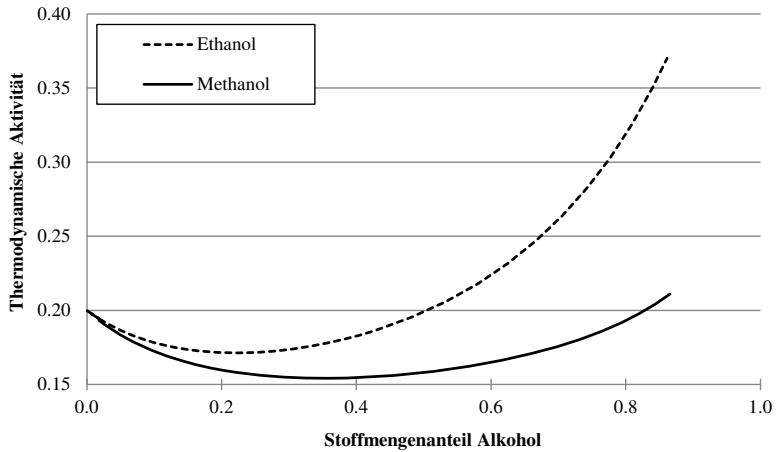
Weitere 30 Systeme aus Ethanol, Vinylacetat und Toluol wurden untersucht. In vielen Punkten ähnelte der Verlauf der thermodynamischen Aktivität von Ethanol als Funktion der Stoffmenge von Ethanol in der Mischung dem oben beschriebenen Fall für Methanol: Die thermodynamische Aktivität von Ethanol zeigte ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf und hing stark von der Ethanolkonzentration ab, insbesondere bei geringen Ethanolkonzentrationen. Allerdings gab es auch Unterschiede: Bei niedrigen Alkoholkonzentrationen war der Aktivitätskoeffizient für Methanol höher als für Ethanol. Infolgedessen zeigte die thermodynamische Aktivität von Methanol einen stärkeren Anstieg als die thermodynamische Aktivität von Ethanol: Bei 10 Prozent (vol/vol) betrug die thermodynamische Aktivität von Methanol bereits 0,69, während sie für Ethanol nur 0,56 betrug. Für Alkoholkonzentrationen über 10 Prozent (vol/vol) nahm die thermodynamische Aktivität von Ethanol deshalb um 57 Prozent zu, während die thermodynamische Aktivität von Methanol nur geringfügig zunahm.



**Abb. 17: Thermodynamische Aktivität von Methanol (durchgezogene Linie) und Ethanol (gestrichelte Linie) als Funktion des Stoffmengenanteils des Alkohols.**

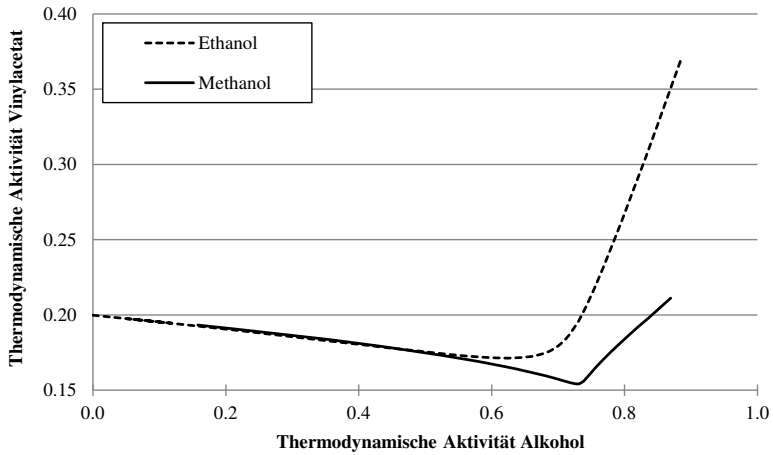
Wie bereits für Mischungen aus Methanol, Vinylacetat und Toluol beobachtet wurde, ist die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat nicht konstant, obwohl eine konstante Konzentration an Vinylacetat verwendet wurde. Die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat hat ein Minimum bei 11 - 19 Prozent (vol/vol) Methanol und nimmt für höhere Methanolkonzentrationen zu. Dies wird durch einen erhöhten Aktivitätskoeffizienten bei höheren Methanolkonzentrationen verursacht. Dieser Trend wurde auch für Systeme aus Ethanol, Vinylacetat und Toluol beobachtet. Allerdings erreicht die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat in Systemen mit Methanol einen Wert von 0,21 bei Methanolkonzentrationen von 80 Prozent (vol/vol), während sie in Ethanol auf 0,37 ansteigt (bei 80 Prozent (vol/vol) Ethanol).





**Abb. 18: Thermodynamische Aktivität von Vinylacetat in Abhängigkeit des Stoffmengenanteils von Methanol, bzw. Ethanol**

Der Verlauf sah geringfügig anders aus, wenn die thermodynamische Aktivität des Vinylacetats als eine Funktion der Aktivität des jeweiligen Alkohols in der Mischungen aufgetragen wurde: Dabei nahm die thermodynamische Aktivität des Vinylacetats mit zunehmender Alkoholaktivität geringfügig ab, bis eine Alkoholaktivität von 0,7 erreicht wurde. Bei höheren Alkoholaktivitäten nahm die thermodynamische Aktivität des Vinylacetats stark zu und erreichte schließlich einen Wert von 0,37 für Ethanol und 0,21 für Methanol.



**Abb. 19: Thermodynamische Aktivität von Vinylacetat in ternären Mischungen aus Vinylacetat, Toluol und Methanol (durchgezogene Linie) und Ethanol (gestrichelte Linie) bei einer konstanten Vinylacetatkonzentration von 15,2 % (vol/vol) und einer konstanten Wasseraktivität von 0,09 als Funktion der thermodynamischen Aktivität des jeweiligen Alkohols**

### 2.3.5. Modellierung der Reaktionsgeschwindigkeit

Zur Modellierung der Alkoholyse des Vinylacetats in Toluol wurde ein Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus mit einer kompetitiven Inhibition durch den jeweiligen Alkohol angenommen.

Insgesamt wurden vier Parameter benötigt, um die katalytische Aktivität zu modellieren: die Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) und die Inhibierungskonstante ( $K_I$ ) des jeweiligen Alkohols, die Michaelis-Konstante des Vinylacetats ( $K_{M,VA}$ ) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ). Da die Parameter gekoppelt waren, war es aufgrund der Fehlerbalken der experimentellen Daten und der konstanten Konzentration des Vinylacetats nicht möglich, alle vier Parameter durch Fitten der experimentellen Daten zu bestimmen.

Wie zuvor bereits beschrieben, wurden zwei Parameter ( $K_M$  und  $K_I$ ) aus den molekulardynamischen Simulationen berechnet. Dabei wurde die Bindung des jeweiligen Alkohols an die Alkoholbindestelle (Asp134, Thr138 und Gln157) und die Acetatbindestelle (Gly39, Thr40, Ser105, Gln106, Ile189, Val190, His224, Leu278, Ala281 und Ala282) von CALB verwendet, um  $K_M$  und  $K_I$  zu modellieren. Die verbleibenden zwei Parameter  $v_{max}$  und  $K_{M,VA}$  wurden an die experimentellen Daten gefittet. Aufgrund der konstanten Konzentration des Vinylacetats und den nur geringen Änderungen der thermodynamischen Aktivität des Vinylacetats bei geringen Alkoholkonzentrationen waren diese beiden Parameter ebenfalls gekoppelt. Infolgedessen hatten kleine Änderungen in den Parametern keinen Effekt auf die Qualität des Fits an die experimentellen Daten. Selbst wenn einer der beiden Parameter um den Faktor zwei geändert wurde und der andere Parameter daraufhin wieder gefittet wurde, änderte sich die mittlere quadratische Abweichung nur geringfügig.

### **2.3.6. Methanol als Substrat**

Die katalytische Aktivität von CALB wurde mit Methanol als Substrat modelliert. Zwei Parameter ( $K_M$  und  $K_I$ ) wurden aus den MD-Simulationen berechnet und die verbleibenden zwei Parameter an die experimentellen Daten gefittet.

Mit diesen Parametern konnte die experimentell bestimmte katalytische Aktivität von CALB als Funktion der Methanolkonzentration reproduziert werden: In beiden Modellen und in allen experimentellen Wert wurde die höchste katalytische Aktivität bei einer Methanolkonzentration von 0,7 Prozent (vol/vol) erreicht. Für höhere Methanolkonzentrationen nahm die katalytische Aktivität auf einen konstanten Wert ab. Die geringfügige Zunahme der katalytischen Aktivität bei hohen Methanolkonzentrationen, die bei Methanolkonzentrationen von 60 Prozent (vol/vol) beobachtet wurde, wurde auch im Modell gesehen.

### **2.3.7. Ethanol als Substrat**

Die katalytische Aktivität von CALB wurde auch mit Ethanol als Substrat über die Ethanolkonzentration aufgetragen. Unter Verwendung der zwei Parameter, die aus den MD-Simulationen berechnet wurden und den beiden anderen Parametern, die an die experimentellen Daten gefittet wurden, konnte die experimentell gemessene katalytische Aktivität als Funktion der Ethanolkonzentration reproduziert werden. Das Modell war in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten für Ethanolkonzentrationen zwischen 0,4 und 10 Prozent (vol/vol). Für Ethanolkonzentrationen zwischen 10 und 30 Prozent (vol/vol) wurden die experimentellen Daten durch das Modell unterschätzt. Bei hohen Ethanolkonzentrationen von 60 Prozent (vol/vol) überschätzte das Modell die katalytische Aktivität im Vergleich zu den experimentellen Werten.

### 2.3.8. Molekulardynamische Simulation von CALB in Mischungen

Molekulardynamische Simulationen von CALB wurden sowohl in Mischungen aus Methanol, Vinylacetat und Toluol als auch in Mischungen aus Ethanol, Vinylacetat und Toluol durchgeführt. Die experimentell beobachtete Inaktivierung von CALB durch die beiden Alkohole sollte durch Simulationen untersucht werden. Die simulierten Systeme waren vergleichbar mit den Systemen, die in den Experimenten verwendet wurden. In den Simulationen wurden keine konformellen Änderungen und keine Änderungen in der Flexibilität und der Struktur des Enzyms beobachtet (Daten nicht gezeigt). Weder die Wasseraktivität noch die Alkoholaktivität hatten einen Einfluss auf die Flexibilität des Enzyms.

Die Bindung der Alkoholmoleküle an die Alkohol- und Acetatbindestelle von CALB wurde bei einer Wasseraktivität von 0,09 untersucht. Insgesamt wurden für jeden Alkohol 8 Simulationen bei  $a_w$  0,09 durchgeführt, um die beiden Parameter zuverlässig zu modellieren.

Die Bindung des Methanols an die Alkoholbindestelle von CALB ergab eine maximale Anzahl  $N_{\max}$  von 8,5 gebundenen Methanolmolekülen und eine Bindungskonstante  $K_{M,MeOH}$  von 0,22. Die Bindung der Methanolmoleküle an die Acetatbindestelle wurde entsprechend untersucht. Eine maximale Anzahl  $N_{\max}$  von 45 Molekülen und eine Bindungskonstante von 0,44 wurden berechnet. Die beiden verbleibenden Parameter ( $K_{M,VA}$  und  $V_{\max}$ ) wurden an experimentelle Daten gefittet und ein  $K_{M,VA}$  von 0,48 und ein  $V_{\max}$  von 745 berechnet. Die experimentellen Messungen wurden mit einer neuen Stammlösung des Enzyms und einer neuen Charge Chemikalien wiederholt. Das Fitten der beiden Parameter führte zu einem  $K_{M,VA}$  von 0,48 und einer  $v_{\max}$  von 633.

Die Bindung des Ethanols an die Bindestelle von CALB wurde analog dazu untersucht. Insgesamt banden 3,6 Ethanolmoleküle ( $N_{\max}$ ) an die Alkoholbindestelle mit einer Bindungskonstanten  $K_{M,EtOH}$  von 0,19. An die Acetatbindestelle konnten insgesamt 17,9 ( $N_{\max}$ ) Ethanolmoleküle mit einer Bindungskonstante  $K_{I,EtOH}$  von 0,49 binden. Die beiden verbleibenden Parameter ( $K_{M,VA}$  und  $v_{\max}$ ) wurden an experimentelle Daten gefittet und ein  $K_{M,VA}$  von 0,43 und ein  $v_{\max}$  von 1062 berechnet. Eine Wiederholung der Experimente resultierte in einem  $K_{M,VA}$  von 0,43 und einem  $v_{\max}$  von 832.

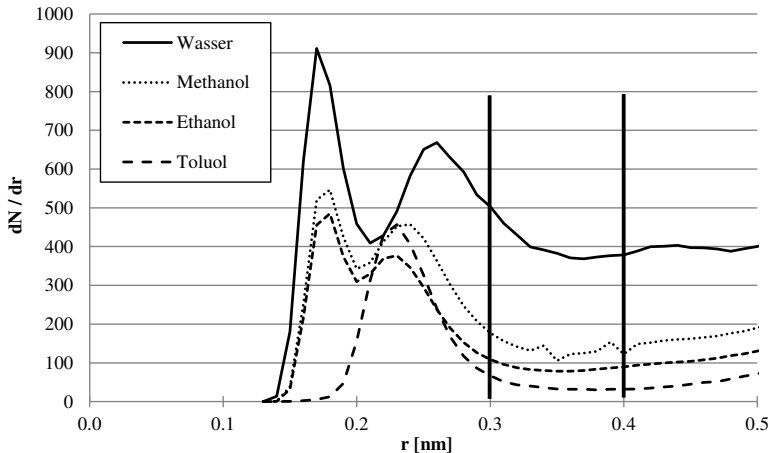
## **2.4. Bindung von Wasser, Methanol und Ethanol an CALB**

CALB wurde sowohl in Reinstoffen simuliert als auch in binären Systemen aus Wasser/Methanol, Wasser/Ethanol und Wasser/Toluol. Des Weiteren wurde CALB sowohl für Methanol als auch für Ethanol in ternären Systemen mit unterschiedlichem Wasser- und Alkoholgehalt untersucht.

### **2.4.1. Simulation von CALB in Reinstoffen**

#### **2.4.1.1. Bindung an das gesamte Protein**

Zunächst wurden 4 Simulationen durchgeführt, bei denen CALB jeweils in reinem Wasser, reinem Ethanol, reinem Methanol und reinem Toluol simuliert wurde. Diese Simulationen wurden benötigt, um die Bindung der jeweiligen Stoffe an das Protein bei Bedingungen zu untersuchen, bei denen die Bindung nicht durch andere Moleküle beeinflusst wurde. Für jede der vier Simulationen wurde die Anzahl der Moleküle in Abhängigkeit des Abstandes bestimmt. Dabei zeigte sich, dass für Wasser, Ethanol und Methanol ab einen Abstand von 0,15 nm die ersten Moleküle an das Protein banden und dann mit zunehmendem Abstand die Anzahl der Moleküle in der Umgebung des Proteins zunahm. Für Toluol zeigte sich ein ähnlicher Verlauf, allerdings banden die ersten Moleküle erst bei einem Abstand von 0,18 nm. Zusätzlich wurde der Quotient aus der Änderung der Molekülanzahl und der Änderung des Abstandes zum Protein ( $dN/dr$ ) über den Abstand zum Protein ( $r$ ) aufgetragen (Abb. 20).



**Abb. 20:  $dN/dr$ -Plot von CALB in reinem Wasser, Methanol, Ethanol und Toluol**

Für Wasser, Methanol und Ethanol wurden zwei Maxima beobachtet: Für diese Lösungsmittel lag das erste Maximum bei 0,17 nm. Bei Methanol und Ethanol lag das zweite Maximum bei 0,23 nm, während es für Wasser bei 0,26 nm lag. Für Toluol wurde lediglich ein Maximum bei 0,23 nm beobachtet.

Mit zunehmendem Abstand von der Proteinoberfläche nahm der Wert für  $dN/dr$  noch minimal ab und pendelte ab ca. 0,4 nm auf einen konstanten Wert ein. Aufgrund dieser Beobachtung wurden alle Lösungsmittelmoleküle, die sich im Abstand von 0,3 nm des Proteins aufhielten als proteingebunden betrachtet. Alle Lösungsmittelmoleküle, die weiter als 0,4 nm vom Protein entfernt waren, wurden der Bulkphase zugeordnet. Aus der Zusammensetzung der Bulkphase wurde die thermodynamische Aktivität der Mischung berechnet.

Unter Benutzung dieses Grenzwertes konnte ausgezählt werden, wie viele Moleküle in den jeweiligen Lösungsmitteln an das Protein binden: In reinem Wasser binden 859 Moleküle, in reinem Methanol 535 Moleküle, in reinem Ethanol 430 Moleküle und in reinem Toluol 277 Moleküle innerhalb eines Grenzwertes von 0,3 nm an das Protein.

### 2.4.1.2. Bindung an die Bindestelle von CALB

Die Bindung der Lösungsmittelmoleküle sollte zum einen an das gesamte Protein, zum anderen an die Bindungsstelle von CALB untersucht werden. Da die katalytischen Vorgänge lediglich an einem kleinen Teil des Proteins ablaufen, sollte dieser Teil genauer betrachtet werden. Der Aufbau des aktiven Zentrums und der Bindestellen (*hydrophobic dent*, *hydrophilic trench*, *hydrophobic crevice*) wurde bereits in der Einleitung besprochen. Da sich die Bindestellen weit in einer Vertiefung des Proteins befinden, wurden weitere Aminosäuren für die Auszählung berücksichtigt, um auch die Lösungsmittelmoleküle am Eingang zur Bindestelle zu berücksichtigen (Abb. 21).

Insgesamt wurde die Bindung von Lösungsmittelmolekülen an folgende Aminosäuren untersucht: Gly39, Thr40, Met72, Trp104, Ser105, Gln106, Gly108, Asp134, Thr138, Ala141, Leu144, Ser150, Ala151, Val154, Gln157, Ile189, Val190 und Ile285.

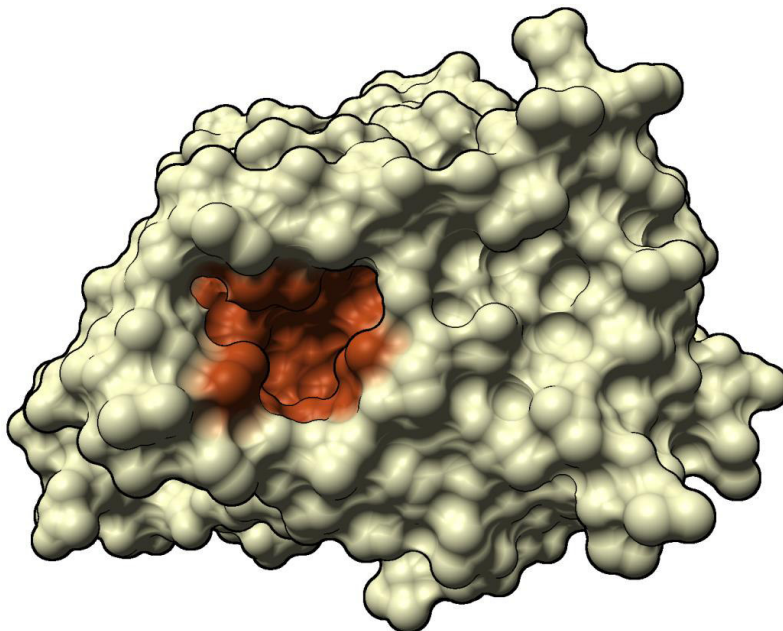


Abb. 21: Bindestelle (rot) von CALB. Die Abbildung wurde von Dipl. Inf. Michael Krone mit MegaMol erstellt.



Analog zur Bindung der Lösungsmittelmoleküle an das gesamte Protein wurde ein  $dN/dr$ -Plot für die Bindung an die Bindungsstellen von CALB erstellt (Abb. 66).

Dabei zeigte sich, dass die Lage der beiden Maxima für Wasser, Methanol und Ethanol nahezu unverändert ist. Allerdings nahm das Verhältnis der beiden Maxima zueinander signifikant ab. Während beim  $dN/dr$ -Plot für das gesamte Protein das erste Maximum für alle drei Lösungsmittel höher war als das zweite, war bei der Betrachtung der Bindestelle das erste Maximum geringer als das zweite. Für Ethanol war das erste Maximum kaum noch ersichtlich. Auch für Toluol war die Lage des Maximums unverändert. Infolgedessen wurde auch für die Untersuchung der Bindung an die Bindungstasche ein Grenzwert von 0,3 nm verwendet.

Unter Verwendung dieses Grenzwertes können in reinem Lösungsmittel 58 Wassermoleküle, 37 Methanolmoleküle, 20 Ethanolmoleküle oder 17 Toluolmoleküle in die Bindungstasche binden.

## 2.4.2. Simulation von CALB in binären Mischungen

CALB wurde in binären Mischungen aus Wasser/Methanol und Wasser/Toluol simuliert. Diese Simulationen stellten neben den Untersuchungen in den Reinstoffen eine Vorstufe bzw. einen Sonderfall der Simulationen in ternären Mischungen dar.

### 2.4.2.1. Simulation von CALB in binären Mischungen aus Wasser und Methanol bzw. Wasser und Ethanol

Simulationen von CALB wurden in binären Mischungen aus Wasser und Methanol sowie Wasser und Ethanol durchgeführt. Dabei wurde der Stoffmengenanteil von Wasser schrittweise von 0 auf 1 erhöht.

Analog zur Untersuchung in Reinstoffen wurde die Anzahl der proteingebundenen Wasser bzw. Alkoholmoleküle in Abhängigkeit des Abstands vom Protein bestimmt. Diese Werte wurden in einem  $dN/dr$ -Plot aufgetragen. Bei Wasser zeigte sich, dass die Lage der beiden Maxima vergleichbar zu Simulationen in reinem Wasser war. Allerdings nahm mit zunehmendem Alkoholanteil die Höhe des zweiten Maximums im Vergleich zum ersten Maximum ab. Dies wurde sowohl für Methanol (Abb. 22) als auch für Ethanol (Abb. 23) beobachtet.

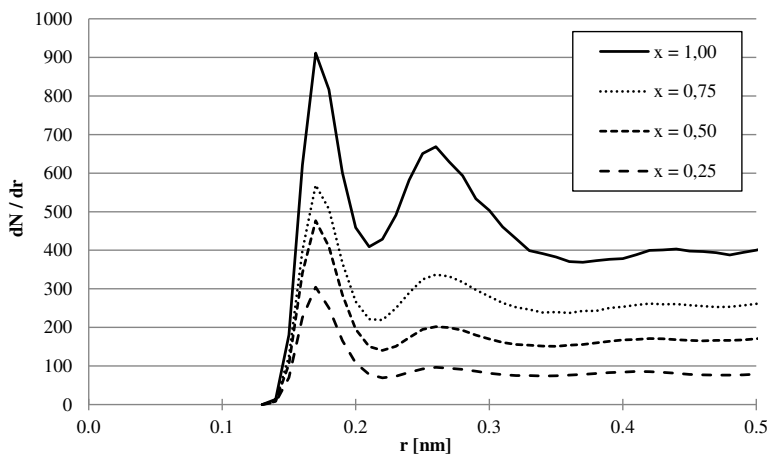
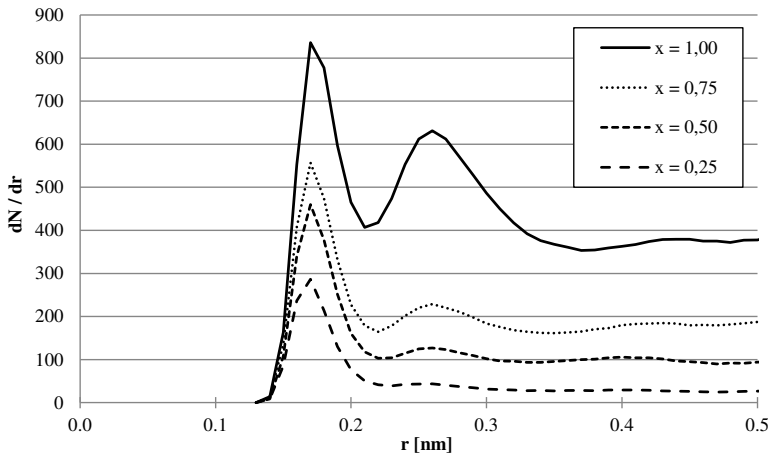


Abb. 22:  $dN/dr$ -Plot für Wasser an CALB in binären Wasser/Methanol-Mischungen für unterschiedliche Stoffmengenanteile Wasser



**Abb. 23:  $dN/dr$ -Plot für Wasser an CALB in binären Wasser/Ethanol-Mischungen für unterschiedliche Stoffmengenanteile Wasser**

Auch für die Bindung der Alkohole zeigte sich keine Veränderung in der Lage der Maxima. Allerdings nahm für Methanol mit zunehmendem Wasseranteil die Höhe des ersten Maximums relativ zum zweiten Maximum gesehen ab (Abb. 24). Der gleiche Trend wurde für Ethanol beobachtet, allerdings nahm das erste Maximum relativ zum zweiten Maximum gesehen schneller ab als bei Methanol (Abb. 25).

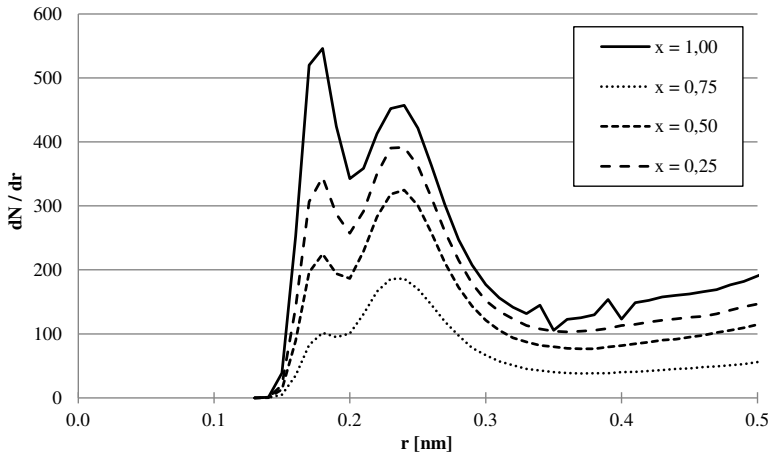


Abb. 24:  $dN/dr$ -Plot für Methanol an CALB in binären Wasser/Methanol-Mischungen für unterschiedliche Stoffmengenanteile Methanol

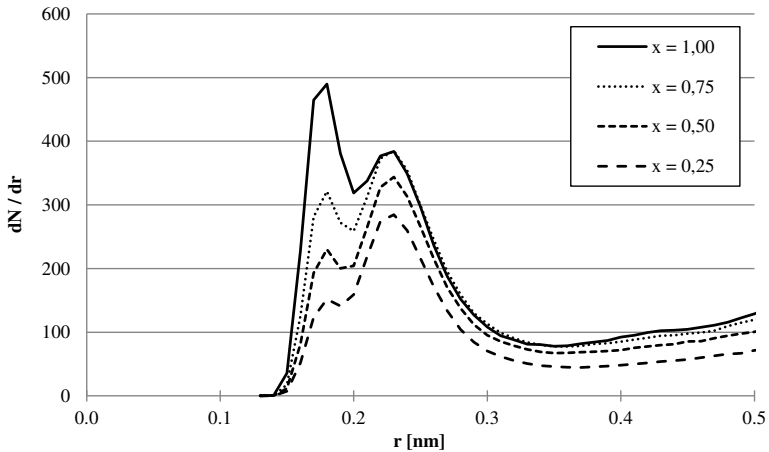
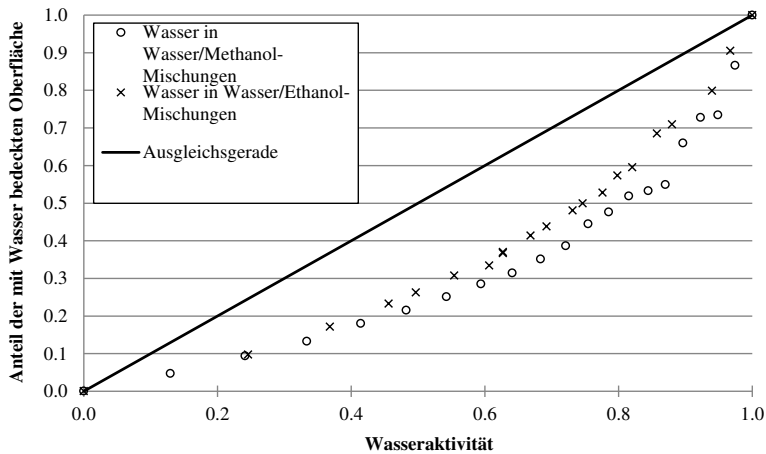


Abb. 25:  $dN/dr$ -Plot für Ethanol an CALB in binären Wasser/Ethanol-Mischungen

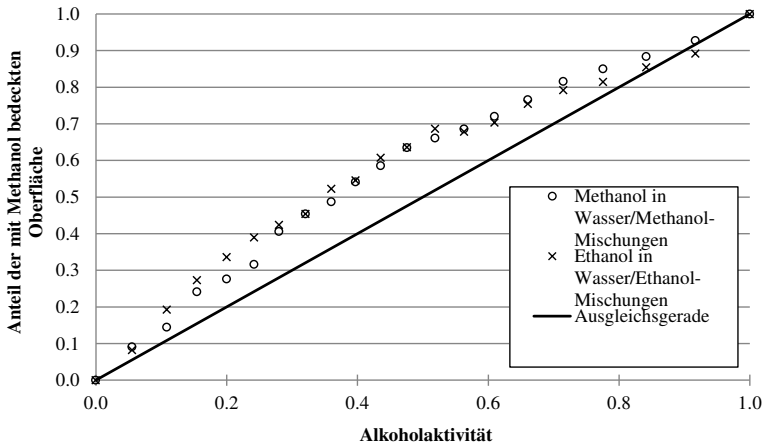
Die in den Reinstoffen bestimmten Grenzwerte von 0,3 nm und 0,4 nm für proteingebundene Moleküle und Moleküle der Bulkphase wurden auch in den binären Systemen bestätigt.

Im nächsten Schritt wurde die Bindung von Wasser und Alkoholmolekülen an CALB untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der Wasser- und Alkoholmoleküle an CALB mit zunehmender Wasser- bzw. Alkoholaktivität erwartungsgemäß zunahm. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in der Zunahme: Die Wasserbindung an das Protein beschreibt sowohl in Methanol- als auch in Ethanolmischungen eine konvexe Kurve (Abb. 26). Dagegen ist in binären Mischungen aus Ethanol und Wasser bei gleicher Wasseraktivität ein größerer Anteil des Proteins mit Wasser bedeckt, als dies bei binären Mischungen aus Methanol und Wasser der Fall ist (Abb. 26).



**Abb. 26: Anteil der mit Wasser bedeckten Proteinoberfläche in Abhängigkeit der Wasseraktivität in binären Wasser/Alkohol-Mischungen**

Auch der Anteil der mit Methanol und Ethanol bedeckten Proteinoberfläche nimmt mit zunehmender Alkoholaktivität zu. Im Gegensatz zu Wasser beschreibt die Bindung von Methanol und Ethanol an das Protein eine konkave Kurve. Dies lässt darauf schließen, dass die Alkohole eine höhere Bindungsaffinität an CALB haben als Wasser (Abb. 27).



**Abb. 27: Anteil der mit Methanol bedeckten Proteinoberfläche in Abhängigkeit der Alkoholaktivität in binären Wasser/Methanol- bzw. Wasser/Ethanol-Mischungen**

Die Bindung von Wasser in Methanol bzw. Ethanol wurde zudem an die Substratbindestelle von CALB untersucht (Abb. 67, Abb. 68). Auch hier wurden die oben erwähnten Bindungsverläufe von Wasser und Methanol bzw. Ethanol bestätigt. Allerdings wurde hier eine stärkere Streuung der Werte beobachtet, da hier nur ein Teil des Proteins betrachtet wurde und folglich über weniger Aminosäuren gemittelt wurde.

### 2.4.2.2. Simulation von CALB in binären Mischungen aus Wasser und Toluol

Im Gegensatz zu Wasser/Methanol-Mischungen, die in jedem Verhältnis mischbar sind, löst sich Toluol nur minimal in Wasser und Wasser löst sich nur minimal in Toluol. Deshalb wurden Toluol/Wasser-Mischungen simuliert, bei denen der Stoffmengenanteil von Toluol zwischen 0 und  $9,461 \cdot 10^{-5}$  und der Anteil von Wasser zwischen 0 und  $1,71 \cdot 10^{-3}$  variierte. Die maximale Löslichkeit von Toluol in Wasser (und umgekehrt) war bereits aus experimentellen Daten und Berechnungen mit dem UNIFAC-Modell bekannt und wurde auch in Simulationen mit den verwendeten Kraftfeldern bestätigt.

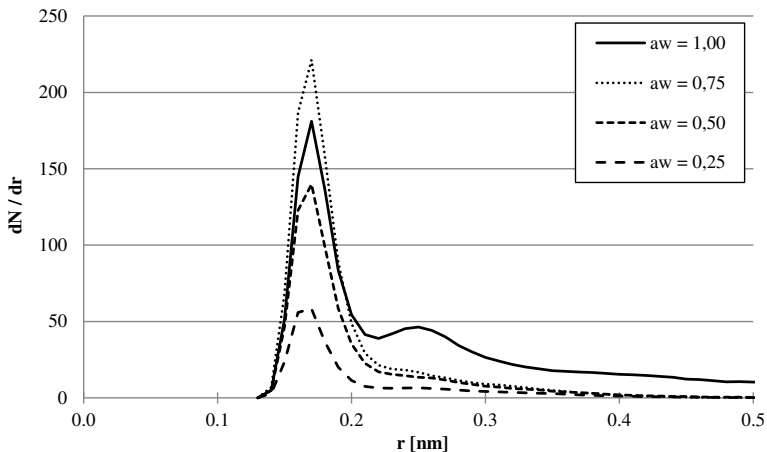


Abb. 28: dN/dr-Plot der Bindung von Wasser an CALB in Wasser/Toluol-Mischungen und Vergleich zu reinem Wasser

Dabei zeigte sich, dass der dN/dr-Plot für Wasser in Toluol vergleichbar mit den Daten war, die aus Simulationen von CALB in reinem Wasser gewonnen wurden. Die Position der beiden Maxima war vergleichbar. Lediglich bei geringem Wasseranteil nahm die Höhe des zweiten Maximums ab. Dies bestätigt die Erkenntnisse, die aus binären Mischungen von Wasser und Toluol gewonnen wurden: Auch in diesem Fall sind die Kraftfelder im Stande die Mischungen korrekt zu beschreiben, ohne dass Wasser als Tropfen in einem Zweiphasensystem vorliegt.

Bei der Simulation der binären Mischungen aus Toluol und Wasser mit niedrigen Toluolmengen (Stoffmengenanteil kleiner  $9,461 \cdot 10^{-5}$ ) fiel auf, dass bei einer Toluolaktivität von annähernd 1 nur 53 Toluolmoleküle an das Protein gebunden waren. Das entspricht 19 Prozent der von Toluol belegten Oberfläche in reinem Toluol. Für die Bindungstasche wurde ein ähnlicher Verlauf beobachtet: Hier befanden sich im Schnitt 7,3 Moleküle Toluol, was knapp 40 Prozent von dem Wert in reinem Toluol entspricht.

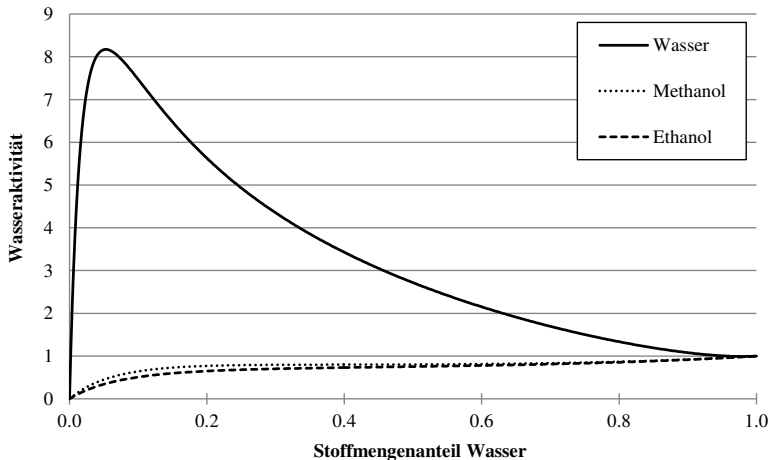
Ähnlich verhielt es sich bei den Simulationen der binären Mischungen aus Wasser und Toluol mit niedrigen Wassermengen: Bei einer Wasseraktivität von annähernd 1 (entspricht einem Stoffmengenanteil von  $1,71 \cdot 10^{-3}$ ) waren dabei lediglich 135 Wassermoleküle gebunden. Dies entspricht 15,7 Prozent der Wassermoleküle, die in reinem Wasser gebunden sind. Die Bindung von Wassermolekülen in der Bindetasche unterscheidet sich dabei von der Bindung am Rest des Proteins: Hier sind 39 Wassermoleküle gebunden, was einem Prozentsatz von 66 Prozent entspricht.



### **2.4.3. Simulation von CALB in ternären Mischungen**

Insgesamt wurden 183 Systeme simuliert, in denen CALB in unterschiedlichen Mischungen vorlag. In den Mischungen lag ein Molekül CALB in unterschiedlichen Methanolkonzentrationen (0 - 100 Prozent (v/v) in Toluol) und bei unterschiedlichem Wassergehalt (10 - 1.400 Wassermoleküle, die zum System hinzugefügt wurden) vor. Analog dazu wurden weitere 183 Simulationen durchgeführt, bei denen Ethanol anstelle von Methanol verwendet wurde. Jedes System wurde dreimal mit unterschiedlichen Startbedingungen simuliert.

Da es sich bei diesen ternären Systemen um komplexe Systeme handelte, die sich nicht wie ideale Systeme verhielten, mussten die thermodynamischen Aktivitäten der Komponenten sowie die Mischungseigenschaften berücksichtigt werden: Es wurde bereits gezeigt, dass Wasser und Methanol sowie Wasser und Ethanol in jedem Verhältnis mischbar sind und die thermodynamischen Aktivitäten und Exzessgrößen nur minimal vom idealen System abweichen. Des Weiteren sind auch Methanol und Toluol sowie Ethanol und Toluol in jedem Verhältnis mischbar. Wenn auch der Verlauf der thermodynamischen Aktivität vom idealen Fall abweicht.



**Abb. 29: Thermodynamische Aktivität von Wasser, Methanol und Ethanol in Toluol**

Die bereits erwähnten Wasser/Toluol-Mischungen bilden einen weiteren Fall. Die beiden Stoffe sind jeweils nur minimal im jeweils anderen Stoff löslich. Das bedeutet, dass in Wasser/Toluol-Mischungen bereits bei minimalen Wassermengen eine Wasseraktivität von 1 erreicht wird.

Bei Systemen aus Wasser, Methanol und Toluol ergibt sich hinsichtlich der Löslichkeit von Wasser eine Abhängigkeit von der Methanolkonzentration (Abb. 30). Während bei Methanolkonzentrationen von 5 bzw. 10 Prozent Methanol eine Wasseraktivität von 1 bereits bei sehr geringen Wassermengen erreicht wird, ist Wasser ab einer Methanolkonzentration von 35 Prozent (vol/vol) in Toluol mischbar und die Wasseraktivität bleibt durchgehend unter 1. Diese Abhängigkeit wurde auch für Systeme aus Wasser, Ethanol und Toluol beobachtet (Abb. 31). Aber einer Ethanolkonzentration von 50 Prozent (vol/vol) ist Wasser in Toluol mischbar.

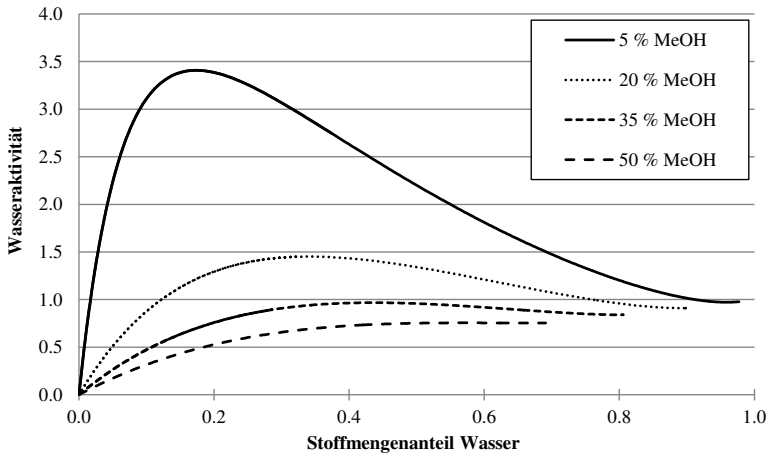


Abb. 30: Thermodynamische Aktivität von Wasser in verschiedenen Methanol/Toluol-Mischungen

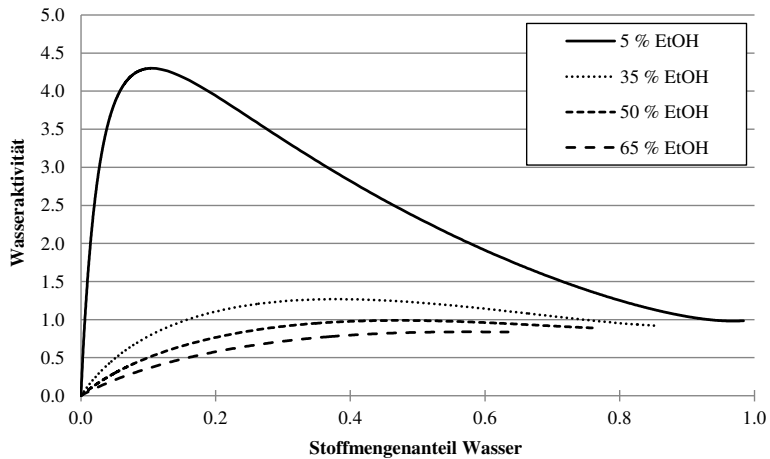


Abb. 31: Thermodynamische Aktivität von Wasser in verschiedenen Ethanol/Toluol-Mischungen

### 2.4.3.1. Bindung von Methanol an CALB in ternären Mischungen

Analog zur den Simulationen von CALB in reinem Methanol und Methanol/Wasser-Mischungen wurde auch in den ternären Mischungen die Anzahl der Methanolmoleküle für Entfernungen von 0,1 bis 0,5 nm von der Proteinoberfläche berechnet.

Bei allen Konzentrationen wurde ein starker anfänglicher Anstieg im  $dN/dr$ -Plot beobachtet, der zwischen 0,18 und 0,185 nm ein Maximum erreichte (Abb. 32). Mit zunehmender Entfernung zum Protein flachte dieser Wert wieder ab. Dieser Peak wurde als die Methanolmoleküle interpretiert, die direkt an das Protein binden. Der bereits festgelegte Grenzwert von 0,3 nm wurde dadurch bestätigt und auch in den ternären Mischungen verwendet.

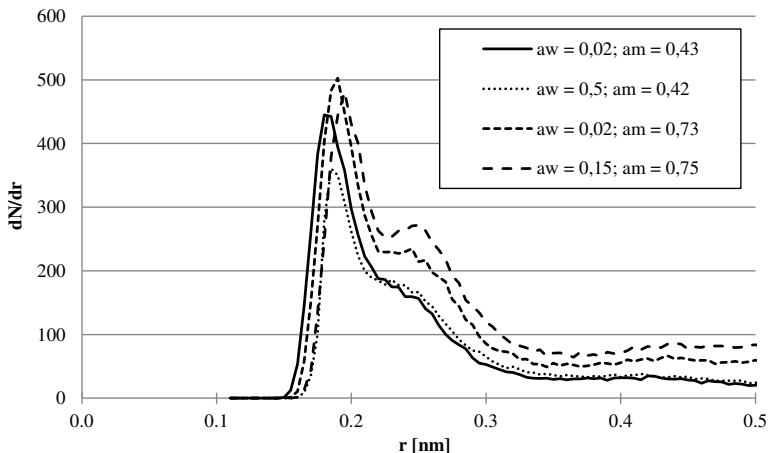
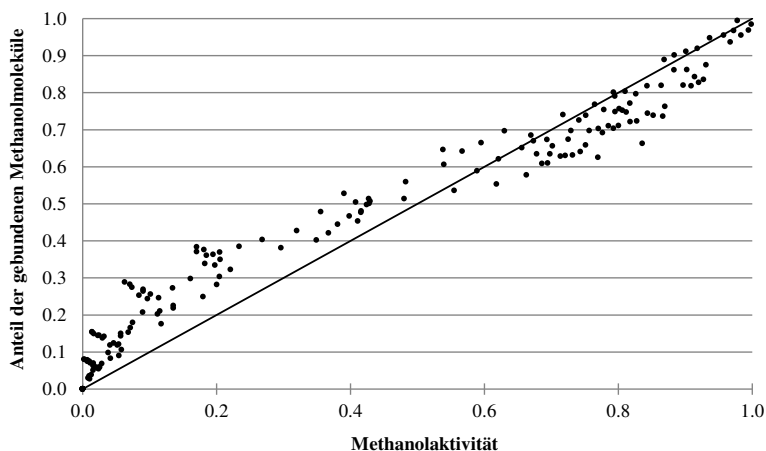


Abb. 32:  $dN/dr$ -Plot von Methanol für unterschiedliche Mischungen

Die leichte Abnahme der Werte bei abnehmender Methanolkonzentration deutet an, dass die Verteilung des Methanols an der Proteinoberfläche nur geringfügig von der Methanolaktivität beeinflusst wird. Wird die Methanolaktivität verdoppelt, so nimmt die Dicke des Methanolayers nur geringfügig zu (Abb. 32). Die Wasseraktivität hatte einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Form und die Dicke der Methanolschicht.

Die Anzahl der proteingebundenen Methanolmoleküle nahm mit zunehmender Methanolaktivität zu. Bei niedrigen Methanolaktivitäten war der Anstieg steiler und flachte mit zunehmender Methanolaktivität langsam ab. Bei einer Methanolaktivität von 1 war die komplette Proteinoberfläche erwartungsgemäß mit Methanol bedeckt (Abb. 33).



**Abb. 33: Bindung von Methanol an CALB in Abhängigkeit von der Methanolaktivität**

Die Bindung von Methanol an das Protein bestand aus zwei Teilen: Bei Methanolaktivitäten von 0 bis 0,5 folgt die Bindung einer konkaven Funktion. Die Methanolmoleküle binden mit einer höheren Affinität an das Protein als die anderen Komponenten im System. Bei Methanolaktivitäten zwischen 0,5 und 1 folgt die Bindung einer konvexen Funktion. Die Methanolmoleküle binden hier mit einer geringeren Affinität an die noch nicht belegten Bindungsstellen. Bei der Bindung von Methanol an die Bindungsstelle von CALB zeigte sich ein ähnlicher Verlauf (Abb. 69). Allerdings war hier die Streuung der Datenpunkte deutlich größer als bei Betrachtung des gesamten Proteins.

### 2.4.3.2. Bindung von Ethanol an CALB in ternären Mischungen

Analog zur Bindung von Methanol wurde auch die Bindung von Ethanol an CALB untersucht. Dazu wurde in ternären Mischungen aus Wasser, Ethanol und Toluol die Anzahl der Ethanolmoleküle an der Proteinoberfläche für Entfernungen von 0,1 bis 0,5 nm berechnet. Der daraus resultierende  $dN/dr$ -Plot (Abb. 34) für Ethanol zeigte den gleichen qualitativen Verlauf wie bei Methanol. Auch der Bindungsverlauf bei der Bindung von Ethanol an die Proteinoberfläche ist ähnlich zu dem von Methanol. Lediglich bei hohen Ethanolaktivitäten sind ca. 5-7 Prozent weniger der Proteinoberfläche durch Ethanol bedeckt, als dies bei vergleichbaren Methanolaktivitäten der Fall wäre (Abb. 35).

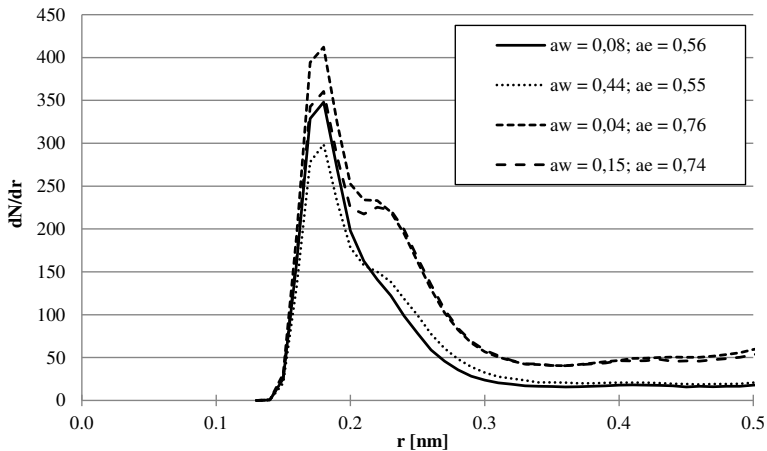
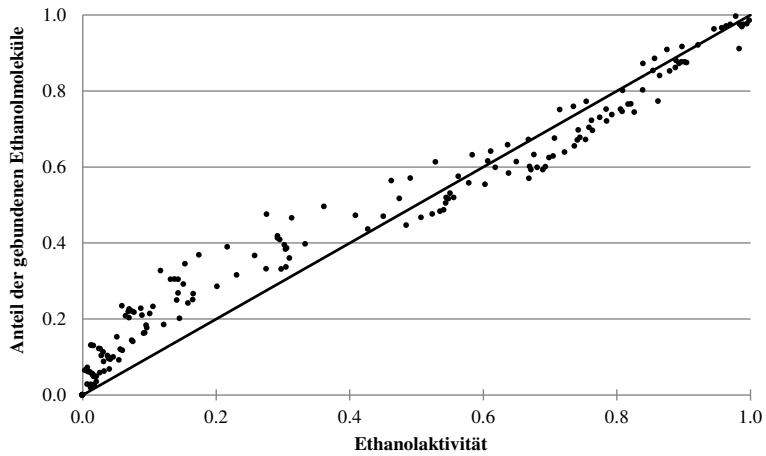


Abb. 34:  $dN/dr$ -Plot von Ethanol für unterschiedliche Mischungen



**Abb. 35: Bindung von Ethanol an die Oberfläche von CALB in Abhängigkeit von der Ethanolaktivität**

### 2.4.3.3. Bindung von Wasser an CALB in ternären Mischungen

Um die Effekte von organischen Lösungsmitteln auf CALB auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden molekulardynamische Simulationen der Lipase in ternären Mischungen aus Wasser, Methanol und Toluol bzw. Wasser, Ethanol und Toluol durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl der proteingebundenen Wassermoleküle für Abstände von 0,1 bis 0,5 nm von der Proteinoberfläche aus den Simulationen berechnet. Für alle untersuchten Wasserkonzentrationen nahm ein Maximum bei 0,175 nm (Abb. 36) in dN/dr-Plot beobachtet, welches mit zunehmendem Abstand von der Proteinoberfläche wieder abnahm. Dieser Peak entsprach den Wassermolekülen, die direkt an das Protein gebunden waren. Ein Grenzwert von 0,3 nm wurde für proteingebundene Wassermoleküle definiert. Alle Wassermoleküle, die weiter als 0,4 nm von der Proteinoberfläche entfernt waren, wurden der Bulkphase zugeordnet.

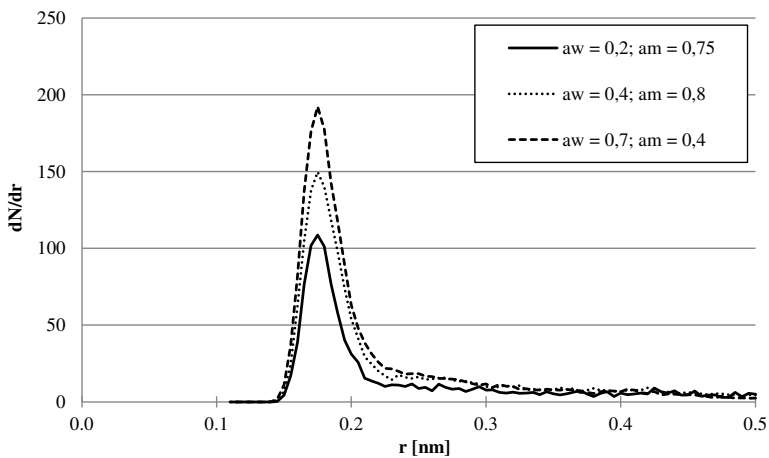


Abb. 36: dN/dr über r Plot für Wassers für unterschiedliche Systeme

Die Anzahl der proteingebundenen Wassermoleküle nahm mit zunehmender Wasseraktivität zu. Dabei zeigten sich unterschiedliche Verläufe: In Systemen ohne oder mit nur geringem Methanolanteil nimmt die Anzahl der proteingebundenen Wassermoleküle linear mit der Wasseraktivität zu. Bei einer Wasseraktivität von 1 bedecken die Wassermoleküle unter diesen Bedingungen ca. 10 Prozent der Proteinoberfläche. Bei Systemen mit einem Methanolanteil von



10 bis 20 Prozent nahm die Anzahl der proteingebundenen Wassermoleküle ebenfalls linear mit der Wasseraktivität zu. Bei einer Wasseraktivität von 1 wurden aber ca. 20 Prozent des Proteins mit Wasser bedeckt. Für Systeme mit einem Methanolanteil von über 35 Prozent Methanol nahm die Anzahl der proteingebundenen Wassermoleküle linear mit der Wasseraktivität zu. Hierbei konnten maximal ca. 60 - 70 Prozent der Proteinoberfläche mit Wasser bedeckt werden.

Die Gründe für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten liegen in den Mischungseigenschaften der ternären Mischung.

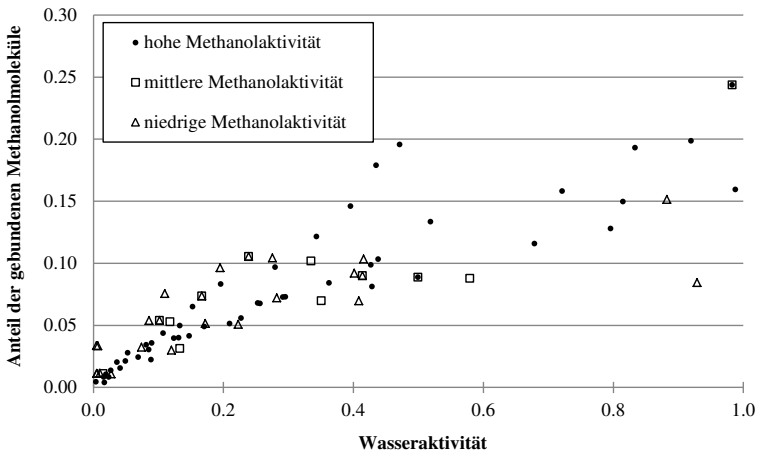
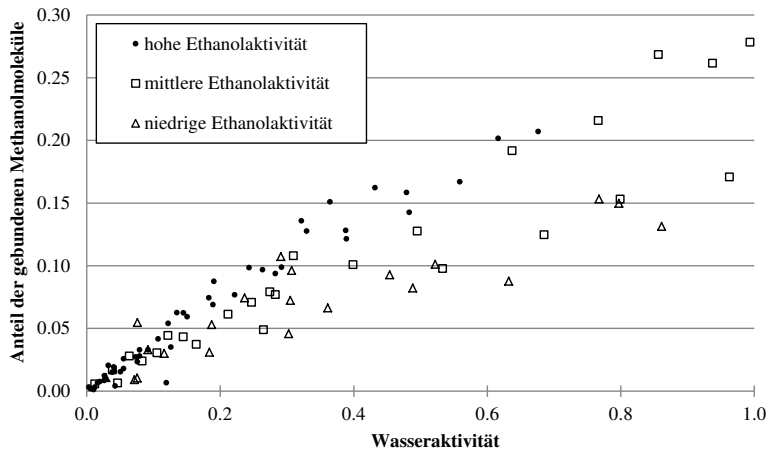


Abb. 37: Anteil der Oberfläche von CALB, der mit Wasser bedeckt ist, in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Alkohol = Methanol)



**Abb. 38:** Anteil der Oberfläche von CALB, der mit Wasser bedeckt ist, in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Alkohol = Ethanol)

Die Bindung von Wasser wurde auch in der Bindetasche untersucht. Ähnlich wie bei der Methanolbindung in der Bindetasche zeigte sich eine stärkere Streuung. Der qualitative Verlauf war aber mit der Bindung an das Gesamtprotein vergleichbar.

#### 2.4.3.4. Bindung von Toluol an CALB in ternären Mischungen

Die Anzahl der Toluolmoleküle im System hing von der Methanol- und der Wasseraktivität ab, wobei die Toluolkonzentration von 0 bis 100 Prozent (vol/vol) variierte. Die Anzahl der proteingebundenen Toluolmoleküle wurde für Entfernungen bis 0,50 nm von der Proteinoberfläche aus den Simulationen berechnet. Im  $dN/dr$ -Plot wurde ein Maximum zwischen 0,215 und 0,225 nm beobachtet (Abb. 39). Der bereits bestätigte Grenzwert von 0,3 nm wurde auch für diese Mischungen verwendet. Toluolmoleküle, die weiter als 0,3 nm von der Proteinoberfläche entfernt waren, wurden der Bulkphase zugeordnet.

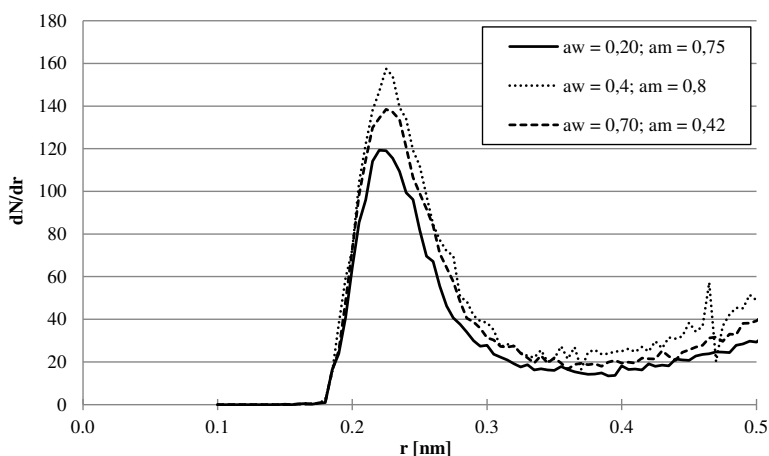
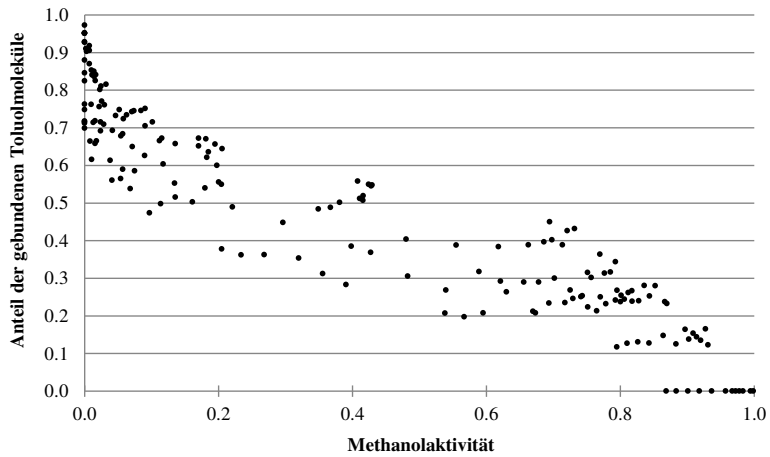


Abb. 39:  $dN/dr$ -Plot von Toluol für unterschiedliche Systeme

Die Anzahl der proteingebundenen Toluolmoleküle nahm beinahe linear mit der Methanolaktivität ab (Abb. 40). Die Wasseraktivität hatte nur einen minimalen Einfluss (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 40:** Anzahl der proteingebundenen Toluolmoleküle in Abhängigkeit der Methanolaktivität

### 3. Diskussion

#### 3.1. Simulation und Optimierung von organischen Lösungsmittelmodellen

##### 3.1.1. Dichte, Diffusion und Partialladungen

Molekulardynamische Simulationen von Flüssigkeiten werden häufig eingesetzt, um mikroskopische und makroskopische Systemeigenschaften zu modellieren [170]. Die Qualität der simulierten Eigenschaften hängt dabei von den Parametern des Kraftfelds ab. Während Parameter wie die Bindungslängen, Bindungswinkel und der Lennard-Jones-Parameter  $\sigma$  die Geometrie des Moleküls dominieren, bestimmen die Partialladungen und der Lennard-Jones-Parameter  $\epsilon$  die Interaktionsenergien zwischen den Molekülen. Deshalb ist es zu erwarten, dass die Eigenschaften, die von der molekularen Geometrie abhängen, wie z. B. die Dichte, empfindlich von der ersten Gruppe der Parameter abhängen, während Eigenschaften, die von molekularen Interaktionen abhängen, wie der Selbstdiffusionskoeffizient, empfindlich von der zweiten Gruppe der Parameter abhängen. Dies wurde bei der Entwicklung des SPC/E-Wassermodells gezeigt. Die Partialladungen des SPC-Modells wurden um lediglich 3,3 Prozent verändert, was dazu führte, dass sich der Selbstdiffusionskoeffizient um 30,5 Prozent änderte, während sich die Dichte nur um 2,8 Prozent änderte [65].

Während sich die Empfindlichkeit der Dichte und des Selbstdiffusionskoeffizienten auf Änderungen in den Partialladungen um bis zu drei Größenordnungen unterscheidet, hat jeder Parameter des Kraftfelds einen Einfluss auf alle Eigenschaften des Systems. Deshalb ist ein generelles Kraftfeld wie OPLS [187] immer ein Kompromiss zwischen einer geringen Anzahl an Kraftfeldparametern, die oft an einen Atomtypen gebunden sind, und einer zuverlässigen Reproduktion experimenteller Eigenschaften. Im OPLS *all-atom*-Kraftfeld werden aliphatische Alkohole durch fünf Atomtypen beschrieben: Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffatom aus einer der fünf Gruppen:  $C_{\alpha}$ ,  $C_{\text{non\_alpha}}$ ,  $H_{\text{hydroxy}}$ ,  $H_{\text{nonhydroxy}}$  und O. Da die Lennard-Jones Parameter und die Partialladungen basierend auf den Atomtypen zugewiesen werden, ist die Partialladung der Hydroxylgruppe für alle aliphatischen Alkohole identisch. Trotz dieser geringen Anzahl an unterschiedlichen Parametern für die ungebundenen Wechselwirkungen werden viele thermodynamischen Eigenschaften der Flüssigkeiten wie Dichte und der Verteilungskoeffizient [90, 188] zuverlässig durch das OPLS *all-atom*-Kraftfeld beschrieben. Allerdings wurden die dynamischen Eigenschaften nicht bei der Entwicklung und der Optimierung des OPLS-Kraftfeldes berücksichtigt, was in einer beachtlichen Abweichung des

Selbstdiffusionskoeffizienten von den experimentellen Werten resultierte, während die Dichte der Lösungsmittel zuverlässig reproduziert wurde. Nach einer Feineinstellung der Partialladungen der Hydroxylgruppen und der damit verbundenen Änderungen der Partialladung von weniger als drei Prozent waren sowohl die Dichte als auch der Selbstdiffusionskoeffizient in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten. Dies galt nicht nur für die Temperatur, bei der die Partialladungen modifiziert wurden (298 K), sondern für einen breiten Temperaturbereich zwischen 288 und 338 K. Die modifizierten Partialladungen sind dabei immer noch in Übereinstimmung mit quantenmechanischen Berechnungen, da Änderungen von weniger als drei Prozent, die im Zuge der Feinanpassung an den Partialladungen vorgenommen wurden, immer noch innerhalb der Präzision von quantenmechanischen Methoden wie RESP-fitting liegen. Für Monoalkohole war es ausreichend, die Partialladung der Hydroxylgruppe fein einzustellen, wohingegen für ein zuverlässiges Modell von Glycerol die Partialladungen aller Atome modifiziert werden mussten [76, 181]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für die Optimierung der Di- und Trialkohole neben den Partialladungen der Hydroxylgruppe auch noch die Partialladungen der Kohlenstoffatome fein eingestellt werden müssen. Diese Notwendigkeit ist auch aus den Abweichungen des thermischen Expansionskoeffizienten und des Selbstdiffusionskoeffizienten von den experimentellen Werten über dem untersuchten Temperaturbereich ersichtlich. Wenn solche umfangreichen Veränderungen am Modell vorgenommen werden, sollte das Modell zusätzlich auf weitere Eigenschaften wie Verteilungskoeffizient usw. getestet werden. Wie bei der Optimierung des Toluolmodells ersichtlich wurde, müssen nicht zwangsläufig alle Eigenschaften des Modells in Ordnung sein, nur weil die Dichte und der Selbstdiffusionskoeffizient in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten sind.

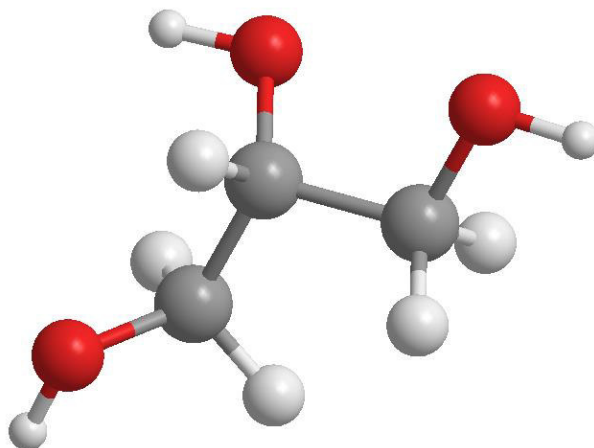
### 3.1.2. Partialladungen in Mono-, Di- und Trialkoholen

Der Unterschied zwischen den Partialladungen des Wasserstoffs und des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe betrug für Methanol 1,131 und nahm dann kontinuierlich um 5 Prozent auf 1,075 für 1-Oktanol ab. Im Vergleich dazu beträgt die Differenz im OPLS *all-atom*-Kraftfeld für alle aliphatischen Alkohole 1,101. Obwohl die Partialladungen auf die Diffusionseigenschaften der Lösungsmittel eingestellt wurden, ist die abnehmende Polarität mit zunehmendem Molekulargewicht in Übereinstimmung mit den chemischen Eigenschaften der primären aliphatischen Alkohole: Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Acidität der Hydroxylgruppe ab [170]. Der Zusammenhang zwischen Diffusionseigenschaften und Acidität wurde bestätigt, als primäre und sekundäre Alkohole verglichen wurden. Der Unterschied zwischen den Partialladungen des Wasserstoffs und des Sauerstoffs war für 1-Propanol (1,131) geringfügig größer als für 2-Propanol (1,109). Dies ist in Übereinstimmung mit der erhöhten Acidität der primären Alkohole im Vergleich zu den sekundären Alkoholen (pKa 16,1 bzw. 17,1).

Allerdings war die Korrelation zwischen der Acidität und der Polarität der Hydroxylgruppe bei den Dialkoholen nicht erkennbar. Der Effekt der zweiten Hydroxylgruppe wurde untersucht, indem die Polarität der Hydroxylgruppen in Dialkoholen und Monoalkoholen verglichen wurde. Bei 1,2- und 1,3-Propandiol betrug die Differenz zwischen den Partialladungen des Wasserstoffs und des Sauerstoffs 1,057 bzw. 1,077. Die Polarität der Hydroxylgruppen unterschied sich damit zum einen geringfügig, zum anderen war die Polarität um ca. 5 Prozent geringer als die Polarität der Hydroxylgruppen in den vergleichbaren Monoalkoholen 2-Propanol und 1-Propanol. Obwohl die Hydroxylgruppen von 1,3-Propandiol geringfügig polarer sind als die von 1,2-Propandiol, ist letzteres geringfügig acider als 1,3-Propandiol (pKa 14,9 bzw. 15,1). Des Weiteren sind Dialkohole acider als die entsprechenden Monoalkohole: Der pKa von 1,3-Propandiol und 1,2-Propandiol ist 1 bzw. 2 Einheiten geringer als der pKa der entsprechenden Monoalkohole 1-Propanol und 2-Propanol (pKa 16,1 bzw. 17,1). Dies widerspricht der geringeren Polarität der Hydroxylgruppen in den Dialkoholen im Vergleich zu den Monoalkoholen. Die höhere Acidität von Ethylenglycol (pKa 13,6) im Vergleich zu Ethanol (pKa 15,5) spiegelt sich nicht in den Partialladungen der Hydroxylgruppen von Ethylenglycol und Ethanol wider. Diese Abweichungen zwischen den Partialladungen und der Acidität verdeutlichen die Limitationen der verwendeten Methode, bei der nur die Partialladungen der Hydroxylgruppe variiert wurden, während die Partialladungen der C-, CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Atome aus dem OPLS *all-atom*-

Kraftfeld übernommen wurden. Wie bereits bei der Simulation der Alkane gezeigt wurde, sind diese Kraftfeldparameter dazu geeignet, die Reihe der linearen Alkane in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten zu beschreiben. Für verzweigte und zyklische Alkane ergaben sich hingegen starke Abweichungen.

Das Problem mit verzweigten Molekülen wurde auch beim Trialkohol Glycerol ersichtlich, der starke Abweichungen sowohl bei der Dichte als auch bei dem Selbstdiffusionskoeffizienten von experimentellen Werten zeigte, wenn das OPLS *all-atom*-Kraftfeld verwendet wurde. Es war nicht möglich, dieses Modell durch eine Veränderung der Polarität der Hydroxylgruppen zu verbessern. Ein zuverlässiges Modell konnte nur dadurch erhalten werden, dass von einem anderen Glycerolmodell ausgegangen wurde [181, 189], bei dem die Partiaalladungen der Hydroxylgruppe und des C2-Atoms reduziert, und die Partiaalladungen des C1- und C3-Atoms im Vergleich zum OPLS *all-atom*-Kraftfeld erhöht waren.



**Abb. 41: Kugel-Stab-Modell von Glycerol, erstellt mit ChemDraw**

Ausgehend von diesem Modell konnte durch Feineinstellen der Partiaalladung der Hydroxylgruppe ein Glycerolmodell erstellt werden, das sowohl Dichte als auch den Selbstdiffusionskoeffizienten in guter Übereinstimmung mit experimentellen Werten wiedergab. Dies lässt darauf schließen, dass die Partiaalladungen für C, CH, CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub>, die im OPLS *all-*



*atom*-Kraftfeld verwendet werden, für Monoalkohole geeignet sind. Für die Verwendung in Di- und Trialkoholen müssten die Partiaalladungen allerdings noch optimiert werden. Eine weitere Optimierung dieser Parameter könnte zudem dazu beitragen, andere Eigenschaften wie die Permittivität und die radiale Dichteverteilung zu verbessern.

### 3.1.3. Systemgröße und Equilibrierungszeit

Für eine zuverlässige und reproduzierbare Simulation sollten die Systemgröße und die Equilibrierungszeit 10.000 Atome und 10 ns übersteigen. Für Systemeigenschaften wie die Permittivität sind Simulationszeiten von über 30 ns notwendig. In bereits publizierten Studien wurden Methanol und Ethanol mit dem OPLS-Kraftfeld bei der gleichen Temperatur wie in dieser Arbeit simuliert. Allerdings wichen die berechneten Dichten von den Ergebnissen dieser Arbeit um 0,6 bzw. 0,8 Prozent ab [187]. Diese Abweichungen sind eine Folge der unterschiedlichen Systemgrößen, die in den beiden Studien verwendet wurden: Während die Jorgensen-Gruppe Systeme mit 267 Molekülen untersuchte, enthielten die Systeme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, 12.000 bzw. 8.300 Moleküle. Die Abhängigkeit der simulierten Eigenschaften von der Systemgröße zeigt sich besonders deutlich bei der Diffusion: Wird die Systemgröße von 2.000 auf 20.000 Wasseratome erhöht, so verringert sich der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient um mehr als 10 Prozent. Deshalb sollten bei der Parametrisierung der Kraftfelder immer ausreichend große Systeme verwendet werden, um zu gewährleisten, dass die simulierten Eigenschaften unabhängig von der Systemgröße sind. Allerdings wurde dies nicht bei den Kraftfeldern berücksichtigt, die im Moment in Verwendung sind: Die Simulation eines Systems mit 50.000 SPC/E Wassermolekülen ergab eine Abweichung vom experimentellen Diffusionskoeffizienten von 8 Prozent, was vermutlich daran lag, dass bei der Optimierung des SPC/E-Modells ein System von lediglich 256 Molekülen verwendet wurde [65].

Durch die Feineinstellung der Partialladungen der Hydroxylgruppe von 3,2 Prozent wurde der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient von aliphatischen Alkoholen um 30 Prozent verändert, während sich die Dichte um weniger als 1 Prozent änderte. Durch eine Feineinstellung der Partialladungen konnte sowohl die simulierte Dichte als auch der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient in gute Übereinstimmung mit experimentellen Werten gebracht werden. Allerdings wichen sowohl der thermische Ausdehnungskoeffizient als auch die Permittivität noch stark von den experimentellen Werten ab. Weitere Verbesserungen könnten erzielt werden, indem die Kohlenstoffatome in den Optimierungsprozess mit eingebunden würden. Die Qualität des jeweiligen Modells kann auf diese Weise verbessert werden, allerdings auf Kosten einer höheren Komplexität des Kraftfelds und eines Verlustes der Transferierbarkeit.

### 3.2. Inaktivierung von CALB

Lipase-katalysierte Alkoholysereaktionen werden sowohl in einem breiten Spektrum organischer Lösungsmittel als auch in lösungsmittelfreien Systemen eingesetzt (Review: [143, 144]). Obwohl der katalytische Mechanismus der Alkohololyse (Ping-Pong-Bi-Bi) bereits gut untersucht und verstanden ist [190] und das System nur aus fünf unterschiedlichen Komponenten (dem Enzym, den beiden Substraten Alkohol und Ester, dem Wasser und dem organischen Lösungsmittel) besteht, gibt es immer noch überraschende Ergebnisse bei der Reaktionskinetik bei unterschiedlichen Bedingungen. Die Komplexität der Reaktionskinetik entsteht aus der Tatsache, dass alle Komponenten interagieren. Dadurch ist es schwierig, relevante Effekte zu erkennen, ihren molekularen Mechanismus zu identifizieren und das Verhalten des Systems vorherzusagen. Um die lipase-katalysierte Alkohololyse in organischen Lösungsmitteln zu untersuchen, wurde eine Modellreaktion betrachtet, die über einen ausreichenden Grad an Komplexität verfügt. Die Anfangsgeschwindigkeiten der von CALB katalysierten Alkohololyse wurden bei einer konstanten Vinylacetatkonzentration von 15,2 Prozent (vol/vol) für unterschiedliche Alkoholkonzentrationen in Toluol bestimmt.

Dabei konnten drei Bereiche unterschieden werden: Für niedrige Methanolkonzentrationen von 0,7 Prozent (vol/vol) wurde eine hohe katalytische Aktivität beobachtet (Phase 1). Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Alkoholkonzentration ab, bis eine Methanolkonzentration von 10 Prozent (vol/vol) erreicht ist (Phase 2). Für Methanolkonzentrationen zwischen 10 und 60 Prozent (vol/vol) ist die Reaktionsgeschwindigkeit annähernd konstant (Phase 3). Die konzentrationsabhängige Reaktionsgeschwindigkeit in Phase 1 und 2 wurde bereits beobachtet und mit einem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus und einer Inhibition durch Methanol [134-136] modelliert. Allerdings wurde die in Phase 3 konstante Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Methanolkonzentrationen noch nicht beschrieben und scheint in einem Widerspruch zur Substratinhibition durch die jeweiligen Alkohole zu stehen.

### 3.2.1. Inaktivierung von CALB durch Alkohole

#### Phase 1 ( $c_{\text{MeOH}} < 1\%$ )

Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei sehr niedrigen Methanolkonzentrationen von unter einem Prozent (vol/vol) gemessen, was bereits bei anderen CALB-katalysierten Alkoholysen und Aminolysen beobachtet wurden [135, 136]. Unter der Annahme einer idealen Methanol/Toluol-Mischung würde der starke Anstieg der katalytischen Aktivität zwischen 0 und 0,7 Prozent (vol/vol) Methanol einer sehr hohen Affinität der Lipase für Methanol entsprechen. Wird allerdings die thermodynamische Aktivität von Methanol anstelle der Konzentration verwendet, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu berechnen [135], so ergibt sich ein  $K_{\text{M,MeOH}}$  von 0,2. Das entspricht einer moderaten Bindungsaffinität. Der starke Anstieg, der zwischen null und einem Prozent (vol/vol) beobachtet wurde, ist deshalb keine Konsequenz einer starken Bindung von Methanol an CALB, sondern ergibt sich daraus, dass es sich bei Methanol/Toluol-Mischungen um hochgradig nicht-ideale Mischungen handelt: Für geringe Methanolkonzentrationen (Molfraktion von Methanol  $< 0,1$ ; Methanolkonzentration  $< 4\%$  (vol/vol)) ist der Aktivitätskoeffizient und die thermodynamische Aktivität bis zu neun mal höher als dies für eine ideale Mischung anzunehmen wäre. Obwohl Methanol und Toluol komplett mischbar sind, verhält sich der Aktivitätskoeffizient so, als ob Methanol nur eine beschränkte Löslichkeit von nur 6 Prozent (vol/vol) ( $\chi_{\text{MeOH}} = 0,15$ ) in Toluol hätte (Abb. 8).

Der molekulare Mechanismus, der zu dieser Nicht-Idealität führt, spiegelt sich in dem großen Unterschied zwischen der Polarität von Methanol ( $\log P = -0,82$ ) und Toluol ( $\log P = 2,73$ ) wider. Als Folge seiner hohen Polarität grenzt sich Methanol vom unpolaren Toluol ab. Dies spiegelt sich in einem hohen Aktivitätskoeffizienten und einer erhöhten thermodynamischen Aktivität bei zunehmender Methanolkonzentration wider. Bei 29 Prozent (vol/vol) Methanol ist die Perkolationsgrenze erreicht [191] und eine bikontinuierliche Mikroemulsion [192] wird gebildet. Dies wurde bereits für Wasser/Methanol-Mischungen beobachtet [193].

### **Phase 2 ( $1\% < c_{\text{MeOH}} < 10\%$ )**

Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit von der Methanolkonzentration wurde erfolgreich mit einem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus mit Substratinhibition modelliert [134-136]. Methanol ist dabei sowohl Substrat als auch kompetitiver Inhibitor. Die Reaktionskinetik in dieser Phase wird durch die Inhibition des Substrates Methanol mit einem  $K_{i,\text{MeOH}}$  von 0,2 dominiert. Zwischen  $\chi_{\text{MeOH}} = 0,025$  und 0,222 (das entspricht 1 und 10 Prozent (vol/vol) Methanol) nahm der Aktivitätskoeffizient von Methanol von 8,9 auf 3,1 ab. In dieser Phase ist die Zunahme der thermodynamischen Aktivität mit der Zunahme der Methanolkonzentration größer, als dies für eine ideale Mischung anzunehmen wäre. Allerdings ist die Zunahme in dieser Phase geringer als in Phase 1. Der molekulare Mechanismus der Substratinhibition spiegelt sich in der Bindung der Methanolmoleküle an die Acetatbindestelle von CALB wider, an der Methanol in Wettbewerb mit dem Substrat Vinylacetat steht. Dieser Mechanismus wird durch molekulardynamische Simulationen von CALB in ternären Mischungen bestätigt. Die Bindungskonstante von Methanol an die Acetatbindestelle ( $K_{i,\text{MeOH}} = 0,22 - 0,25$ ), die aus molekulardynamische Simulationen berechnet wurde, ist in guter Übereinstimmung mit der Inhibitionskonstante  $K_{i,\text{MeOH}}$ , die aus experimentellen Daten abgeleitet wurde.

### **Phase 3 ( $10\% < c_{\text{MeOH}} < 60\%$ )**

Zwischen  $\chi_{\text{MeOH}} = 0,22$  und 0,78 (entspricht 10 und 60 Prozent (vol/vol) Methanol) nimmt der Aktivitätskoeffizient von Methanol von 3,1 auf 1,1 ab. Dadurch nimmt die thermodynamische Aktivität von Methanol in dieser Phase nur geringfügig zu. Der Einfluss der Methanolkonzentration auf die Substratinhibition wird dadurch gedämpft und ist deswegen viel geringer, als dies in einer idealen Mischung anzunehmen wäre.

Würde es sich bei den Methanol-Toluol-Mischungen um ideale Mischungen handeln, so wäre zu erwarten, dass die katalytische Aktivität des Enzyms auf Null abnimmt, da es von Methanol inhibiert wird. Im Gegensatz zu dieser Annahme wird eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit für hohe Methanolkonzentrationen beobachtet. Dies ist eine Folge aus der Thermodynamik dieser nicht-idealen Mischung. Drei Faktoren beeinflussen die Reaktionsgeschwindigkeit:

- (1) In einer idealen Mischung wäre es zu erwarten, dass der inhibierende Effekt von Methanol zunimmt und die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt, wenn die Methanolkonzentration erhöht wird. Allerdings handelt es sich bei dieser ternären Mischung um eine nicht-ideale Mischung und der thermodynamische Aktivitätskoeffizient ist bei hohen Methanolkonzentrationen sehr niedrig, wodurch die Zunahme der thermodynamischen Aktivität geringer ist, als dies aus der Zunahme der Konzentration zu erwarten wäre. Dadurch ist zu erwarten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit weniger stark abnimmt, als dies in einer idealen Mischung anzunehmen wäre.
- (2) Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts von Methanol und Toluol nimmt die Gesamtanzahl der im System befindlichen Moleküle in einem bestimmten Volumen zu, wenn das Verhältnis von Methanol zu Toluol zunimmt. Infolgedessen, nimmt die Molfraktion des zweiten Substrates Vinylacetats ab, wodurch zu erwarten wäre, dass die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt.
- (3) Die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat nimmt mit zunehmender Methanolkonzentration zu, obwohl die Konzentration von Vinylacetat konstant ist. Dies ist eine weitere Folge der nicht-idealen ternären Mischung. Dadurch nimmt auch die thermodynamische Aktivität des Vinylacetats zu und dadurch wäre zu erwarten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt.

Ein Verlust der katalytischen Aktivität von CALB durch Inkubation in Methanol wurde nur bei hohen Methanolkonzentrationen von 60 Prozent (vol/vol) und einer niedrigen Wasseraktivität von 0,02 (Abb. 7, Abb. 51, Abb. 52) beobachtet. Bei hohen Wasseraktivitäten oder niedrigen Methanolkonzentrationen war das Enzym stabil. Dementsprechend wurde eine geringe Zunahme der katalytischen Aktivität für hohe Methanolkonzentrationen bei einer hohen Wasseraktivität von 0,09 beobachtet, wie sie aus dem Modell vorhergesagt wurde. Für niedrige Wasseraktivitäten war die katalytische Aktivität geringer, als durch das Modell vorhergesagt, da das Enzym bei diesen Wasseraktivitäten inaktiviert wurde.

### 3.2.2. Unterschiede zwischen Methanol und Ethanol

Für die lipasekatalysierte Alkohololyse werden üblicherweise kurzkettenige Alkohole wie Methanol und Ethanol sowie hydrophobe sperrige Ester eingesetzt. Um Hydrolyse zu vermeiden, wird die Reaktion in organischen Lösungsmitteln oder lösungsmittelfreien Systemen [143, 144, 194] durchgeführt. Unter diesen Bedingungen inaktivieren beide Alkohole das Enzym bereits bei geringen Alkoholkonzentrationen, während die meisten Enzyme empfindlicher gegenüber Methanol sind. Um diese experimentellen Beobachtungen zu erklären, wurde angenommen, dass sich die Interaktionen von Methanol mit dem Enzym von denen von Ethanol mit dem Enzym unterscheiden. Diese Mechanismen wurden durch Modellierung untersucht und Lipasen mit einer gesteigerten Methanoltoleranz wurden entwickelt [195].

Um den Effekt von Methanol und Ethanol auf das Enzym bei der Alkohololyse systematisch zu vergleichen, wurden systematische Studien durchgeführt. Dazu wurde ein Modellsystem einer Mischung aus Methanol (bzw. Ethanol) bei unterschiedlichen Konzentrationen, Vinylacetat bei einer konstanten Konzentration von 15,2 Prozent (vol/vol), Toluol als Lösungsmittel sowie einer geringen Menge Wasser ( $a_w = 0,09$ ) untersucht. Als Enzym wurde die Lipase B aus *C.antarctica* [24] verwendet. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus mit Substratinhibition modelliert [134-136]. Ausgehend von dem Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der katalytischen Aktivität von Methanol und Ethanol wurde eine alternative Erklärung vorgeschlagen, um die beobachteten Unterschiede zwischen Methanol und Ethanol zu erklären.

Wie bereits oben erwähnt, sollten alle konzentrationsabhängigen biochemischen Eigenschaften des jeweiligen Enzyms wie  $K_M$  und  $K_I$  als thermodynamische Aktivitäten anstelle von Konzentrationen angegeben werden. Unter diesen Bedingungen sind die Michaelis-Konstante  $K_M$  und die Inhibierungs-Konstante  $K_I$  annähernd identisch für Methanol und Ethanol ( $K_M = 0,22$  und  $0,19$ ;  $K_I = 0,44$  und  $0,38$ ). Interpretiert man  $K_M$  und  $K_I$  als Bindungskonstanten entsprechend den Annahmen des Michaelis-Menten-Modells, so verläuft die Bindung von Methanol und Ethanol an die Substratbindestelle von CALB annähernd identisch. Infolgedessen sind die anfängliche Steigung der katalytischen Aktivität für niedrige Alkoholaktivitäten, der Wert der Alkoholaktivität, der zu der höchsten katalytischen Aktivität führt und die Abnahme der katalytischen Aktivität für höhere Alkoholaktivitäten für Methanol und Ethanol ähnlich. Bei beiden Alkoholen wird die maximale katalytische Aktivität von CALB bei Alkoholaktivitäten

von 0,19 bzw. 0,21 für Methanol bzw. Ethanol erreicht. Die experimentell beobachteten Unterschiede bei der Konzentrationsabhängigkeit von Methanol und Ethanol werden nicht durch Unterschiede der Interaktion der beiden Alkohole mit dem Enzym verursacht, sondern sind eine Folge der Nicht-Idealität der verwendeten Mischungen. Als Folge der Nicht-Idealität der Mischungen ist der thermodynamische Aktivitätskoeffizient bei einer Alkoholaktivität von 0,2 größer als in einer idealen Mischung und unterscheidet sich zudem beachtlich zwischen Methanol und Ethanol (8,5 bzw. 6,1). Infolgedessen wird mit Methanol als Substrat das Maximum der katalytischen Aktivität bei einem viel kleineren molaren Verhältnis von Alkohol zu Toluol erreicht, als wenn Ethanol als Substrat verwendet wird ( $\chi = 0,018$  bzw.  $0,035$ ). Zusätzlich unterscheiden sich das Molekulargewicht von Methanol (32 g/mol) und Ethanol (46 g/mol) und ihr molares Volumen ( $40,46 \text{ cm}^3/\text{mol}$  bzw.  $58,39 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ) um 40 Prozent. Dies führt zu einer weiteren Verschiebung des Maximums der Aktivität von Ethanol im Vergleich zu Methanol um den Faktor 2, wenn die Alkoholkonzentration in Volumenprozent gemessen wird, bzw. um 2,8, wenn in g/l gemessen wird. Deshalb unterscheiden sich die Maxima der katalytischen Aktivität für Methanol und Ethanol beachtlich (0,7 und 2 Prozent (vol/vol) bzw. 6 und 18 g/l), obwohl die Interaktionen der beiden Alkohole mit der Lipase annähernd identisch sind.



### 3.2.2.1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkoholkonzentration

Das kinetische Modell, das für die Analyse der Reaktionsgeschwindigkeit von CALB in Abhängigkeit der Alkoholkonzentration verwendet wurde, enthält vier Parameter für jeden Alkohol. Vier Parameter (die Michaelis-Konstanten und die Inhibitions-Konstanten von Methanol und Ethanol) wurden durch umfangreiche molekulardynamische Simulationen von CALB in ternären Mischungen bestimmt. Für die verbleibenden 4 Parameter wurden die beiden unabhängigen Messungen von Methanol und Ethanol gefittet, wobei eine identische Michaelis-Konstante von Vinylacetat für jeden Alkohol angenommen wurde.

Der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit kann in drei Phasen unterteilt werden:

- (1) Bei sehr geringen Alkoholkonzentrationen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit stark mit zunehmender Alkoholkonzentration zu und erreicht ein Maximum bei 0,7 bzw. 2 Prozent (vol/vol) für Methanol bzw. Ethanol. Die unterschiedlichen Steigungen für Methanol und Ethanol werden durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Methanol/Toluol- und Ethanol/Toluol-Systeme verursacht. Die Aktivitätsmessungen, bei denen eine andere Enzymstammlösung verwendet wurde, unterschieden sich um denselben Faktor (ca. 20 Prozent) sowohl für Methanol als auch für Ethanol. Dies lässt auf eine unterschiedliche spezifische Aktivität der beiden Stammlösungen schließen. Ebenfalls beachtlich ist die Tatsache, dass die maximale Aktivität gegenüber Ethanol und der entsprechende Parameter  $v_{\max}$  um den Faktor 2 größer sind als für Methanol. Diese Zunahme der Aktivität kann teilweise dadurch erklärt werden, dass das Enzym bei geringen Alkoholkonzentrationen aktiviert wird. Diese Aktivierung ist bei Ethanol stärker ausgeprägt als bei Methanol.
- (2) Bei thermodynamischen Aktivitäten von Methanol und Ethanol über 0,2 wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch Substratinhibition mit  $K_I$  von 0,44 und 0,38 reduziert. Allerdings geht die Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Konzentrationen nicht gegen Null, sondern erreicht einen Wert von 59 Prozent (Methanol) und 82 Prozent (Ethanol) der maximalen katalytischen Aktivität bei einer thermodynamischen Aktivität von 0,7. Die relativ geringe Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit wird durch zwei Faktoren verursacht: die hohe Inhibierungskonstante  $K_I$  von 0,4 und die Zunahme der

thermodynamischen Aktivität des zweiten Substrates, Vinylacetat. Dies wird vor allem bei Ethanol/Toluol-Mischungen deutlich, bei denen die thermodynamische Aktivität von Vinylacetat fast um den Faktor zwei von 0,17 auf 0,37 zunimmt, obwohl die Konzentration von Vinylacetat konstant ist. Auch hier beeinflussen die thermodynamischen Eigenschaften der Mischung die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms, indem sich die effektive Konzentration von Vinylacetat fast verdoppelt, wodurch die Inhibierung durch Ethanol kompensiert wird.

- (3) Dieser Effekt ist besonders offensichtlich für hohe Konzentrationen mit thermodynamischen Aktivitäten von Methanol und Ethanol von über 0,7. Das Modell sagt hier einen steilen Anstieg der katalytischen Aktivität - insbesondere für Ethanol - voraus. Eine geringfügige Zunahme der katalytischen Aktivität wurde für Methanol experimentell bestätigt, konnte aber bei Ethanol nicht beobachtet werden. Dies könnte durch einen weiteren, zusätzlichen Effekt von Methanol und Ethanol verursacht werden, der in dem kinetischen Modell nicht berücksichtigt wurde: der Inaktivierung des Enzyms, die vermutlich durch langsame Aggregation ausgelöst wird.

### 3.2.3. Zusammenfassung

Die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität einer CALB-katalysierten Alkoholyse von der Methanol- bzw. Ethanolkonzentration wurde unter der Annahme von drei einfachen Annahmen modelliert:

- (1) Einem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus
- (2) Kompetitive Inhibition durch die Bindung von Methanol bzw. Ethanol an die Substratbindestelle von CALB
- (3) Verwendung von thermodynamischen Aktivitäten anstelle von Konzentrationen.

Als Folge daraus wurde die höchste katalytische Aktivität bei sehr geringen Alkoholkonzentrationen (Methanol: 0,7 Prozent (vol/vol), Ethanol 1,5-2 Prozent (vol/vol)) beobachtet. Aufgrund der Inhibition durch den Alkohol nahm die katalytische Aktivität ab, wenn die Methanolkonzentration von 1 auf 10 Prozent (vol/vol) bzw. die Ethanolkonzentration von 2 auf 30 Prozent (vol/vol) erhöht wurde. Für höhere Methanolkonzentrationen über 10 Prozent (vol/vol) bzw. Ethanolkonzentrationen über 30 Prozent (vol/vol) nahm die katalytische Aktivität von CALB nicht weiter ab, was auf den geringen thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten von Methanol bzw. Ethanol und die Zunahme der thermodynamischen Aktivität von Vinylacetat zurückzuführen war. Deshalb wurde erwartet, dass die katalytische Aktivität für hohe Methanol- bzw. Ethanolkonzentrationen sogar noch minimal zunimmt. Die experimentell beobachtete Inhibitionskonstante der beiden Alkohole wurde durch molekulare Modellierung bestätigt. Um die Inhibitionskonstante zuverlässig berechnen zu können, muss eine ausreichende Anzahl an Datenpunkten vorhanden sein, die sich über den gesamten Aktivitätsbereich des untersuchten Alkohols verteilen. Wenn generell zu wenige Datenpunkte vorhanden sind oder die Datenpunkte ungleichmäßig verteilt sind, sind Ungenauigkeiten in der jeweils berechneten Konstante die Folge.

Es wird davon ausgegangen, dass andere Effekte nur eine untergeordnete Rolle spielen. Nichtkompetitive Inhibition durch die Alkohole wurde nur bei sehr hohen Methanolkonzentrationen und geringen Wasseraktivitäten beobachtet. Eine Produktinhibition konnte ausgeschlossen werden, da Vinylacetat als Substrat verwendet wurde und die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wurde.

Demnach gibt es zwei Hauptfaktoren, die für die beobachtete Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von CALB von der Alkoholkonzentration verantwortlich sind: Die thermodynamischen Eigenschaften der nicht-idealen Substrat-Lösungsmittelmischung und die molekularen Interaktionen zwischen Substrat und Enzym.

Generell ist es ratsam, die Beschreibung der Lösungsmittelsysteme durch thermodynamische Eigenschaften anstelle der üblicherweise verwendeten Konzentration vorzunehmen. In zahlreichen Publikationen wurde gezeigt, dass Lipasen wie CALB in nicht-wässrigen Lösungen bereits bei geringen Methanolkonzentrationen inaktiviert werden, während sie deutlich höhere Konzentrationen an Ethanol, Propanol und Butanol tolerieren können [152]. Eine Umrechnung der Konzentration in thermodynamische Aktivitäten liefert einen anderen qualitativen Verlauf: Unter der Annahme von Messungenauigkeiten unterscheidet sich der inaktivierende Effekt von Methanol nicht mehr merklich von dem der anderen Alkohole.

### 3.3. Bindung von Wasser, Methanol, Ethanol und Toluol an das Enzym

Die Bindung von Lösungsmittelmolekülen an die Oberfläche der *C.antarctica* Lipase B wurde in Reinstoffen, binären Mischungen aus Wasser und Alkoholen bzw. Toluol, sowie ternären Mischungen aus Wasser, Alkohol und Toluol simuliert. Bei allen betrachteten binären und ternären Systemen handelt es sich um nicht-ideale Systeme. Zur Beschreibung der Systeme wurde deshalb die thermodynamische Aktivität der einzelnen Komponenten verwendet und nicht die Konzentration. Zusätzlich zur Nicht-Idealität der Mischungen kommt hinzu, dass die Mischungen teilweise eine Löslichkeitsgrenze aufweisen: Während Wasser und die beiden betrachteten Alkohole Methanol und Ethanol, sowie die beiden Alkohole und Toluol in jedem Verhältnis mischbar sind, sind Wasser und Toluol nur in jeweils sehr geringen Mengen löslich. Zudem ist Wasser ein Lösungsmittel mit außergewöhnlichen Eigenschaften. Unter anderem kann jedes Wassermolekül bis zu vier Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [196]. Daraus folgt, dass Wassermoleküle bevorzugt an andere Wassermoleküle binden. Zudem sind sie die bevorzugten Bindungspartner von anderen polaren Molekülen, was zu zahlreichen Anomalien wie der unvollständigen Mischung in Wasser-Alkohol-Mischungen führt [193].

Bei binären Systemen aus Wasser und Alkoholen und Wasser und Toluol handelt es sich um nicht-ideale Mischungen. Die Bindung von Wasser und Alkoholen an CALB in diesen Mischungen verläuft nicht-linear mit der Wasser- oder Alkoholaktivität.

Bei den ternären Systemen aus Wasser, Alkohol und Toluol nimmt nun die Komplexität der Systeme weiter zu. Eine Eigenschaft dieser Systeme ist, dass die drei Komponenten nicht in jedem Verhältnis mischbar sind: Während für binäre Systeme gilt: Wasser und Methanol, bzw. Ethanol sind in jedem Verhältnis mischbar. Dies gilt auch für binäre Mischungen aus Toluol und Methanol bzw. Ethanol. Allerdings ist Wasser nur in sehr geringen Mengen in Toluol löslich. Dies gilt auch für Toluol in Wasser.

Bei ternären Systemen aus Wasser, Alkohol und Toluol erhöht sich die Komplexität um einen weiteren Faktor: Die vormals unlöslichen Wasser/Toluol-Mischungen werden ab einer Methanolkonzentration von 35 Prozent (vol/vol) (bzw. einer Ethanolkonzentration von 50 Prozent (vol/vol) in jedem Verhältnis mischbar. Daraus ergeben sich drei Bereiche:

- (1) Ein Bereich, in dem alle drei Komponenten des Systems mischbar sind. In diesem Bereich ist die thermodynamische Aktivität aller Komponenten kleiner als eins.

- (2) Ein Bereich, in dem die Komponenten nicht mischbar sind. Hierbei ist die thermodynamische Aktivität mindestens einer Komponente größer als 1
- (3) Einen weiteren Bereich (bzw. eine Linie), bei dem/der die thermodynamische Aktivität einer Komponente genau 1 ist.

Die oben beschriebenen binären Mischungen aus Wasser und Alkoholen befinden sich im Bereich 1, mit Ausnahme der beiden Endpunkte (reines Wasser, reiner Alkohol), die im Bereich 3 liegen. Binäre Mischungen aus Wasser und Toluol beinhalten alle drei Bereiche, da es hier sowohl mischbare als auch nicht mischbare Verhältnisse der beiden Komponenten gibt.

### 3.3.1. Bindung von Wasser an das Enzym

Die Bindung von Wasser an CALB wurde zunächst in reinem Wasser untersucht. Da in diesen Simulationen kein inertes Trägergas zur Verfügung stand, wie dies in der Gasphase der Fall ist, war das Enzym auch an hydrophoben Aminosäuren mit Wasser bedeckt, an denen das Lösungsmittel normalerweise nicht binden würde. Die Simulationen des Enzyms in den Reinstoffen wurden verwendet, um zu ermitteln, wie viele Moleküle maximal an das Enzym binden können.

Die Abbildung der Anzahl der Moleküle über den Abstand zum Protein (dN/dr-Plot) gab Ausschluss über die Bindung der Moleküle an das Protein. Die beobachteten zwei Maxima sowie deren Lage und Intensität waren in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten [197-199]. Die molekulare Ursache für die beiden, klar getrennten Maxima wurde bereits beschrieben [199]: Der erste Peak wird durch die Bindung von Wassermolekülen an polare Atome (Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel) auf der Proteinoberfläche verursacht, während der zweite Peak durch Wassermoleküle in der Nähe von unpolaren Atomen (Kohlenstoff) stammt.

In binären Systemen aus Wasser und Methanol bzw. Ethanol fiel auf, dass der Anteil der Proteinoberfläche, der mit Wasser bedeckt war, im Wesentlichen von der Wasseraktivität abhing und erwartungsgemäß mit zunehmender Wasseraktivität zunahm. Allerdings erfolgte die Zunahme nicht linear über die Wasseraktivität, wie dies zu erwarten wäre, sondern beschrieb einen konvexen Verlauf. Dies ist insofern erstaunlich, da es sich bei CALB um ein wasserlösliches Enzym handelt. Allerdings ist CALB auch an Grenzflächen aktiv und verfügt deshalb über zahlreiche hydrophobe Aminosäuren auf der Oberfläche.

Eine weitere Beobachtung war, dass bei einer Wasseraktivität von 1 das gesamte Protein mit Wasser bedeckt war. Die Anzahl der proteingebundenen Wassermoleküle war identisch mit den Simulationen von CALB in reinem Wasser. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Wasser und Methanol bzw. Ethanol in jedem Verhältnis mischbar sind, auch wenn die Mischungen, wie bereits gezeigt, nicht ideal sind. In Ethanol/Wasser-Mischungen war bei gleichen Wasseraktivitäten durchschnittlich mehr Wasser an das Protein gebunden als in Methanol/Wasser-Mischungen. Dies ist unter anderem auf die bereits erwähnte Nicht-Idealität der Mischungen zurückzuführen: Bei gleichen Wasseraktivitäten ist die Aktivität von Methanol in den jeweiligen binären Mischungen geringfügig höher als die Aktivität von Ethanol.

Die Bindung von Wasser an die Bindetasche folgte in binären Wasser/Alkohol-Mischungen dem gleichen Trend. Allerdings fiel hier auf, dass die Streuung der Werte deutlich größer war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Bindetasche aus deutlich weniger Aminosäuren bestand als die gesamte Proteinoberfläche.

In ternären Mischungen aus Wasser, Alkohol und Toluol war die Situation etwas komplexer: Die Systeme konnten wie oben bereits erwähnt in drei Gruppen unterteilt werden. In den mischbaren Systemen war die Wasseraktivität durchgehend unter 1, während sie auf einer Linie genau 1 betrug und im Bereich der nicht-mischbaren Systeme über 1 lag.

Im Bereich der mischbaren Systeme gab es ebenfalls Unterschiede: Während in Systemen mit geringem Alkoholgehalt eine Wasseraktivität von 1 bereits bei einem geringen Stoffmengenanteil von Wasser erreicht wurde, wurde in Systemen mit mittlerem Alkoholgehalt (35 Prozent (vol/vol) Methanol, 50 Prozent (vol/vol) Ethanol) eine Wasseraktivität von 1 bei einem Stoffmengenanteil von Wasser von 0,4 bis 0,5 erreicht. Bei hohen Alkoholkonzentrationen (über 50 Prozent Methanol und 65 Prozent Ethanol) wurde selbst bei hohen Stoffmengenanteilen von Wasser keine Wasseraktivität von 1 erreicht, da die maximal erreichbare Wasseraktivität bei hohen Alkoholkonzentrationen bei 0,75 (bei 50 Prozent (vol/vol) Methanol) und 0,85 (bei 65 Prozent (vol/vol) Ethanol) lag.

Beim Auftrag der proteingebundenen Wassermoleküle über der Wasseraktivität muss zusätzlich der Anteil des Alkohols in der Mischung berücksichtigt werden: Dabei zeigt sich, dass in ternären Mischungen aus Wasser, Alkohol und Toluol bei niedrigen Alkoholkonzentrationen 15 bis 20 Prozent des Proteins bei einer Wasseraktivität von 1 mit Wasser bedeckt sind, während bei mittleren Alkoholkonzentrationen 25 bis 30 Prozent des Proteins mit Wasser bedeckt sind (ebenfalls bei einer Wasseraktivität von 1). In Mischungen mit hoher Alkoholkonzentration sind bereits bei einer Wasseraktivität von 0,6 20 Prozent des Proteins mit Wasser bedeckt. Höhere Wasseraktivitäten sind für diese Mischungen mit hohem Alkoholgehalt nicht realisierbar.

Bei sehr geringen Wasseraktivitäten hängt die Anzahl der an CALB gebundenen Wassermolekülen linear von der Wasseraktivität ab, wobei nur ca. 10 Wassermoleküle bei annähernd trockenen Bedingungen an das Protein gebunden sind. Dies steht in Widerspruch zu vorherigen Simulationen in der Gasphase, bei denen 50 bis 60 Wassermoleküle unter sehr niedrigen Wasseraktivitäten an CALB gebunden waren [114].



### 3.3.2. Bindung von Methanol und Ethanol an CALB

Obwohl Methanol und Ethanol in Toluol löslich sind, unterscheiden sich die  $\log P$ -Werte beachtlich (-0,82, -0,24 und 2,73). Daraus folgt, dass es sich bei den Mischungen aus Methanol bzw. Ethanol und Toluol um nicht-ideale Mischungen handelt: Dies trifft vor allem für die thermodynamische Aktivität von Methanol bzw. Ethanol in diesen Mischungen zu: Bei niedrigen Alkoholkonzentrationen hängt die Alkoholaktivität stark von der Konzentration des jeweiligen Alkohols ab. So wird bereits eine Methanolaktivität von 0,5 bei einem Stoffmengenanteil von 0,08 erreicht. Bei äquimolaren Mischungen ist die Methanolaktivität annähernd unabhängig von der Konzentration, während sie bei hohen Methanolkonzentrationen minimal zunimmt. Dieser Trend wird auch bei Ethanol beobachtet.

Die Bindung von Methanol und Ethanol an das Enzym hängt weitestgehend von der Alkoholaktivität ab. Da Methanol und Ethanol in Toluol löslich sind, ist bei einer Alkoholaktivität von 1 das gesamte Enzym mit dem jeweiligen Alkohol belegt.

Allerdings gibt es Unterschiede im Bindungsverhalten der beiden Alkohole: Die Bindung von Methanol und Ethanol in Abhängigkeit der Alkoholkonzentration an das Enzym beschreibt in ternären Systemen einen ähnlichen Verlauf: Bei niedrigen Alkoholaktivitäten beschreibt die Kurve einen konvexen Verlauf, bei höheren Alkoholaktivitäten steigt sie linear an.

In binären Mischungen unterscheidet sich das Bindungsverhalten der beiden Alkohole deutlich gegenüber den ternären Mischungen: Die Bindung von Methanol und Ethanol an das Enzym folgt einer konkaven Kurve.

Diese Beobachtungen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich Methanol und Ethanol im Vergleich zu Toluol relativ ähnlich sind ( $\log P$  von -0,82, -0,24 und 2,73), während im Vergleich zu Wasser die Unterschiede deutlicher sind.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Simulation von organischen Lösungsmitteln**

Für die Untersuchung der thermodynamischen, strukturellen und dynamischen Eigenschaften der organischen Lösungsmitteln wurde eine Vielzahl an molekulardynamischen Simulationen durchgeführt. Dazu wurde die GROMACS-Simulationsumgebung [35] und das OPLS *all-atom*- bzw. *united-atom*-Kraftfeld [32,36] verwendet. Die Lösungsmittel wurden so ausgewählt, dass sie ein breites Spektrum abdeckten, das in der organischen Chemie und der Biokatalyse relevant ist.

#### **4.1.1. Aufsetzen der Lösungsmittelsysteme**

Die Strukturen der Lösungsmittel wurden mittels des PRODRG-Servers [37] erstellt. Die OPLS *all-atom*-Parameter wurden verwendet, um die Topologie-Dateien manuell zu erstellen. Da der simulierte Selbstdiffusionskoeffizient der meisten Lösungsmittel beachtlich vom experimentellen Wert abwich, wurden Modelle mit modifizierten Partialladungen entwickelt.

Zum Aufsetzen des molekularen Systems wurde ein einzelnes Molekül des entsprechenden Lösungsmittels in eine kleine kubische Box gepackt, in der es einen minimalen Abstand von 0,1 nm zur Systemgrenze hatte. Anschließend wurden ausgehend von diesen kleinen Boxen die Simulationssysteme erzeugt. Jedes Simulationssystem hatte dabei mindestens 75.000 Atome. Die Anzahl der Moleküle und die Größe des Simulationssystems hingen dabei vom jeweiligen Lösungsmittel ab.

### 4.1.2. Minimierung und Equilibrierung

Zur Minimierung der Systeme wurde der *steepest decent* und der *conjugate gradient* Algorithmus mit je 5.000 Schritten verwendet. Danach wurden für jedes System fünf molekulardynamische Simulationen mit unterschiedlichen Startbedingungen durchgeführt. Die Anfangstemperatur betrug 10 K und wurde innerhalb von 100 ps auf 200 K erhöht. Danach wurde die Temperatur über einen Zeitraum von 100 ps konstant gehalten. Abschließend wurde die Systemtemperatur innerhalb von 450 ps auf 293 K erhöht. In einer weiteren Simulation von 1 ns Dauer wurde das System auf die Endtemperatur, die im Bereich von 288 bis 338 K lag, gebracht. Die Temperatur wurde über die Kopplung mit einem Wärmebad konstant gehalten. Der Druck wurde auf 1 bar eingestellt (NPT-Modell). Der Zeitschritt der Simulation betrug 1 fs.

### 4.1.3. Simulation und Auswertung

Nach der Equilibrierung wurden die Simulationen für mindestens 50 ns bei Temperaturen zwischen 288 und 338 K und bei einem Bar Druck fortgesetzt. Während der Simulation wurden die Konformere jede Picosekunde in die Trajektorie geschrieben. Die Dichte und die radiale Dichteverteilung wurden berechnet, indem über die letzten 5 ns der Simulation gemittelt wurde. Für die Berechnung der Permittivität wurde über die letzten 30 ns der Simulation gemittelt. Anschließend wurde die Simulation um eine weitere Nanosekunde verlängert und dabei jedes Konformer zu jedem Zeitschritt gespeichert. Aus diesen Daten wurde der Selbstdiffusionskoeffizient aus dem linearen Teil des  $t\text{-}x^2$ -Plots berechnet. Dazu wurde der Selbstdiffusionskoeffizient für jedes Molekül berechnet und über alle Moleküle des Systems gemittelt.

Die Dichte, die Permittivität, die radiale Dichteverteilung und der Selbstdiffusionskoeffizient wurden unter Verwendung der Programme `g_energy`, `g_dipoles`, `g_rdf` und `g_msd` berechnet, die im GROMACS-Programmpaket [200] enthalten waren. Der thermische Ausdehnungskoeffizient wurde berechnet, indem die Dichten bei unterschiedlichen Temperaturen an eine Gerade gefittet wurden. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  wurde berechnet, indem die Temperaturabhängigkeit des Selbstdiffusionskoeffizienten gefittet wurde [182].

## 4.2. Modellierung von CALB in organischen Lösungsmitteln

### 4.2.1. Berechnung der thermodynamischen Aktivitäten

Mischungen aus Methanol und Vinylacetat bzw. Ethanol und Vinylacetat in Toluol wurden untersucht. Die Konzentration von Vinylacetat  $c_{VA}$  war konstant und betrug in allen Mischungen 15,2 Prozent (vol/vol). Die Konzentrationen von Methanol  $c_{MeOH}$  und Ethanol  $c_{EtOH}$  wurden zwischen 0,4 und 60 Prozent (vol/vol) variiert. Die Molfraktionen  $\chi_{MeOH}$ ,  $\chi_{EtOH}$ ,  $\chi_{VA}$ ,  $\chi_{Tol}$  und  $\chi_{Wat}$  von Methanol, Ethanol, Vinylacetat, Toluol und Wasser wurden folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned}\chi_{MeOH} &= n_{MeOH} / (n_{MeOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat}) \\ \chi_{VA} &= n_{VA} / (n_{MeOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat}) \\ \chi_{Tol} &= n_{Tol} / (n_{MeOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat}) \\ \chi_{Wat} &= n_{Wat} / (n_{MeOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat})\end{aligned}\quad (\text{Glg. 1a})$$

für Systeme, die Methanol enthielten, sowie

$$\begin{aligned}\chi_{EtOH} &= n_{EtOH} / (n_{EtOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat}) \\ \chi_{VA} &= n_{VA} / (n_{EtOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat}) \\ \chi_{Tol} &= n_{Tol} / (n_{EtOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat}) \\ \chi_{Wat} &= n_{Wat} / (n_{EtOH} + n_{VA} + n_{Tol} + n_{Wat})\end{aligned}\quad (\text{Glg. 1b})$$

für Systeme mit Ethanol.

Das UNIFAC-Modell [186] wurde verwendet, um für jeden Stoffmengenanteil  $\chi_{MeOH}$ ,  $\chi_{EtOH}$ ,  $\chi_{VA}$ ,  $\chi_{Tol}$  und  $\chi_{Wat}$  den entsprechenden thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten  $\gamma_{MeOH}$ ,  $\gamma_{EtOH}$ ,  $\gamma_{VA}$ ,  $\gamma_{Tol}$  und  $\gamma_{Wat}$  zu berechnen. Zusätzlich wurde der Volumenanteil und der Massenanteil jeder Komponente berechnet. Die thermodynamischen Aktivitäten wurden folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned}a_{MeOH} &= \chi_{MeOH} \cdot \gamma_{MeOH} \\ a_{EtOH} &= \chi_{EtOH} \cdot \gamma_{EtOH} \\ a_{VA} &= \chi_{VA} \cdot \gamma_{VA} \\ a_{Wat} &= \chi_{Wat} \cdot \gamma_{Wat} \\ a_{Tol} &= \chi_{Tol} \cdot \gamma_{Tol}\end{aligned}\quad (\text{Glg. 2})$$

#### 4.2.2. Modellierung der Enzymkinetik

Die Anfangsgeschwindigkeit der Alkoholysereaktion von Vinylacetat in Toluol als Lösungsmittel, die von CALB katalysiert wurde, wurde untersucht. Dazu wurde ein Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus mit kompetitiver Inhibition durch die Substrate Methanol bzw. Ethanol angenommen (Abb. 9). Um die Löslichkeit von Methanol und Ethanol zu berücksichtigen wurden die thermodynamischen Aktivitäten von Methanol, Ethanol und Vinylacetat ( $a_{\text{MeOH}}$ ,  $a_{\text{EtOH}}$  und  $a_{\text{VA}}$ ) anstelle der jeweiligen Konzentrationen verwendet [135]. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde für Systeme mit Methanol folgendermaßen berechnet:

$$v = v_{\text{max,MeOH}} \cdot a_{\text{MeOH}} \cdot a_{\text{VA}} / (K_{\text{M,VA}} \cdot a_{\text{MeOH}} + K_{\text{M,MeOH}} \cdot a_{\text{VA}} + a_{\text{MeOH}} \cdot a_{\text{VA}} + K_{\text{M,VA}} \cdot a_{\text{MeOH}}^2 / K_{\text{i,MeOH}})$$

(Glg. 3a)

sowie für Systeme mit Ethanol:

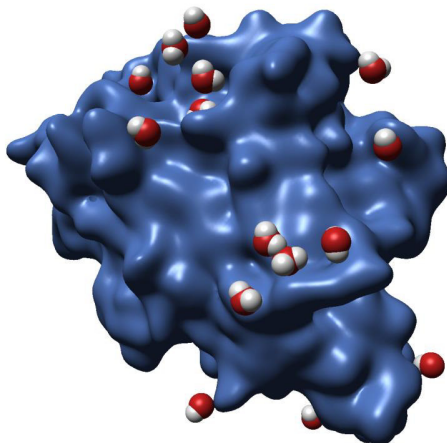
$$v = v_{\text{max,EtOH}} \cdot a_{\text{EtOH}} \cdot a_{\text{VA}} / (K_{\text{M,VA}} \cdot a_{\text{EtOH}} + K_{\text{M,EtOH}} \cdot a_{\text{VA}} + a_{\text{EtOH}} \cdot a_{\text{VA}} + K_{\text{M,VA}} \cdot a_{\text{EtOH}}^2 / K_{\text{i,EtOH}})$$

(Glg. 3b)

Die vier Parameter in dieser Gleichung sind die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$ , die Michaelis-Konstanten  $K_{\text{M,VA}}$ ,  $K_{\text{M,MeOH}}$  und  $K_{\text{M,EtOH}}$  von Vinylacetat, Methanol und Ethanol und die Inhibierungs-Konstanten  $K_{\text{i,MeOH}}$  und  $K_{\text{i,EtOH}}$  von Methanol und Ethanol. Das Modell wurde an experimentelle Daten gefittet, indem die mittlere quadratische Abweichung zwischen experimentellen und modellierten Daten minimiert wurde.

### 4.2.3. Molekulardynamische Simulation

Die Simulationssysteme enthielten die N74S Mutante der *Candida antarctica* Lipase B (CALB), einer nicht-glykosylierten Form von CALB [201]. Das Enzym war neutral, weswegen keine Gegenionen hinzugefügt werden mussten.



**Abb. 42: Oberflächendarstellung von CALB mit gebundenen Kristallwassermolekülen, erstellt von Dipl. Inf. Michael Krone mit MegaMol.**

Das Protein wurde in binären Mischungen aus Methanol und Toluol bzw. Ethanol und Toluol gelöst, wobei die Alkoholkonzentrationen zwischen 0 Prozent (vol/vol) und 100 Prozent (vol/vol) variierten. Ausgehend von jeder Alkohol-Toluol-Mischung wurden 16 neue Systeme erstellt, indem eine unterschiedliche Anzahl an Wassermolekülen (10 bis 1400) hinzugefügt wurde. Anschließend wurden molekulardynamische Simulationen dieser Systeme durchgeführt. Das SPC/E-Wassermodell wurde verwendet [65]. Für Toluol und Vinylacetat wurde das OPLS *all-atom*-Modell verwendet [49], während für Methanol und Ethanol ein modifiziertes OPLS *all-atom*-Kraftfeld verwendet wurde [202].

Jede Simulation wurde drei Mal durchgeführt, wobei unterschiedliche Anfangsbedingungen, die sich in der Platzierung der Wassermoleküle und den Startgeschwindigkeiten unterschieden, verwendet wurden. Alle Simulationen begannen mit einer Energieminimierung, bei der die *steepest decent* und *conjugate gradient* Algorithmen verwendet wurden. Danach wurde eine

Equilibrierung durchgeführt, indem das System innerhalb einer Nanosekunde von 10 K auf 298 K hochgeheizt wurde. Anschließend wurde eine molekulardynamische Simulation über 50 ns für jedes System durchgeführt.

Nach der Simulation wurden die Daten ausgewertet und die Flexibilität (RMSF) und die Wurzel aus der mittleren quadratischen Verschiebung (RMSD) berechnet. Dazu wurden die Programme `g_rmsf` und `g_rms` verwendet, die im GROMACS-Paket [200] enthalten waren. Die Anzahl der proteingebundenen Wasser-, Methanol-, Ethanol- und Toluolmoleküle wurde mit “Visual Molecular Dynamics” (VMD) [203] ausgezählt.

Für die Analyse wurden die letzten 10 ns einer 50 ns Simulation verwendet. Eine lange Simulationszeit wurde verwendet, um sicherzustellen, dass das System ausreichend equilibriert war. Um sicherzustellen, dass die langsame Bewegung der Wassermoleküle berücksichtigt wurde, wurde über 10 ns gemittelt. Jede Simulation wurde drei Mal mit unterschiedlichen Startbedingungen wiederholt.

Die Bindung der Alkoholmoleküle an die Alkoholbindestelle (Asp134, Thr138 und Gln157) und die Acetatbindestelle (Gly39, Thr40, Ser105, Gln106, Ile189, Val190, His224, Leu278, Ala281 und Ala282) von CALB wurde untersucht, indem die Anzahl der Alkoholmoleküle innerhalb einer Entfernung von 0,3 nm von den jeweiligen Aminosäuren gemittelt wurde. Die Anzahl der gebundenen Methanolmoleküle  $N_{MeOH}$  bzw. Ethanolmoleküle  $N_{EtOH}$  wurde als Funktion der Methanolaktivität  $a_{MeOH}$  bzw. Ethanolaktivität  $a_{EtOH}$  an folgende Gleichung gefittet:

$$N_{MeOH} = N_{max,MeOH} \cdot a_{MeOH} / (K_{MeOH} + a_{MeOH}) \quad (\text{Glg. 4a})$$

$$N_{EtOH} = N_{max,EtOH} \cdot a_{EtOH} / (K_{EtOH} + a_{EtOH}) \quad (\text{Glg. 4b})$$

woraus sich zwei Parameter ergaben: Die Anzahl der Bindungsstellen  $N_{max}$  und die Bindungskonstante  $K_{MeOH}$  bzw.  $K_{EtOH}$ .

Für die Berechnung der Wasser-, Methanol- und Ethanolaktivität wurde eine Bulkphase definiert. Alle Wasser-, Methanol-, Ethanol- und Toluolmoleküle, die weiter als 0,3 nm von der Proteinoberfläche entfernt waren, wurden dieser Bulkphase zugeordnet. Die Anzahl der Wasser-, Methanol- und Ethanolmoleküle in dieser Phase wurde für jede Simulation berechnet.

Die Molfraktionen von Wasser und Methanol wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\chi_{\text{Wat}} = N_{\text{Wat}}^{\text{bulk}} / (N_{\text{Wat}}^{\text{bulk}} + N_{\text{MeOH}}^{\text{bulk}} + N_{\text{Tol}}^{\text{bulk}}) \quad (\text{Glg. 5})$$

$$\chi_{\text{MeOH}} = N_{\text{MeOH}}^{\text{bulk}} / (N_{\text{Wat}}^{\text{bulk}} + N_{\text{MeOH}}^{\text{bulk}} + N_{\text{Tol}}^{\text{bulk}}) \quad (\text{Glg. 6})$$

Der Stoffmengenanteil der anderen Komponenten wurde entsprechend berechnet. Ausgehend vom Stoffmengenanteil  $\chi_{\text{MeOH}}$ ,  $\chi_{\text{EtOH}}$  und  $\chi_{\text{Wat}}$ , wurden die thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten  $\gamma_{\text{MeOH}}$ ,  $\gamma_{\text{EtOH}}$  und  $\gamma_{\text{Wat}}$  mithilfe des UNIFAC-Modells [186] berechnet. Die thermodynamischen Aktivitäten von Methanol, Ethanol und Wasser ( $a_{\text{MeOH}}$ ,  $a_{\text{EtOH}}$  und  $a_{\text{w}}$ ) wurden nach Gleichung 2 berechnet.



### **4.3. Experimentelle Methoden**

Sämtliche Experimente wurden am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano von Herrn Dr. Francesco Sasso unter der Leitung von Frau Prof. Marina Lotti durchgeführt.

#### **4.3.1. Materialien**

Die rekombinante, nicht-glykosylierte *Candida antarctica* Lipase B (CALB) wurde, wie bereits beschrieben [204], aufbereitet und gereinigt. Sie wurde freundlicherweise von Kai Lögering und Reiner Luttmann, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, zur Verfügung gestellt. Toluol, Vinylacetat, Methanol, Ethanol Lithiumchlorid, Lithiumbromid und Cäsiumfluorid wurden von Sigma-Aldrich gekauft. Alle anderen Reagenzien und Verbindungen waren von analytischer Reinheit. Die Proteinkonzentration von CALB wurde mit der Bradford-Methode (Bio-Rad Protein Assay) bestimmt.

### 4.3.2. Alkoholyse und Analyse mittels Gaschromatographie

Die katalytische Aktivität der rekombinanten CALB in organischen Lösungsmitteln wurde von Herrn Dr. Francesco Sasso am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano bestimmt, indem die Anfangsgeschwindigkeit ( $v_0$ ) der Bildung von Methyl-, bzw. Ethylacetat aus der Alkoholyse von Vinylacetat durch Methanol bzw. Ethanol in Toluol gemessen wurde. Dazu wurde zunächst eine Reaktionsmischung aus Vinylacetat, Methanol bzw. Ethanol und Toluol mit einem Endvolumen von 1 ml hergestellt. Durch Zugabe von 20  $\mu\text{g}$  Lipase wurde die Reaktion gestartet.

Aliquots mit einem Volumen von 67  $\mu\text{l}$ , die 20  $\mu\text{g}$  CALB enthielten, welches in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7 gelöst wurde, wurden bei 193 K eingefroren und lyophilisiert. Vor der Reaktion wurden Toluol, Vinylacetat und die Lipase jeweils getrennt und bei der gewünschten Wasseraktivität ( $a_w$ ) für mindestens 24 Stunden bei 298 K in verschlossenen Behältern equilibriert. Für die jeweilige Wasseraktivität wurden gesättigte Lösungen von CsF ( $a_w$  0,02), LiBr ( $a_w$  0,05) or LiCl ( $a_w$  0,09) verwendet. Methanol bzw. Ethanol wurden auf die gewünschte Wasseraktivität gebracht, indem wasserfreiem Methanol bzw. Ethanol ( $\leq$  0,002 Prozent Wasser) die jeweilige Wassermenge zugesetzt wurde [205].

Die Reaktionsmischung wurde bei 298 K in einem horizontalen Schüttler bei 125 Umdrehungen pro Minuten geschüttelt. Drei Minuten nach dem Reaktionsstart wurde die Bildung von Methylacetat gemessen. Dazu wurde ein Gaschromatograph, der mit einer HP-1-Säule (Crosslinked Methyl Silicone Gum, 25m, 0,32 mm ID, Agilent Technologies Milan) und einem Flame Ionization Detector (FID) bestückt war, verwendet. Die Temperatur des Ofens wurde anfangs für drei Minuten auf 308 K gehalten und dann innerhalb von 4,8 Minuten auf 393 K erhöht. Diese Endtemperatur wurde 0,5 Minuten lang gehalten.

Das Verhältnis betrug 40:1 und die Fließgeschwindigkeit durch die Säule 0,7 ml/min. Für die Bestimmung der quantitativen Daten wurden die Maxima ausgewertet und daraus die Umsetzung, die Anfangsgeschwindigkeit und die spezifische Aktivität (U/mg) berechnet. Die Laufzeit von Methanol, Methylacetat und Vinylacetat betrug 3,9, 4,4 und 4,8 Minuten. Da keine Essigsäure nachgewiesen werden konnte (Nachweisgrenze 0,1  $\mu\text{g}$ ), konnte die Bildung der Hydrolyseprodukte vernachlässigt werden.

### **4.3.3. Effekte von Methanol und Ethanol auf die Aktivität von CALB**

Am Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano wurde zudem der Effekt von Methanol und Ethanol auf die Aktivität von CALB von Herrn Dr. Francesco Sasso untersucht. Dazu wurden Reaktionen bei einer konstanten Vinylacetatkonzentration (15,2 Prozent vol/vol) und unterschiedlichen Methanol- und Ethanolkonzentrationen durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vinylacetat variierte dabei von 0,2:1 bis zu 6:1. Toluol wurde der Reaktionsmischung zugefügt, bis ein Endvolumen von 1 ml erreicht war. Den Reagenzien wurden 20 µg Lipase hinzugegeben. Die spezifische Aktivität wurde nach drei Minuten gemessen. Die Reaktionen wurden bei Wasseraktivitäten von 0,02, 0,05 und 0,09 durchgeführt.

Der Effekt von Methanol und Ethanol auf die Enzymkinetik wurde untersucht, indem die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion untersucht wurde. CALB wurde dazu in Mischungen von Methanol bzw. Ethanol und Toluol präinkubiert. Dazu wurden drei Methanol- bzw. Ethanolkonzentrationen und zwei Wasseraktivitäten untersucht. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von Vinylacetat gestartet.

## 5. Anhang

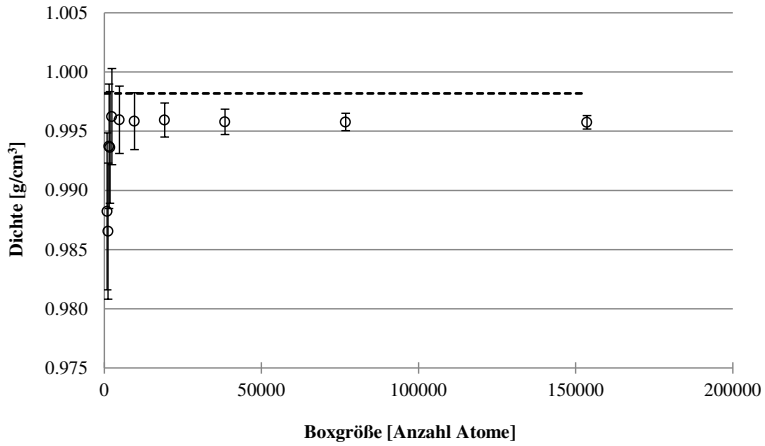


Abb. 43: Simulierte Dichte des SPC/E-Wassermodells bei 298 K bei unterschiedlichen Systemgrößen. Der experimentelle Wert ist als durchgehende Linie eingezeichnet.

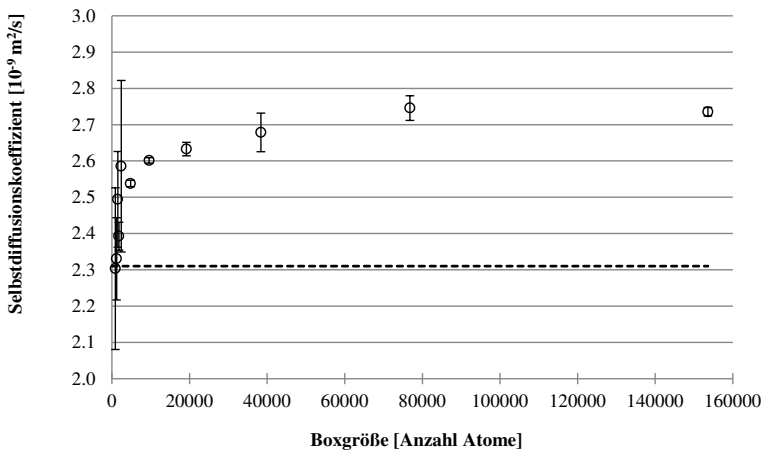
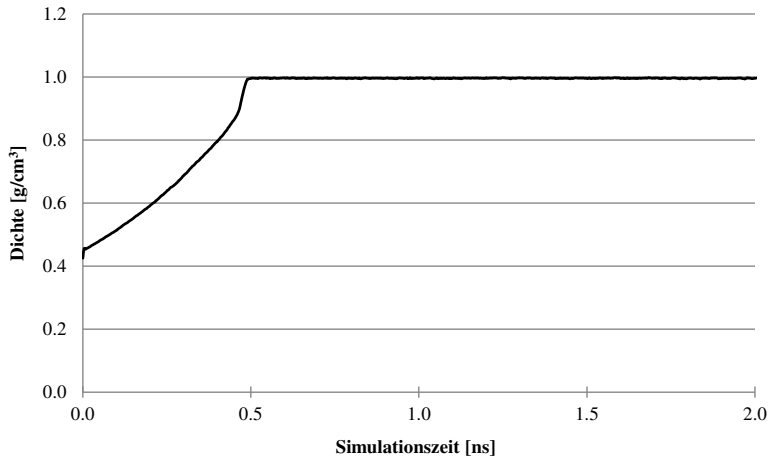
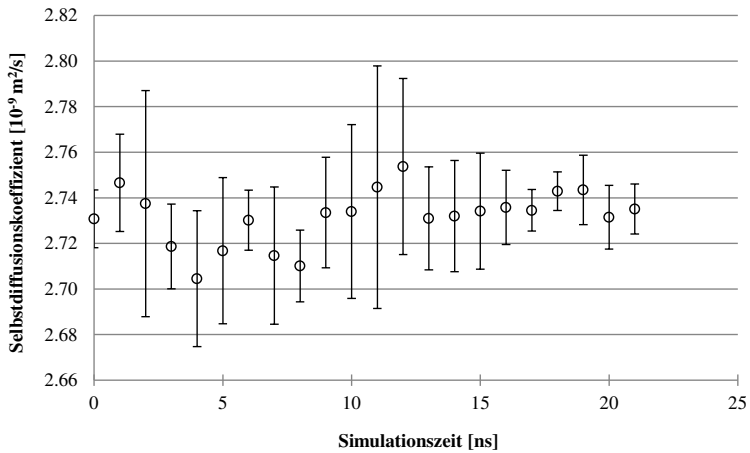


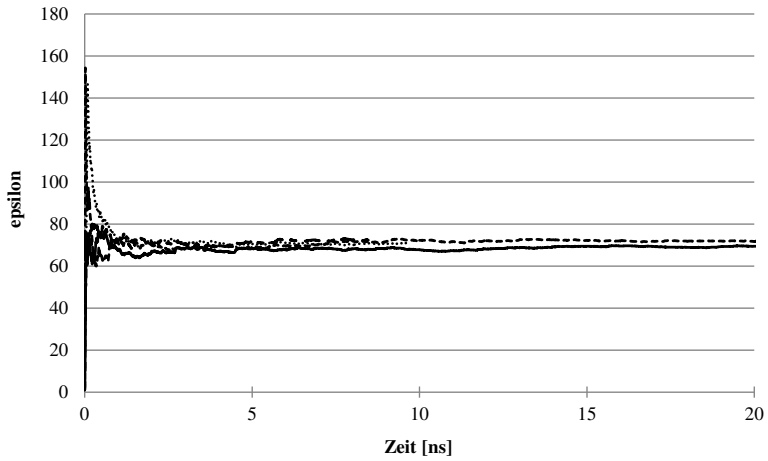
Abb. 44: Simulierter Selbstdiffusionskoeffizient des SPC/E-Wassermodells bei 298 K bei unterschiedlichen Systemgrößen. Der experimentelle Wert ist als durchgehende Linie eingezeichnet.



**Abb. 45: Simulierte Dichte des SPC/E-Wassersmodells bei 298 K in Abhängigkeit von der Simulationszeit. Die endgültige Dichte wird nach 500 ps erreicht.**

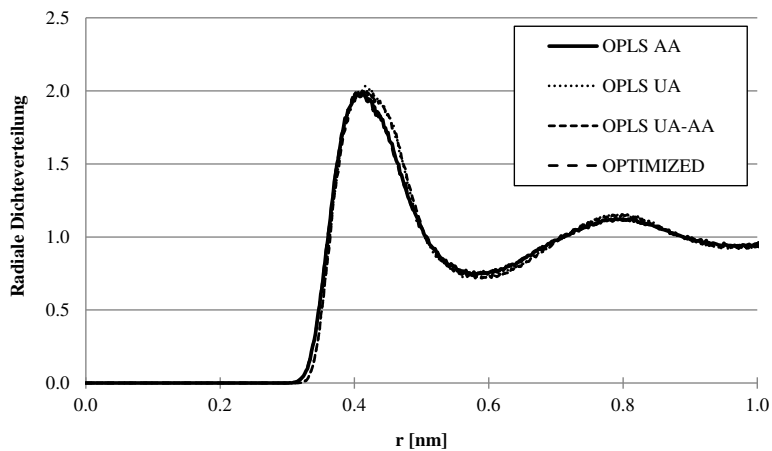


**Abb. 46: Simulierter Selbstdiffusionskoeffizient des SPC/E-Wassersmodells bei 298 K in Abhängigkeit von der Simulationszeit.**

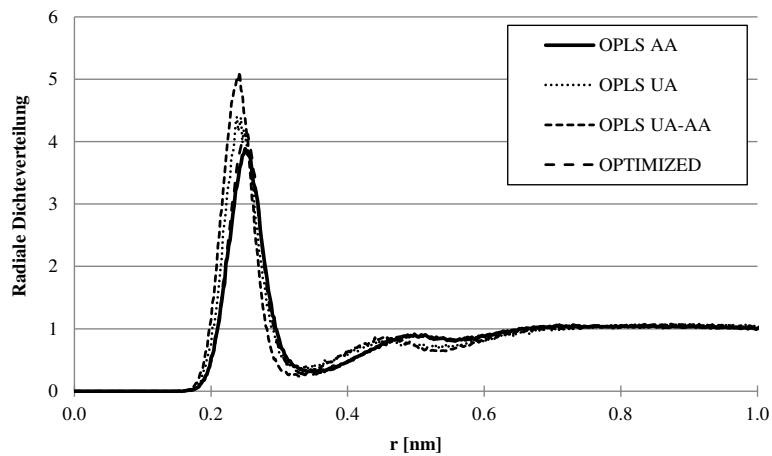


**Abb. 47: Abhängigkeit der Permittivität von der Simulationszeit. Die Permittivität von sieben Simulationen mit unterschiedlichen Startbedingungen wurde aufgetragen.**

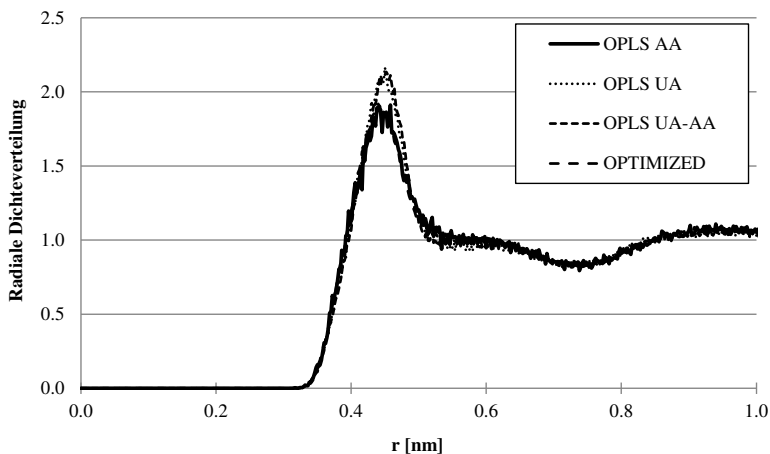
A



B



C



D

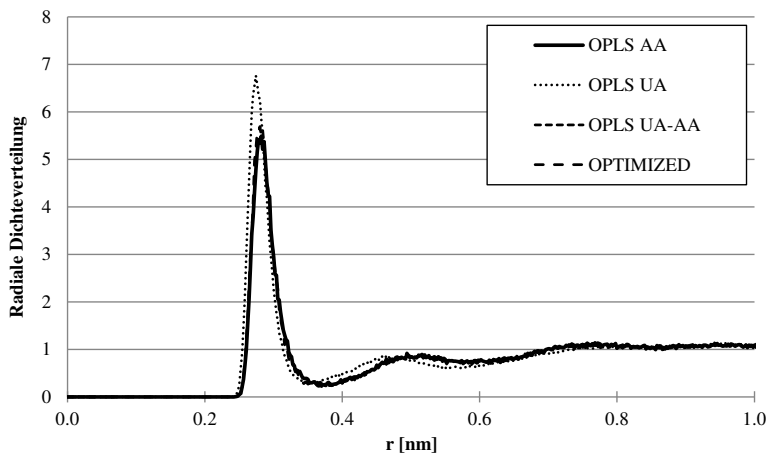
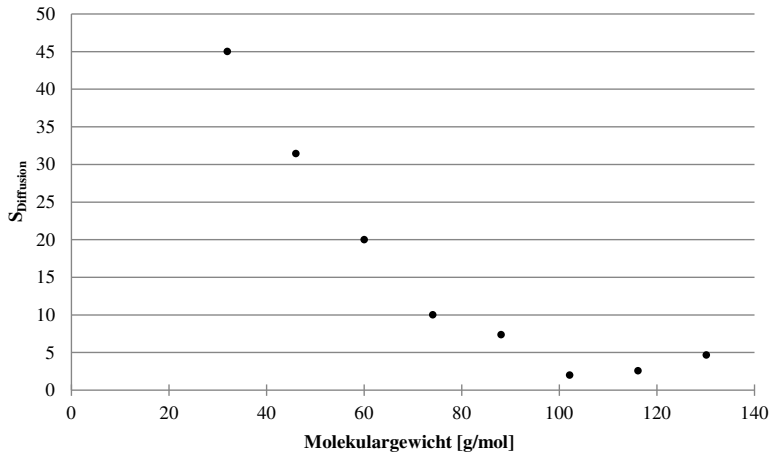


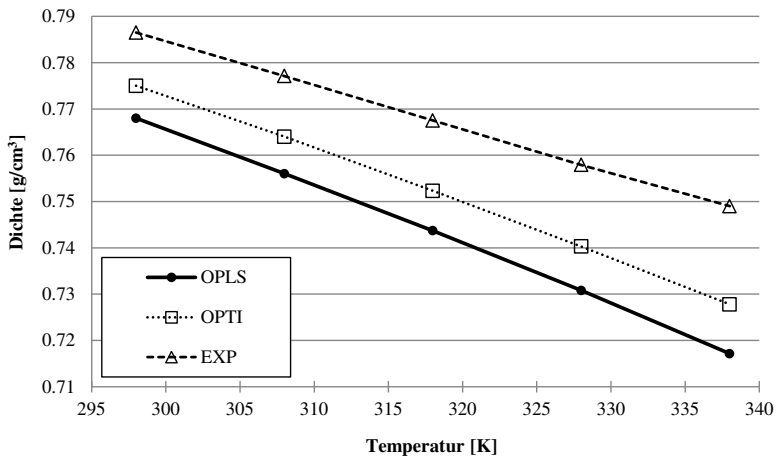
Abb. 48: Radiale Dichteverteilung von Methanol (A), Ethanol (B), 1-Propanol (C) und 1-Butanol (D). Vergleich des OPLS *all-atom*- (durchgezogene Linie), OPLS *united-atom*- (kurze Punkte), optimierten Kraftfeldes (kurze Striche) und des OPLS *united-atom*-Kraftfeldes mit *all-atom* Partialladungen (lange Striche).



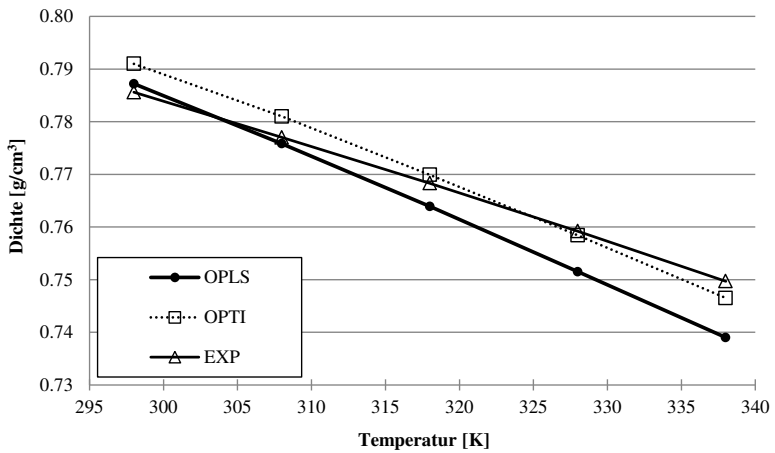


**Abb. 49: Empfindlichkeit der Diffusion auf Änderungen der Partialladung**

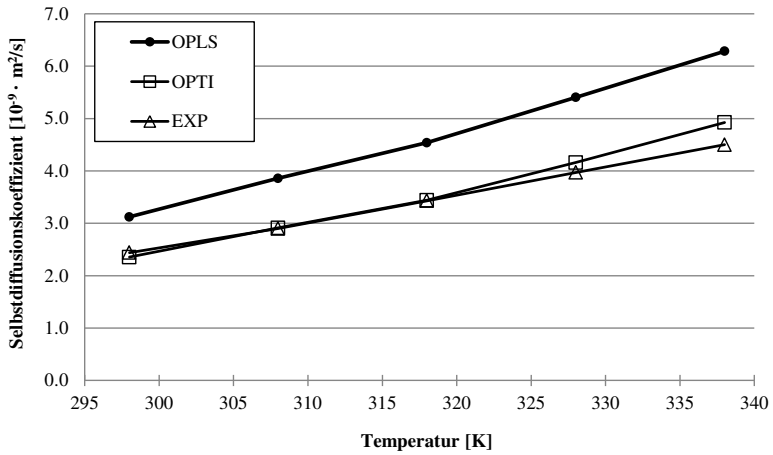
A



B



C



D

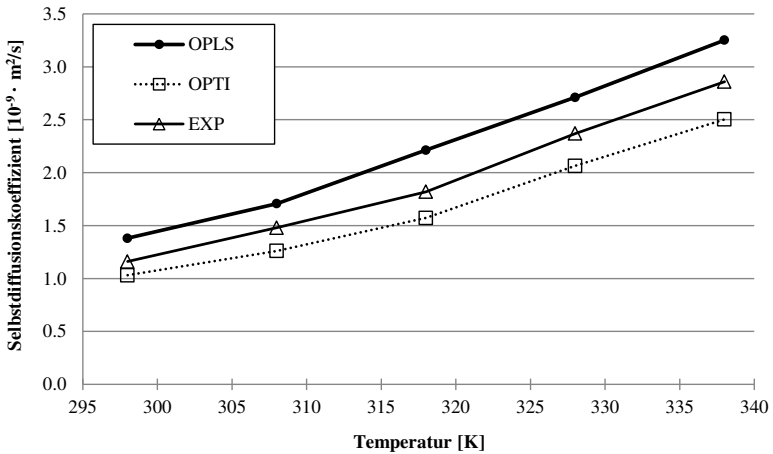


Abb. 50: Dichte und Selbstdiffusionskoeffizient von Methanol (A, C) und Ethanol (B, D) als Funktion der Temperatur. Der experimentelle Wert (Dreieck), das OPLS *all-atom*-Modell (Kreis) und das Modell mit den modifizierten Partialladungen (Quadrat) sind aufgetragen.

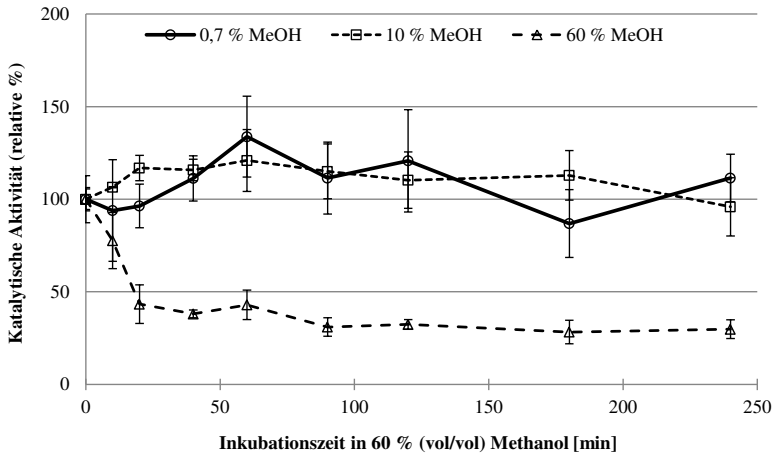


Abb. 51: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von CALB von der Inkubationszeit bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen und einer konstanten Wasseraktivität von 0,02. Gemessen von Francesco Sasso.

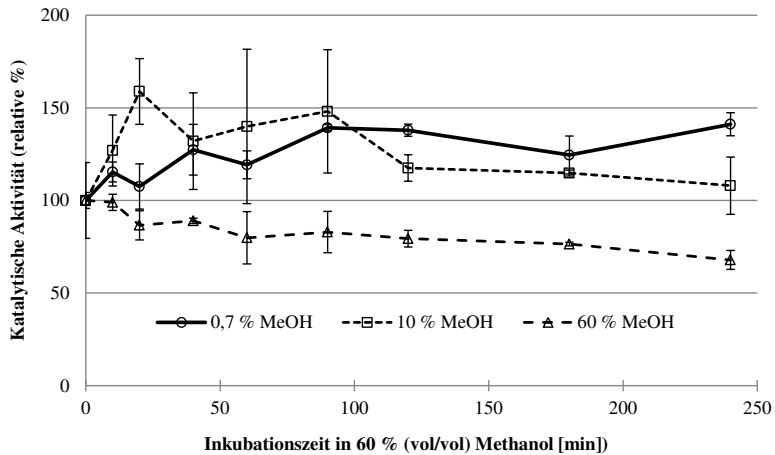


Abb. 52: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von CALB von der Inkubationszeit bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen und einer konstanten Wasseraktivität von 0,09. Gemessen von Francesco Sasso.

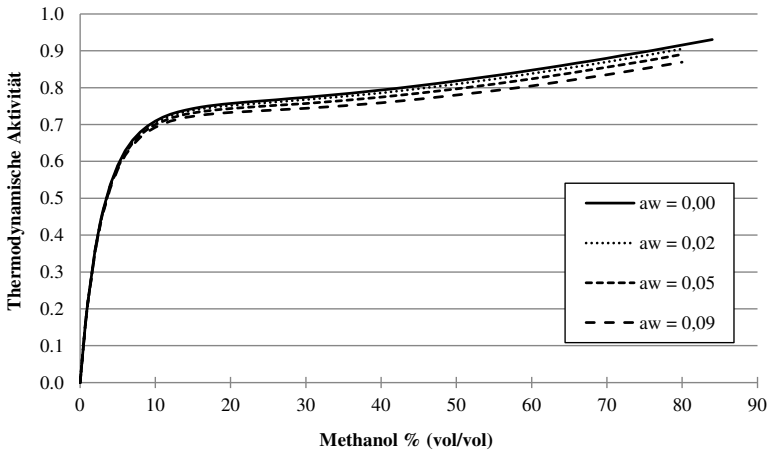


Abb. 53: Thermodynamische Aktivität von Methanol in Abhängigkeit der Methanolkonzentration für unterschiedliche Wasseraktivitäten

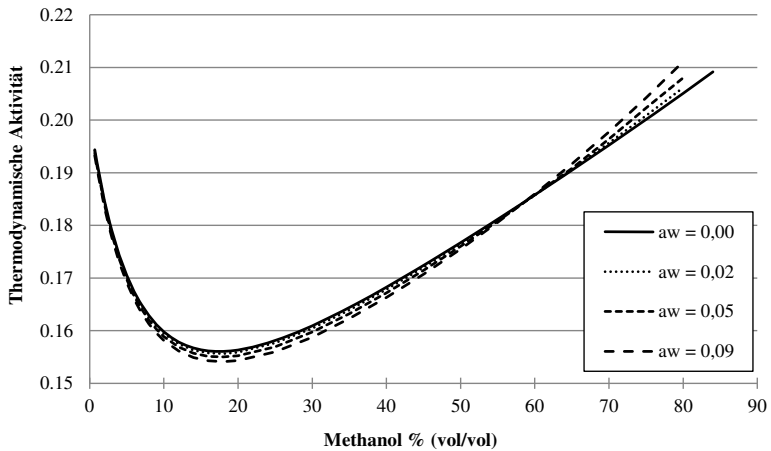
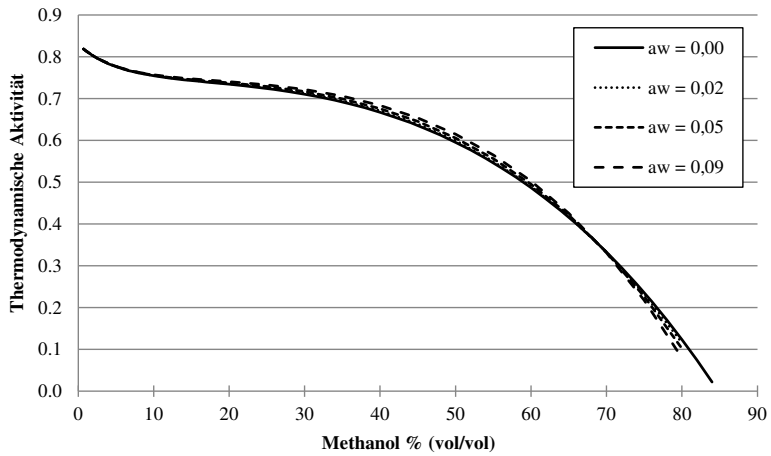


Abb. 54: Thermodynamische Aktivität von Vinylacetat in Abhängigkeit der Methanolkonzentration für unterschiedliche Wasseraktivitäten



**Abb. 55: Thermodynamische Aktivität von Toluol in Abhängigkeit der Methanolkonzentration für unterschiedliche Wasseraktivitäten**

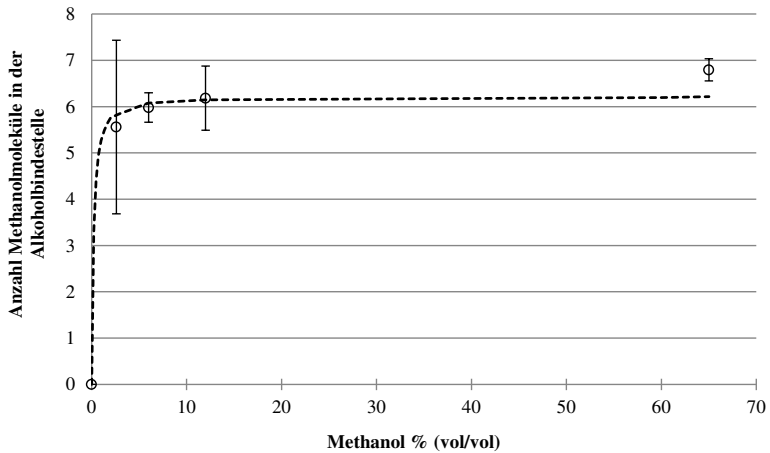


Abb. 56: Anzahl Methanolmoleküle in der Alkoholbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,02. Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

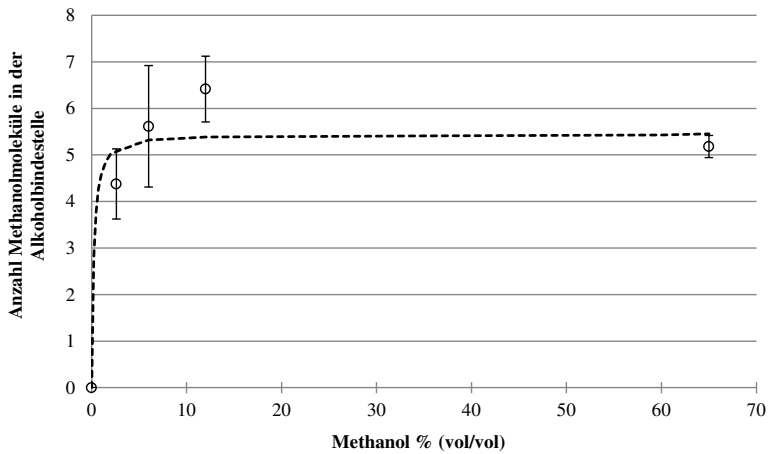


Abb. 57: Anzahl Methanolmoleküle in der Alkoholbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,05. Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

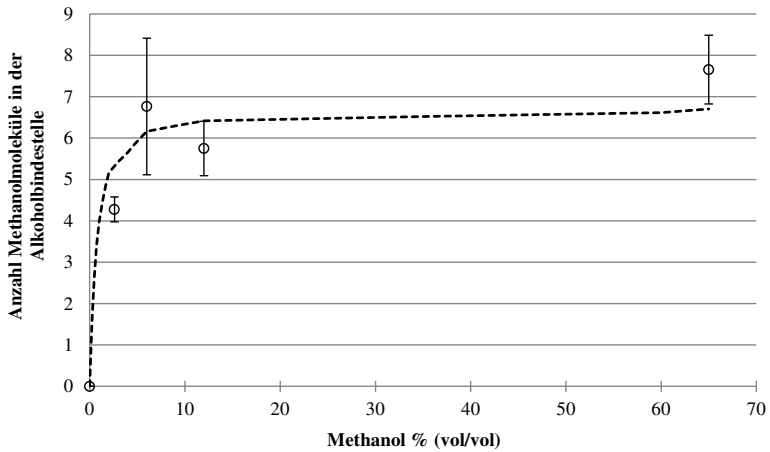


Abb. 58: Anzahl Methanolmoleküle in der Alkoholbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,09. Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

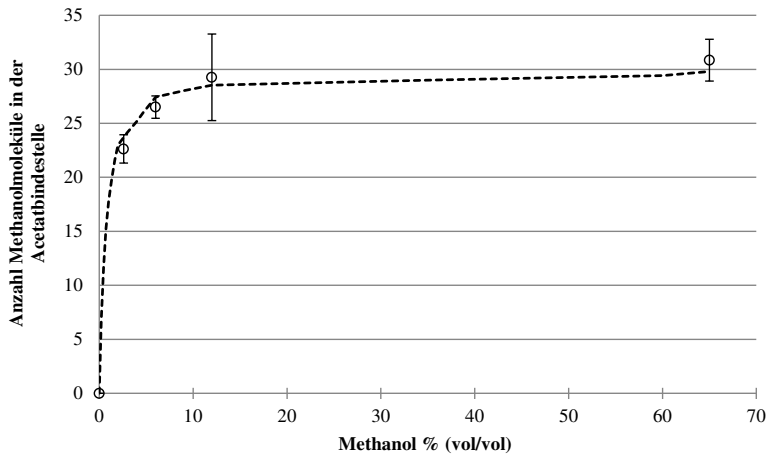


Abb. 59: Anzahl Methanolmoleküle in der Acetatbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,02. Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).



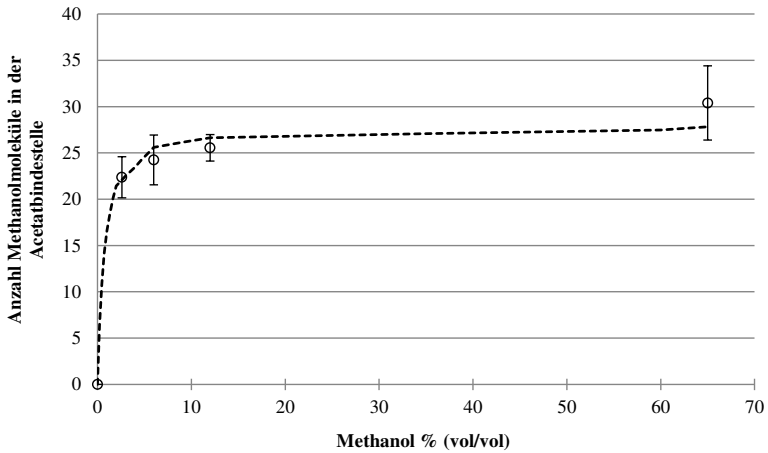


Abb. 60: Anzahl Methanolmoleküle in der Acetatbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,05. Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

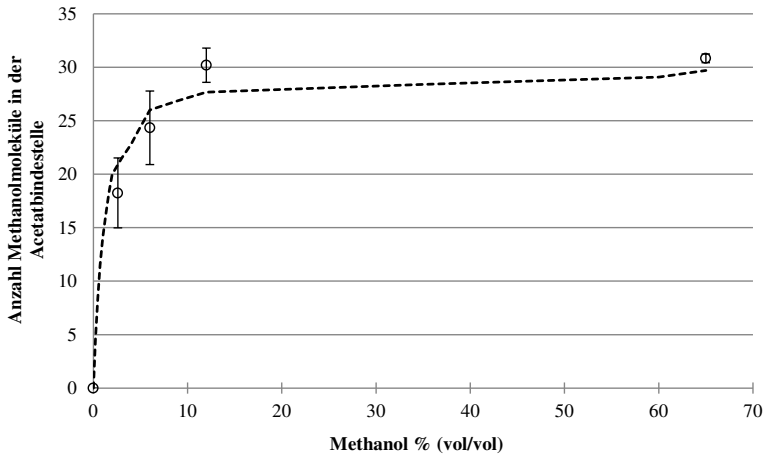
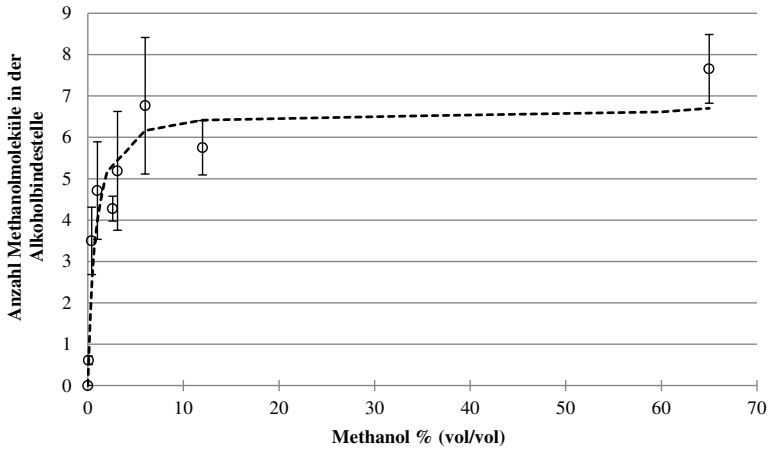


Abb. 61: Anzahl Methanolmoleküle in der Acetatbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,09. Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

A



B

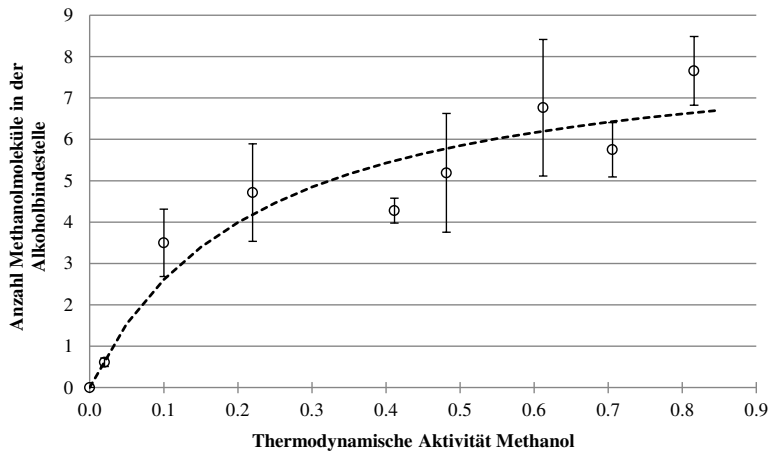
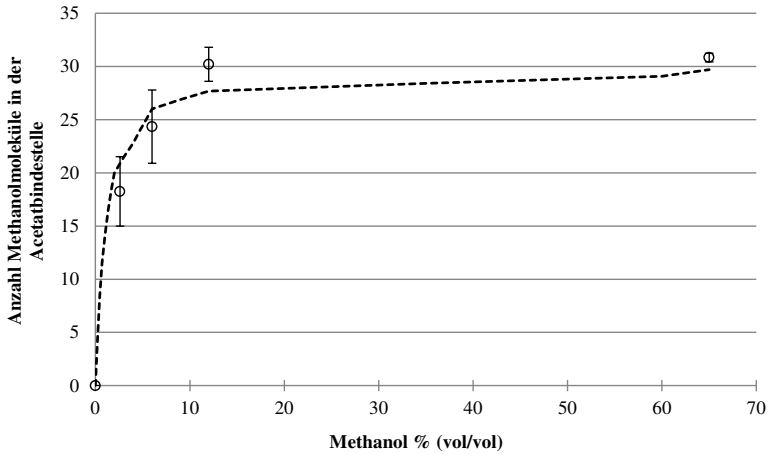


Abb. 62: Anzahl Methanolmoleküle in der Alkoholbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,09 in Abhängigkeit der Methanolkonzentration (A) und der Methanolaktivität (B). Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

A



B

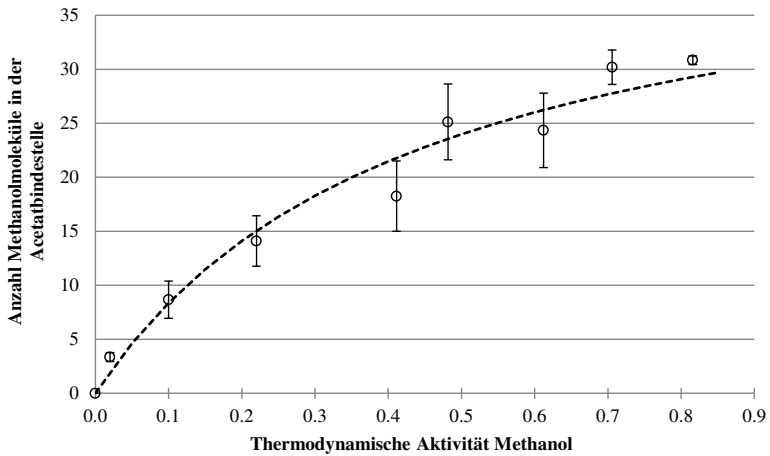
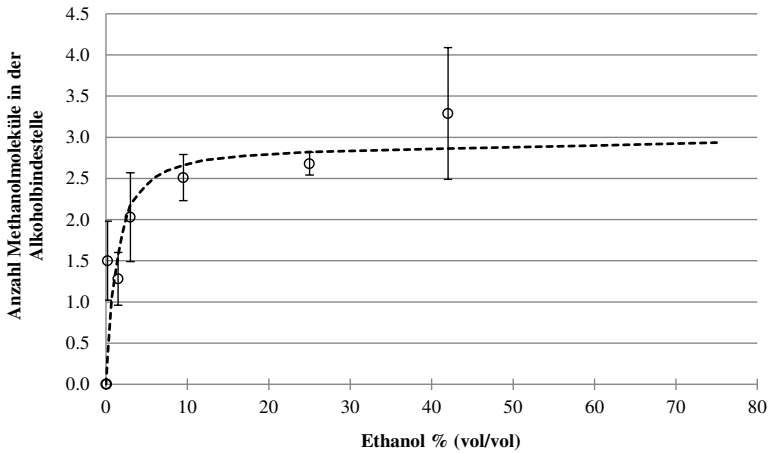


Abb. 63: Anzahl Methanolmoleküle in der Acetatbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,09 in Abhängigkeit der Methanolkonzentration (A) und der Methanolaktivität (B). Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

A



B

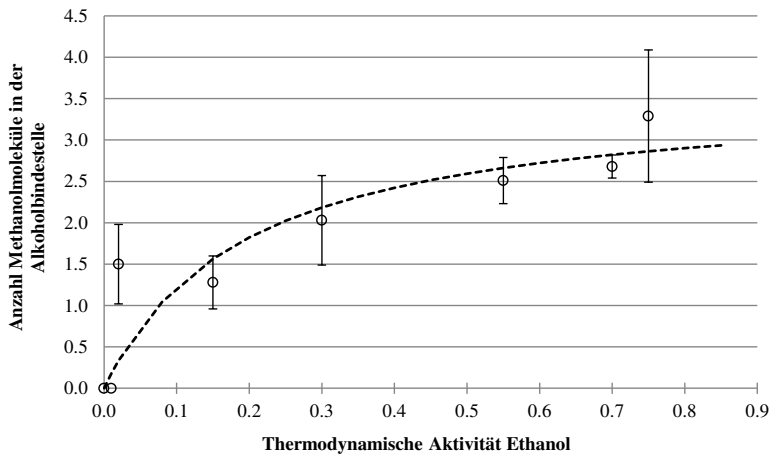
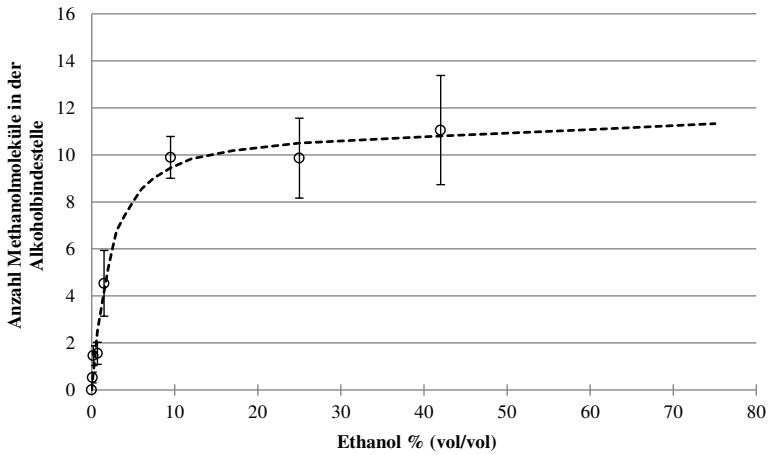


Abb. 64: Anzahl Ethanolmoleküle in der Alkoholbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,09 in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration (A) und der Ethanolaktivität (B). Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

A



B

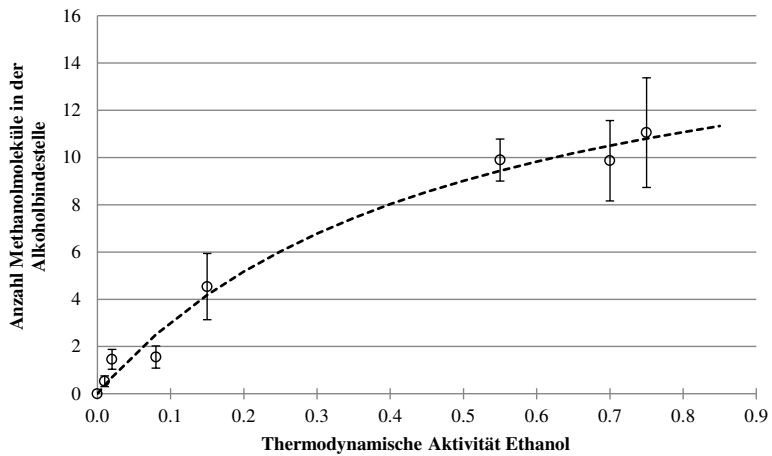


Abb. 65: Anzahl Ethanolmoleküle in der Acetatbindestelle von CALB bei einer Wasseraktivität von 0,09 in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration (A) und der Ethanolaktivität (B). Aus den Simulationen berechnete Werte (Kreise) und aus dem Modell berechneter Verlauf (gestrichelte Linie).

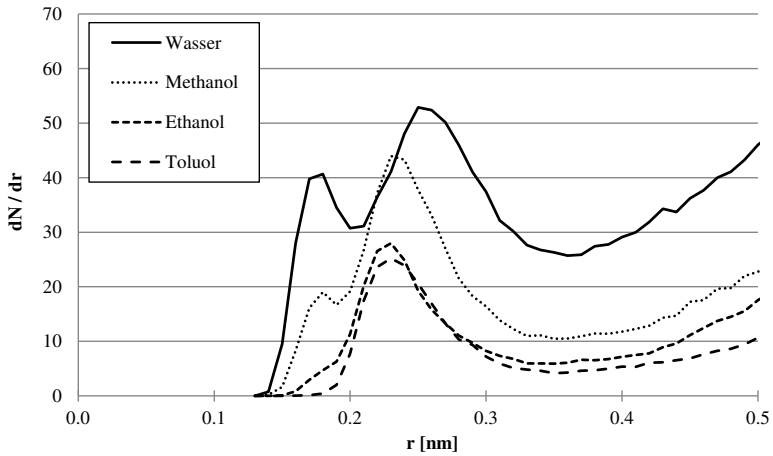


Abb. 66: dN/dr-Plot für die Bindungsstelle von CALB in reinem Wasser, Methanol, Ethanol und Toluol

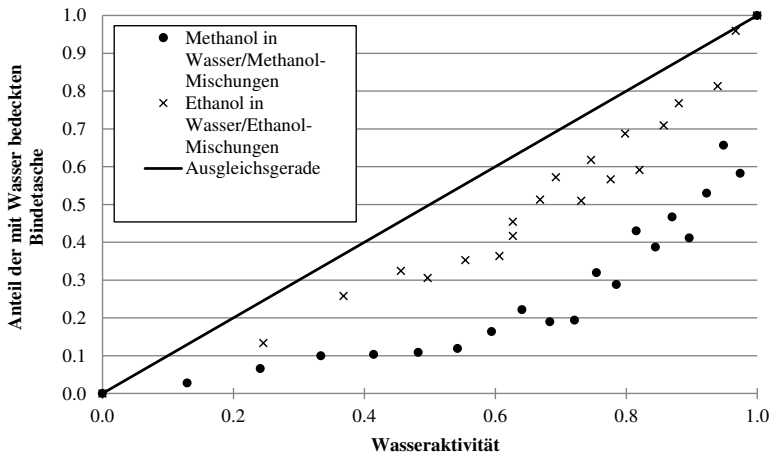


Abb. 67: Anteil der mit Wasser bedeckten Bindungstasche von CALB in Abhängigkeit der Wasseraktivität in binären Wasser/Alkohol-Mischungen

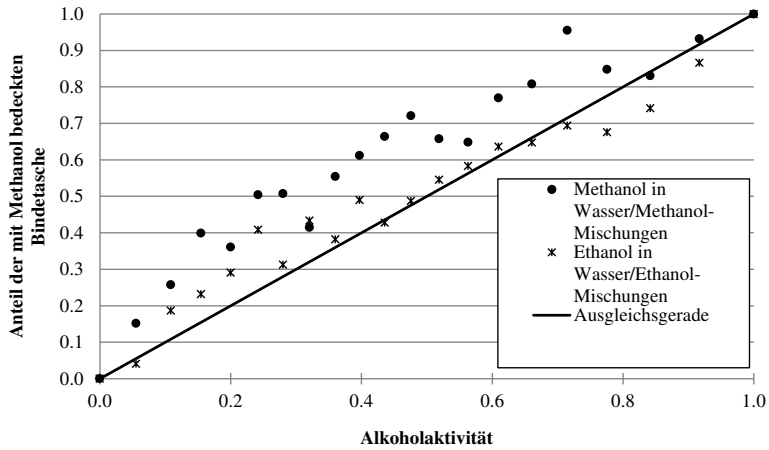


Abb. 68: Anteil der mit Alkohol bedeckten Bindungstasche von CALB in Abhängigkeit der Alkoholaktivität in binären Wasser/Alkohol-Mischungen

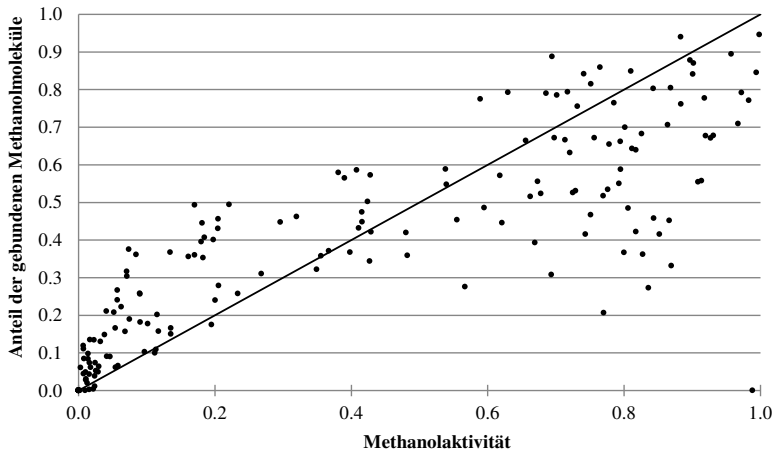


Abb. 69: Bindung von Methanol an Substratbindestelle von CALB in ternären Wasser-/Methanol-/Toluol-Mischungen

## 6. Literatur

1. Sym, E.A., *Action of esterase in the presence of organic solvents*. Biochemical Journal, 1936. **30**: p. 609-617.
2. Hill, A.C., *LXVI.-Reversible zymohydrolysis*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1898. **73**.
3. Kastle, J.H. and A.S. Loevenhart, *Concerning lipase, the fat-splitting enzyme, and the reversibility of its action*. Journal of the American Chemical Society, 1900. **24** p. 491–525.
4. Zaks, A. and A.M. Klivanov, *Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C*. Science, 1984. **224**(4654): p. 1249-1251.
5. Zaks, A. and A.M. Klivanov, *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(10): p. 3192-3196.
6. Kazandjian, R.Z., J.S. Dordick, and A.M. Klivanov, *Enzymatic analyses in organic solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**(3): p. 417-421.
7. Kemp, G.D., F.M. Dickinson, and C. Ratledge, *Activity and substrate specificity of the fatty alcohol oxidase of Candida tropicalis in organic solvents*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991. **34**(4): p. 441-445.
8. Zaks, A. and A.M. Klivanov, *The effect of water on enzyme action in organic media*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(17): p. 8017-8021.
9. Laane, C., et al., *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 1987. **30**(1): p. 81-87.
10. Degn, P. and W. Zimmermann, *Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from Candida antarctica*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **74**(6): p. 483-491.
11. Carrea, G. and S. Riva, *Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents*. Angewandte Chemie International Edition, 2000. **39**(13): p. 2226-2254.
12. Adamczyk, A.J., et al., *Catalysis by dihydrofolate reductase and other enzymes arises from electrostatic preorganization, not conformational motions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(34): p. 14115-14120.
13. Mata, R.A., et al., *Toward accurate barriers for enzymatic reactions: QM/MM case study on p-hydroxybenzoate hydroxylase*. The Journal of Chemical Physics, 2008. **128**(2): p. 025104.



14. Benkovic, S.J., G.G. Hammes, and S. Hammes-Schiffer, *Free-energy landscape of enzyme catalysis*. *Biochemistry*, 2008. **47**(11): p. 3317-3321.
15. Fenimore, P.W., et al., *Slaving: Solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(25): p. 16047-16051.
16. Schmid, R.D. and R. Verger, *Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications*. *Angewandte Chemie International Edition*, 1998. **37**(12): p. 1608-1633.
17. Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry: a textbook*. 2000: Springer.
18. Hari Krishna, S. and N.G. Karanth, *Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media*. *Catalysis Reviews*, 2002. **44**(4): p. 499-591.
19. Verger, R., *Interfacial activation of lipases: facts and artifacts*. *Trends in Biotechnology*, 1997. **15**(1): p. 32-38.
20. Martinelle, M., M. Holmquist, and K. Hult, *On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995. **1258**(3): p. 272-276.
21. Heldt-Hansen Hans, P., et al., *A new immobilized positional nonspecific lipase for fat modification and ester synthesis*, in *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. 1989, American Chemical Society. p. 158-172.
22. Patkar, S.A., et al., *Purification of two lipases from Candida antarctica and their inhibition by various inhibitors*. *Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, including medical chemistry*, 1993. **32**(1): p. 76-80.
23. Uppenberg, J., et al., *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. *Structure*, 1994. **2**(4): p. 293-308.
24. Anderson, E.M., K.M. Larsson, and O. Kirk, *One biocatalyst - many applications: The use of Candida antarctica B-lipase in organic synthesis*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1998. **16**(3): p. 181-204.
25. Ollis, D.L., et al., *The alpha/beta-hydrolase fold*. *Protein Engineering*, 1992. **5**(3): p. 197-211.
26. Nardini, M. and B.W. Dijkstra, *Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: the family keeps growing*. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999. **9**(6): p. 732-737.
27. Holmquist, M., *Alpha/beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms*. *Current Protein and Peptide Science*, 2000. **1**(2): p. 209-235.

28. Warshel, A., et al., *How do serine proteases really work?* Biochemistry, 1989. **28**(9): p. 3629-3637.
29. Derewenda, Z.S. and A.M. Sharp, *News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases*. Trends in Biochemical Sciences, 1993. **18**(1): p. 20-25.
30. Reslow, M., P. Adlercreutz, and B. Mattiasson, *Organic solvents for bioorganic synthesis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987. **26**(1): p. 1-8.
31. Schrag, J.D., et al., *Redesigning the active site of Geotrichum candidum lipase*. Protein Engineering, 1995. **8**(8): p. 835-842.
32. Lawson, D.M., et al., *Structure of a Myristoyl-ACP-Specific Thioesterase from Vibrio harveyi*. Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9382-9388.
33. Kraut, J., *Serine proteases: structure and mechanism of catalysis*. Annual review of biochemistry, 1977. **46**(1): p. 331-358.
34. Hu, C.-H., T. Brinck, and K. Hult, *Ab initio and density functional theory studies of the catalytic mechanism for ester hydrolysis in serine hydrolases*. International Journal of Quantum Chemistry, 1998. **69**(1): p. 89-103.
35. Martinelle, M. and K. Hult, *Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by Candida antarctica lipase B*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995. **1251**(2): p. 191-197.
36. Rotticci, D., et al., *Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by Candida antarctica lipase B*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1998. **5**: p. 267-272.
37. Orrenius, C., et al., *Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by Candida antarctica lipase B*. Biocatalysis and Biotransformation, 1998. **16**(1): p. 1-15.
38. Pleiss, J., M. Fischer, and R.D. Schmid, *Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **93**(1-2): p. 67-80.
39. Uppenberg, J., et al., *Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols*. Biochemistry, 1995. **34**(51): p. 16838-16851.
40. Orrenius, C., et al., *Simple conformation space search protocols for the evaluation of enantioselectivity of lipases*. Protein Engineering, 1998. **11**(12): p. 1147-1153.
41. Patkar, S., et al., *Effect of mutations in Candida antarctica B lipase*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **93**: p. 95-101.

42. Rotticci, D., et al., *Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering*. *ChemBiochem*, 2001. **2**(10): p. 766-770.
43. Kendrew, J.C., et al., *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis*. *Nature*, 1958. **181**(4610): p. 662-666.
44. Perutz, M.F., et al., *Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis*. *Nature*, 1960. **185**(4711): p. 416-22.
45. Levitt, M. and S. Lifson, *Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure*. *Journal of Molecular Biology*, 1969. **46**(2): p. 269-279.
46. Gelin, B.R. and M. Karplus, *Sidechain torsional potentials and motion of amino acids in proteins: bovine pancreatic trypsin inhibitor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1975. **72**(6): p. 2002-2006.
47. McCammon, J.A., B.R. Gelin, and M. Karplus, *Dynamics of folded proteins*. *Nature*, 1977. **267**(5612): p. 585-590.
48. Frauenfelder, H., G.A. Petsko, and D. Tsernoglou, *Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics*. *Nature*, 1979. **280**(5723): p. 558-563.
49. Jorgensen, W.L. and J. Tirado-Rives, *The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin*. *Journal of the American Chemical Society*, 1988. **110**(6): p. 1657-1666.
50. Weiner, S.J., et al., *An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids*. *Journal of Computational Chemistry*, 1986. **7**(2): p. 230-252.
51. van Gunsteren, W.F. and Berendsen, *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*. Biomos, 1987. **1987**: p. 1-221.
52. Jorgensen, W.L. and J. Tirado-Rives, *Molecular modeling of organic and biomolecular systems using BOSS and MCPRO*. *Journal of Computational Chemistry*, 2005. **26**(16): p. 1689-1700.
53. Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs*. *Journal of Computational Chemistry*, 2005. **26**(16): p. 1668-1688.
54. Brooks, B.R., et al., *CHARMM: The biomolecular simulation program*. *Journal of Computational Chemistry*, 2009. **30**(10): p. 1545-1614.

55. Christen, M., et al., *The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05*. Journal of Computational Chemistry, 2005. **26**(16): p. 1719-1751.
56. Van Der Spoel, D., et al., *GROMACS: Fast, flexible, and free*. Journal of Computational Chemistry, 2005. **26**(16): p. 1701-1718.
57. Phillips, J.C., et al., *Scalable molecular dynamics with NAMD*. Journal of Computational Chemistry, 2005. **26**(16): p. 1781-1802.
58. Bowers, K.J., et al. *Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters*. in *SC 2006 Conference, Proceedings of the ACM/IEEE*. 2006.
59. Harder, E., et al., *Efficient simulation method for polarizable protein force fields: Application to the simulation of BPTI in liquid water*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2004. **1**(1): p. 169-180.
60. Xie, W., et al., *X-pol potential: An electronic structure-based force field for molecular dynamics simulation of a solvated protein in water*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2009. **5**(3): p. 459-467.
61. Jorgensen, W.L., *Optimized intermolecular potential functions for liquid alcohols*. The Journal of Physical Chemistry, 1986. **90**(7): p. 1276-1284.
62. Guevara-Carrion, G., et al., *Prediction of transport properties by molecular simulation: Methanol and ethanol and their mixture*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(51): p. 16664-16674.
63. Berendsen, H.J.C., et al., *Intermolecular forces*. Pullman, B., Ed.; Reidel Publishing Company: Dordrecht, 1981: p. 331-342.
64. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(2): p. 926-935.
65. Berendsen, H.J.C., J.R. Grigera, and T.P. Straatsma, *The missing term in effective pair potentials*. The Journal of Physical Chemistry, 1987. **91**(24): p. 6269-6271.
66. Mahoney, M.W. and W.L. Jorgensen, *A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions*. The Journal of Chemical Physics, 2000. **112**(20): p. 8910-8922.
67. Vishnyakov, A., A.P. Lyubartsev, and A. Laaksonen, *Molecular dynamics simulations of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfoxide water mixture*. The Journal of Physical Chemistry A, 2001. **105**(10): p. 1702-1710.

68. Noskov, S.Y., G. Lamoureux, and B.t. Roux, *Molecular dynamics study of hydration in ethanol water mixtures using a polarizable force field*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(14): p. 6705-6713.
69. Venables, D.S. and C.A. Schmuttenmaer, *Spectroscopy and dynamics of mixtures of water with acetone, acetonitrile, and methanol*. The Journal of Chemical Physics, 2000. **113**(24): p. 11222-11236.
70. Vaisman, I.I. and M.L. Berkowitz, *Local structural order and molecular associations in water-DMSO mixtures. Molecular dynamics study*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(20): p. 7889-7896.
71. Idrissi, A., F. Sokolic, and A. Perera, *A molecular dynamics study of the urea/water mixture*. The Journal of Chemical Physics, 2000. **112**(21): p. 9479-9488.
72. Kovacs, H. and A. Laaksonen, *Molecular dynamics simulation and NMR study of water-acetonitrile mixtures*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(15): p. 5596-5605.
73. Handgraaf, J.-W., T.S. van Erp, and E.J. Meijer, *Ab initio molecular dynamics study of liquid methanol*. Chemical Physics Letters, 2003. **367**(5-6): p. 617-624.
74. Benmore, C.J. and Y.L. Loh, *The structure of liquid ethanol: A neutron diffraction and molecular dynamics study*. The Journal of Chemical Physics, 2000. **112**(13): p. 5877-5883.
75. Saiz, L., J.A. Padro, and E. Guardia, *Structure of liquid ethylene glycol: A molecular dynamics simulation study with different force fields*. The Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(7): p. 3187-3199.
76. Blicek, J., et al., *Molecular dynamics simulations of glycerol glass-forming liquid*. Chemical Physics, 2005. **317**(2-3): p. 253-257.
77. Saiz, L., E. Guardia, and J.-A. Padro, *Dielectric properties of liquid ethanol. A computer simulation study*. The Journal of Chemical Physics, 2000. **113**(7): p. 2814-2822.
78. Gubskaya, A.V. and P.G. Kusalik, *Molecular dynamics simulation study of ethylene glycol, ethylenediamine, and 2-aminoethanol. 1. The local structure in pure liquids*. The Journal of Physical Chemistry A, 2004. **108**(35): p. 7151-7164.
79. Tsuchida, E., *Ab initio molecular dynamics simulations with linear scaling: application to liquid ethanol*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2008. **20**(29): p. 294212.

80. Walsler, R., et al., *The effect of force-field parameters on properties of liquids: Parametrization of a simple three-site model for methanol*. The Journal of Chemical Physics, 2000. **112**(23): p. 10450-10459.
81. Yu, H., et al., *Molecular dynamics simulations of liquid methanol and methanol–water mixtures with polarizable models*. Journal of Computational Chemistry, 2006. **27**(13): p. 1494-1504.
82. Pagliai, M., et al., *Hydrogen bond dynamics in liquid methanol*. The Journal of Chemical Physics, 2003. **119**(13): p. 6655-6662.
83. Tsuchida, E., Y. Kanada, and M. Tsukada, *Density-functional study of liquid methanol*. Chemical Physics Letters, 1999. **311**(3-4): p. 236-240.
84. Haughney, M., M. Ferrario, and I.R. McDonald, *Molecular-dynamics simulation of liquid methanol*. The Journal of Physical Chemistry, 1987. **91**(19): p. 4934-4940.
85. Chalaris, M. and J. Samios, *Hydrogen bonding in supercritical methanol. A molecular dynamics investigation*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(7): p. 1161-1166.
86. Wallen, S.L., et al., *Density and temperature effects on the hydrogen bond structure of liquid methanol*. The Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(10): p. 3959-3964.
87. Saiz, L., J.A. Padro, and E. Guardia, *Structure and dynamics of liquid ethanol*. The Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(1): p. 78-86.
88. Chelli, R., et al., *Calculation of optical spectra in liquid methanol using molecular dynamics and the chemical potential equalization method*. The Journal of Chemical Physics, 1999. **111**(9): p. 4218-4229.
89. Leeuwen, M.E., *Prediction of the vapour liquid coexistence curve of alkanols by molecular simulation*. Molecular Physics, 1996. **87**(1): p. 87-101.
90. Jorgensen, W.L., J.M. Briggs, and M.L. Contreras, *Relative partition coefficients for organic solutes from fluid simulations*. The Journal of Physical Chemistry, 1990. **94**(4): p. 1683-1686.
91. Anastas, P. and N. Eghbali, *Green chemistry: principles and practice*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(1): p. 301-312.
92. Erdmenger, T., et al., *Recent developments in the utilization of green solvents in polymer chemistry*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(8): p. 3317-3333.

93. Affleck, R., C.A. Haynes, and D.S. Clark, *Solvent dielectric effects on protein dynamics*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(11): p. 5167-5170.
94. Ottosson, J., et al., *Size as a parameter for solvent effects on Candida antarctica lipase B enantioselectivity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2002. **1594**(2): p. 325-334.
95. Lee, S.B. and K.-J. Kim, *Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995. **79**(5): p. 473-478.
96. Turner, N.A., et al., *Analysis of conformational states of Candida rugosa lipase in solution: Implications for mechanism of interfacial activation and separation of open and closed forms*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **72**(1): p. 108-118.
97. Dordick, J.S., *Designing enzymes for use in organic solvents*. Biotechnology Progress, 1992. **8**(4): p. 259-267.
98. Fitzpatrick, P.A., D. Ringe, and A.M. Klivanov, *X-ray crystal structure of cross-linked subtilisin Carlsberg in water vs. acetonitrile*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **198**(2): p. 675-681.
99. Yennawar, N.H., H.P. Yennawar, and G.K. Farber, *X-ray crystal structure of gamma-chymotrypsin in hexane*. Biochemistry, 1994. **33**(23): p. 7326-7336.
100. Affleck, R., et al., *Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(3): p. 1100-1104.
101. Broos, J., et al., *Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(51): p. 12657-12663.
102. Hartsough, D.S. and K.M. Merz, *Protein dynamics and solvation in aqueous and nonaqueous environments*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(15): p. 6529-6537.
103. Toba, S., D.S. Hartsough, and K.M. Merz, *Solvation and dynamics of chymotrypsin in hexane*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(27): p. 6490-6498.
104. Trodler, P. and J. Pleiss, *Modeling structure and flexibility of Candida antarctica lipase B in organic solvents*. BMC Structural Biology, 2008. **8**(1): p. 9.

105. Li, C., et al., *Analysis of the conformational stability and activity of Candida antarctica lipase B in organic solvents*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(37): p. 28434-28441.
106. Hartsough, D.S. and K.M. Merz, *Protein flexibility in aqueous and nonaqueous solutions*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(26): p. 10113-10116.
107. Peters, G.H., et al., *Dynamics of proteins in different solvent systems: analysis of essential motion in lipases*. Biophysical Journal, 1996. **71**(5): p. 2245-2255.
108. Diaz-Vergara, N. and A. Pineiro, *Molecular dynamics study of triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi in water/decane mixtures*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(11): p. 3529-3539.
109. Cruz, A., et al., *Molecular dynamic study of subtilisin Carlsberg in aqueous and nonaqueous solvents*. Molecular Simulation, 2009. **35**(3): p. 205-212.
110. Tejo, B.A., A.B. Salleh, and J. Pleiss, *Structure and dynamics of Candida rugosa lipase: the role of organic solvent*. Journal of Molecular Modeling, 2004. **10**(5-6): p. 358-366.
111. Soares, C.M., V.H. Teixeira, and A.M. Baptista, *Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studies*. Biophysical Journal, 2003. **84**(3): p. 1628-1641.
112. Yang, L., J.S. Dordick, and S. Garde, *Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity*. Biophysical Journal, 2004. **87**(2): p. 812-821.
113. Micaelo, N.M. and C.M. Soares, *Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents*. FEBS Journal, 2007. **274**(9): p. 2424-2436.
114. Branco, R.J.F., et al., *Molecular mechanism of the hydration of Candida antarctica lipase B in the gas phase: Water adsorption isotherms and molecular dynamics simulations*. ChemBioChem, 2009. **10**(18): p. 2913-2919.
115. Colombo, G. and K.M. Merz, *Stability and activity of mesophilic Subtilisin E and its thermophilic homolog: Insights from molecular dynamics simulations*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(29): p. 6895-6903.
116. Liu, F.F., et al., *Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations*. The Journal of chemical physics, 2010. **132**(22): p. 225103.



117. Kony, D.B., P.H. Hünenberger, and W.F. van Gunsteren, *Molecular dynamics simulations of the native and partially folded states of ubiquitin: Influence of methanol cosolvent, pH, and temperature on the protein structure and dynamics*. Protein Science, 2007. **16**(6): p. 1101-1118.
118. Vazquez-Figueroa, E., et al., *Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus method also show increased stability in salts solutions and homogeneous aqueous-organic media*. Protein Engineering Design and Selection, 2008. **21**(11): p. 673-680.
119. Reetz, M.T., et al., *Increasing the stability of an enzyme toward hostile organic solvents by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis using the B-FIT method*. Chemical Communications, 2010. **46**(45): p. 8657-8658.
120. Ottosson, J., L. Fransson, and K. Hult, *Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase*. Protein Science, 2002. **11**(6): p. 1462-1471.
121. Scheib, H., et al., *Stereoselectivity of mucorales lipases toward triradylglycerols—A simple solution to a complex problem*. Protein Science, 1999. **8**(1): p. 215-221.
122. Schulz, T., J. Pleiss, and R.D. Schmid, *Stereoselectivity of Pseudomonas cepacia lipase toward secondary alcohols: A quantitative model*. Protein Science, 2000. **9**(6): p. 1053-1062.
123. Scheib, H., et al., *Rational design of Rhizopus oryzae lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols*. Protein Engineering, 1998. **11**(8): p. 675-682.
124. Henke, E., et al., *A molecular mechanism of enantioselectivity of tertiary alcohols by carboxylesterases*. ChemBioChem, 2003. **4**(6): p. 485-493.
125. Kahlow, U.H., R.D. Schmid, and J. Pleiss, *A model of the pressure dependence of the enantioselectivity of Candida rugosalipase towards (+/-)-menthol*. Protein Science, 2001. **10**(10): p. 1942-1952.
126. Micaelo, N.M., et al., *Water dependent properties of cutinase in nonaqueous solvents: A computational study of enantioselectivity*. Biophysical Journal, 2005. **89**(2): p. 999-1008.
127. Léonard, V., et al., *A water molecule in the stereospecificity pocket of Candida antarctica lipase B enhances enantioselectivity towards pentan-2-ol*. ChemBioChem, 2007. **8**(6): p. 662-667.

128. Castillo, E., et al., *Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach*. Journal of Biotechnology, 2003. **102**(3): p. 251-259.
129. Edmundo, C., et al., *Efficient lipase-catalyzed production of tailor-made emulsifiers using solvent engineering coupled to extractive processing*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998. **75**(2): p. 309-313.
130. Watanabe, K., T. Yoshida, and S.-i. Ueji, *The role of conformational flexibility of enzymes in the discrimination between amino acid and ester substrates for the subtilisin-catalyzed reaction in organic solvents*. Bioorganic Chemistry, 2004. **32**(6): p. 504-515.
131. Graber, M., et al., *Solvent as a competitive inhibitor for Candida antarctica lipase B*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2007. **1774**(8): p. 1052-1057.
132. van Tol, J.B.A., et al., *Thermodynamic and kinetic parameters of lipase-catalyzed ester hydrolysis in biphasic systems with varying organic solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **48**(3): p. 179-189.
133. van Tol, J.B.A., et al., *Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **47**(1): p. 71-81.
134. Sandoval, G., et al., *Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: Kinetic and thermodynamic arguments*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. **78**(3): p. 313-320.
135. Sandoval, G.C., A. Marty, and J.-S. Condoret, *Thermodynamic activity-based enzyme kinetics: Efficient tool for nonaqueous enzymology*. AIChE Journal, 2001. **47**(3): p. 718-726.
136. Strompen, S., et al., *Kinetic investigation of a solvent-free, chemoenzymatic reaction sequence towards enantioselective synthesis of a beta-amino acid ester*. Biotechnology and Bioengineering, 2012. **109**(6): p. 1479-1489.
137. Fjerbaek, L., K.V. Christensen, and B. Norddahl, *A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **102**(5): p. 1298-1315.
138. Santambrogio, C., et al., *Effects of methanol on a methanol-tolerant bacterial lipase*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. **97**(19): p. 8609-8618.

139. Shimada, Y., et al., *Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999. **76**(7): p. 789-793.
140. Virsu, P., et al., *Preparation of the enantiomers of 1-phenylethan-1,2-diol. Regio- and enantioselectivity of acylase I and Candida antarctica lipases A and B*. Tetrahedron: Asymmetry, 2001. **12**(17): p. 2447-2455.
141. Watanabe, Y., et al., *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized Candida antarctica lipase*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000. **77**(4): p. 355-360.
142. Ozyilmaz, G. and E. Gezer, *Production of aroma esters by immobilized Candida rugosa and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **64**(3-4): p. 140-145.
143. Tan, T., et al., *Biodiesel production with immobilized lipase: A review*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(5): p. 628-634.
144. Vyas, A.P., J.L. Verma, and N. Subrahmanyam, *A review on FAME production processes*. Fuel, 2010. **89**(1): p. 1-9.
145. Behler, A., et al., *Industrial surfactant syntheses*, in *Reactions and Synthesis in Surfactant Systems*. 2001, Marcel Dekker Inc. New York, New York. p. 1-44.
146. Knothe, G., *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters*. Fuel Processing Technology, 2005. **86**(10): p. 1059-1070.
147. Foglia, T., et al., *Low-temperature properties of alkyl esters of tallow and grease*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997. **74**(8): p. 951-955.
148. Al-Zuhair, S., *Production of biodiesel: possibilities and challenges*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2007. **1**(1): p. 57-66.
149. Bozbas, K., *Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2008. **12**(2): p. 542-552.
150. Robles-Medina, A., et al., *Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production*. Biotechnology Advances, 2009. **27**(4): p. 398-408.
151. Nelson, L., T. Foglia, and W. Marmer, *Lipase-catalyzed production of biodiesel*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996. **73**(9): p. 1191-1195.
152. Chen, J.-W. and W.-T. Wu, *Regeneration of immobilized Candida antarctica lipase for transesterification*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003. **95**(5): p. 466-469.

153. Stamenkovic, O.S., A.V. Velickovic, and V.B. Veljkovic, *The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolsis: Current state and perspectives*. Fuel, 2011. **90**(11): p. 3141-3155.
154. Norin, M., et al., *Molecular dynamics simulations of an enzyme surrounded by vacuum, water, or a hydrophobic solvent*. Biophysical Journal, 1994. **67**(2): p. 548-559.
155. James, J.J., et al., *Activation of Candida rugosa lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study*. FEBS Letters, 2007. **581**(23): p. 4377-4383.
156. Trodler, P., R. Schmid, and J. Pleiss, *Modeling of solvent-dependent conformational transitions in Burkholderia cepacia lipase*. BMC Structural Biology, 2009. **9**(1): p. 38.
157. Barbe, S., et al., *Insights into lid movements of Burkholderia cepacia lipase inferred from molecular dynamics simulations*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2009. **77**(3): p. 509-523.
158. Santini, S., et al., *Study of Thermomyces lanuginosa lipase in the presence of tributyrilglycerol and water*. Biophysical Journal, 2009. **96**(12): p. 4814-4825.
159. Wittrup Larsen, M., et al., *Suppression of water as a nucleophile in Candida antarctica lipase B catalysis*. ChemBioChem, 2010. **11**(6): p. 796-801.
160. Samukawa, T., et al., *Pretreatment of immobilized Candida antarctica lipase for biodiesel fuel production from plant oil*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000. **90**(2): p. 180-183.
161. Kaieda, M., et al., *Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(1): p. 12-15.
162. van Erp, S.H., E.O. Kamenskaya, and Y.L. Khmel'nitsky, *The effect of water content and nature of organic solvent on enzyme activity in low-water media. A quantitative description*. European journal of biochemistry / FEBS, 1991. **202**(2): p. 379-384.
163. Dimoula, K., et al., *Substrate and water adsorption phenomena in a gas/solid enzymatic reactor*. Biotechnology Journal, 2009. **4**(5): p. 712-721.
164. Deshpande, A., S. Nimsadkar, and S.C. Mande, *Effect of alcohols on protein hydration: crystallographic analysis of hen egg-white lysozyme in the presence of alcohols*. Acta Crystallographica Section D, 2005. **61**: p. 1005-1008.

165. Lousa, D., A.M. Baptista, and C.M. Soares, *Analyzing the molecular basis of enzyme stability in ethanol/water mixtures using molecular dynamics simulations*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(2): p. 465-473.
166. Liu, W., et al., *Effect of alcohols on aqueous lysozyme-lysozyme interactions from static light-scattering measurements*. Biophysical Chemistry, 2004. **107**(3): p. 289-298.
167. Yamazaki, K., et al., *Methanol-induced tertiary and secondary structure changes of granulocyte-colony stimulating factor*. Journal of Biochemistry, 2006. **140**(1): p. 49-56.
168. Tofts, P.S., et al., *Test liquids for quantitative MRI measurements of self-diffusion coefficient in vivo*. Magnetic Resonance in Medicine, 2000. **43**(3): p. 368-374.
169. Pratt, K.C. and W.A. Wakeham, *Self-diffusion in water and monohydric alcohols*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1977. **73**(7): p. 997-1002.
170. Haynes, W.M., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 91 ed. 2010: CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL.
171. Karger, N., T. Vardag, and H.-D. Lüdemann, *Temperature dependence of self-diffusion in compressed monohydric alcohols* Journal of Chemical Physics, 1990. **93**(5): p. 3437-3444.
172. Rathbun, R.E. and A.L. Babb, *Self-diffusion in liquids. 3: Temperature dependence in pure liquids*. The Journal of Physical Chemistry, 1961. **65**(6): p. 1072-1074.
173. Hurle, R.L., A.J. Easteal, and L.A. Woolf, *Self-diffusion in monohydric alcohols under pressure. Methanol, methan(2H)ol and ethanol*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, 1985. **81**(3): p. 769-779.
174. Karger, N., T. Vardag, and H.-D. Lüdemann, *Temperature dependence of self-diffusion in compressed monohydric alcohols* J. Chem. Phys., 1990. **93**: p. 3437.
175. McCall, D.W. and D.C. Douglass, *Self-diffusion in the primary alcohols* Journal of Chemical Physics, 1960. **32**: p. 1876.
176. Iwahashi, M., et al., *Dynamical structures of normal alkanes, alcohols, and fatty acids in the liquid state as determined by viscosity, self-diffusion coefficient, infrared spectra, and [13]C NMR spin-lattice relaxation time measurements*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1990. **63**: p. 2154-2158.

177. Holz, M., S.R. Heil, and A. Sacco, *Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate 1H NMR PFG measurements*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2000. **2**: p. 4740-4742.
178. Wellek, R.M., R.D. Mitchell, and J.W. Moore, *Diffusion coefficients of ethylene glycol and cyclohexanol in the solvents ethylene glycol, diethylene glycol, and propylene glycol as a function of temperature*. Journal of Chemical & Engineering Data, 1971. **16**(1): p. 57-60.
179. Klein, M., et al., *Self-diffusion measurements by a constant-relaxation method in strongly inhomogeneous magnetic fields*. Journal of Magnetic Resonance, 2003. **164**(2): p. 310-320.
180. Tomlinson, D.J., *Temperature dependent self-diffusion coefficient measurements of glycerol by the pulsed N.M.R. technique*. Molecular Physics, 1972. **25**(3): p. 735-738.
181. Chelli, R., et al., *Glycerol condensed phases Part I. A molecular dynamics study*. Physical Chemistry Chemical Physics, 1999. **1**(5): p. 871-877.
182. Holz, M., S.R. Heil, and A. Sacco, *Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate 1H NMR PFG measurements*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2000. **2**(20): p. 4740-4742.
183. Maryott, A.A. and E.R. Smith, *Table of dielectric constants of pure liquids*. 1951: G.P.O.
184. Kim, J.H. and S.H. Lee, *Molecular dynamics simulation studies of benzene, toluene, and p-xylene in a canonical ensemble*. Bulletin Korean Chemical Society, 2002. **23**(3): p. 441-446.
185. Fioroni, M. and D. Vogt, *Toluene model for molecular dynamics simulations in the ranges  $298 < T (K) < 350$  and  $0.1 < P (MPa) < 10$* . The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(31): p. 11774-11781.
186. Fredenslund, A., R.L. Jones, and J.M. Prausnitz, *Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures*. AIChE Journal, 1975. **21**(6): p. 1086-1099.
187. Jorgensen, W.L., D.S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, *Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(45): p. 11225-11236.
188. Van Leeuwen, M.E., *Prediction of the vapour-liquid coexistence curve of alkanols by molecular simulation*. Molecular Physics, 1996. **87**(1): p. 87 - 102.

189. Busselez, R., et al., *Molecular dynamics simulation of nanoconfined glycerol*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(47): p. 11127-11133.
190. Bousquet-Dubouch, M.-P., et al., *Alcoholysis catalyzed by Candida antarctica lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1550**(1): p. 90-99.
191. Lorenz, C.D. and R.M. Ziff, *Precise determination of the critical percolation threshold for the three-dimensional "Swiss cheese" model using a growth algorithm*. The Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(8): p. 3659-3661.
192. De Gennes, P.G. and C. Taupin, *Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces*. The Journal of Physical Chemistry, 1982. **86**(13): p. 2294-2304.
193. Benson, S. and J. Pleiss, *Incomplete mixing versus clathrate-like structures: A molecular view on hydrophobicity in methanol water mixtures*. Journal of Molecular Modeling, 2013. **19**: p. 3427-3436.
194. Lotti, M., et al., *Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel*. Biotechnology Journal, 2014.
195. Korman, T.P., et al., *Dieselizezymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution*. Biotechnol Biofuels, 2013. **6**(1): p. 70.
196. Jorgensen, W.L. and J.D. Madura, *Temperature and size dependence for Monte Carlo simulations of TIP4P water*. Molecular Physics, 1985. **56**(6): p. 1381-1392.
197. Oleinikova, A., et al., *Formation of spanning water networks on protein surfaces via 2D percolation transition*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(5): p. 1988-1998.
198. Smolin, N., et al., *Properties of spanning water networks at protein surfaces*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(21): p. 10995-11005.
199. Smolin, N. and R. Winter, *Molecular Dynamics Simulations of Staphylococcal Nuclease: Properties of Water at the Protein Surface*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(40): p. 15928-15937.
200. Hess, B., et al., *GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2008. **4**(3): p. 435-447.

201. Larsen, M.W., U.T. Bornscheuer, and K. Hult, *Expression of Candida antarctica lipase B in Pichia pastoris and various Escherichia coli systems*. Protein Expression and Purification, 2008. **62**(1): p. 90-97.
202. Kulschewski, T. and J. Pleiss, *A molecular dynamics study of liquid aliphatic alcohols: simulation of density and self-diffusion coefficient using a modified OPLS force field*. Molecular Simulation, 2013. **39**(9): p. 754-767.
203. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics*. Journal of Molecular Graphics, 1996. **14**(1): p. 33-38.
204. Loegering, K., et al., *An integrated scale-down plant for optimal recombinant enzyme production by Pichia pastoris*. Biotechnology Journal, 2011. **6**(4): p. 428-436.
205. Bell, G., A.E.M. Janssen, and P.J. Halling, *Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities*. Enzyme and Microbial Technology, 1997. **20**(6): p. 471-477.









