

**Modellgestützte Entwicklung eines mehrstufigen Verfahrens zur
enzymatischen Synthese enantiomerenreiner Aminosäuren**

Von der Fakultät Maschinenbau
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von Harald Teves aus Herne

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. M. Reuss

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. C. Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2007

Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2008

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

Herrn Prof. Dr.-Ing. M. Reuss für die Bereitstellung des Themas, die große wissenschaftliche Freiheit und verschiedene fachliche Anregungen,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Syldatk für die Übernahme des Korreferats und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse,

Sven Schmalzriedt und Marc Jenne für den freundlichen Empfang in Stuttgart, die freundschaftliche Begleitung in den letzten Jahren und natürlich die große Hilfe bei allen Fragen zur numerischen Simulation.

Kerstin Ragnitz, Oliver Vielhauer, Thomas Waniek und Martin Schwickart für die kurzweilige Zeit im und auch außerhalb des Labors, Thomas insbesondere für die intensiven gemeinsamen Arbeiten mit dem Polarimeter,

Andreas Freund und Gerhard Stadler für die Unterstützung im Technikum,

Frank Sarfert vom Institut für chemische Verfahrenstechnik für die angenehme Zusammenarbeit zum Thema Elektrodialyse,

Markus Abendschein, Jochen Unfried, Juliane Braun, Thorsten Stirner und Lothar Tacke, die durch Ihre Studien- und Diplomarbeiten beziehungsweise Hiwi-Tätigkeiten wichtige Beiträge zu dieser Arbeit lieferten,

Sabine Arnold, Alexander Schwarz, Petra Münch, Markus Pietzsch, Anja Wiese und den Mitarbeitern des Instituts für Bioverfahrenstechnik für die freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die stete Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt Silvia, Judith und Eva.

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	9
Zusammenfassung	13
Abstract	16
1 Einleitung	19
2 Prozessbeschreibung	25
2.1 Grundlagen	25
2.2 Versuchsanlage	26
2.2.1 Membranreaktor	29
2.2.2 Festbettreaktoren	29
3 Anlagenmodellierung	31
3.1 Gesamtsystem aus mehreren verschalteten Apparaten	31
3.2 Membranreaktor	32
3.3 Festbettreaktor	32
3.3.1 Ortsdiskretisierung der partiellen Differentialgleichungen	34
3.3.2 Modellparameter für den Festbettreaktor	37
4 Material und Methoden	41
4.1 Chemikalien	41
4.2 Puffer	41
4.3 Substratlösungen	42
4.4 Biokatalysatoren	42
4.5 Analytik	44
4.5.1 Analytische HPLC	44
4.5.2 Polarimetrie	45
4.5.2.1 Messung von Konzentrations-Zeit-Verläufen	45
4.5.2.2 Bestimmung von Anfangsreaktionsraten	46
4.5.3 Kopplung von Polarimetrie und Photometrie	46
4.5.3.1 Messung von Konzentrations-Zeit-Verläufen	46

4.5.4	Spezifische molare Drehwerte und Absorptionskoeffizienten	48
4.6	Standardassays und Bestimmung von Reaktionsraten	48
4.7	Schätzung von Modellparametern und Berechnung ihrer Konfidenzintervalle	50
5	Reaktionstechnische Beschreibung der Teilsysteme	52
5.1	Kinetik der Stoffumsetzung von Benzylhydantoin mit Hydantoinase	52
5.1.1	Kinetisches Modell	52
5.1.2	Voruntersuchungen	53
5.1.2.1	Gleichgewichtskonstante	53
5.1.2.2	Enantioselektivität	54
5.1.2.3	Stabilität der gelösten Hydantoinase	54
5.1.3	Modellvalidierung	56
5.1.3.1	Schätzung der kinetischen Parameter aus Anfangsreaktionsraten	56
5.1.3.2	Vergleich der kinetischen Parameter für Wildtyp-Enzym und re- kombinante Hydantoinase	58
5.1.3.3	Dynamische Simulation der Stoffumsetzung und Schätzung ki- netischer Parameter	58
5.1.3.4	Wechselwirkung mit der Carbamoylase-katalysierten Reaktion, Inhibition durch L-Penylalanin	64
5.1.4	Einfluss des pH-Werts	65
5.2	Kinetik der Stoffumsetzung von L-CPhe mit L-Carbamoylase	66
5.2.1	Kinetische Modellierung und Voruntersuchungen	66
5.2.1.1	Stabilität der gelösten L-Carbamoylase	67
5.2.2	Modellvalidierung	68
5.2.2.1	Schätzung der kinetischen Parameter aus Anfangsreaktionsra- ten, Inhibition durch das Produkt L-Phenylalanin	68
5.2.2.2	Dynamische Simulation der Stoffumsetzung	68
5.2.3	Einfluss des pH-Werts	70
5.3	Immobilisierte Enzyme	70
5.3.1	Allgemeines und Betriebsstabilität	70
5.3.2	Untersuchung auf Stofftransportlimitierung	72
5.4	Kinetik der Racemisierung von Benzylhydantoin	74
5.4.1	Racemisierung in wässriger Lösung	74

5.4.2	Racemisierung am Ionenaustauscher Q-Sepharose FF	77
5.5	Kinetik der Auflösung von Benzylhydantoin	80
5.6	Physikalische Charakterisierung der Festbett-Schüttungen	82
5.6.1	Eupergit C 250L und Q-Sepharose FF	82
5.6.2	Adsorption an Q-Sepharose FF	84
5.7	Charakterisierung der Vermischung in den Reaktoren	87
5.7.1	Terminale Mischzeit im Membranreaktor	87
5.7.2	Axiale Dispersion im Festbettreaktor	89
6	Vergleich von Modellsimulationen mit experimentellen Beobachtungen des Verhaltens der Gesamtanlage	95
6.1	Validierung des dynamischen Anlagenmodells	95
6.1.1	Einzelapparate	95
6.1.1.1	Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase im Festbettreaktor. Einfluss der Verweilzeit	95
6.1.1.2	Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase im Festbettreaktor. Einfluss der Menge an L-Carbamoylase	98
6.1.1.3	Stabilität der immobilisierten Enzyme bei mehrfacher Verwendung	100
6.1.1.4	Racemisierung von Benzylhydantoin im Festbettreaktor	101
6.1.2	Verschaltete Apparate	106
6.1.2.1	Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher	106
6.1.2.2	Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher und Nachlösung des Substrats	109
6.2	Prozessmodifikation: ungepuffertes System einschließlich Produktaufarbeitung	111
6.2.1	Erster Schritt: Reaktion	112
6.2.2	Zweiter Schritt: Produktabtrennung mittels Elektrodialyse	114
7	Simulationsstudien und Diskussion	120
7.1	Optimierung der Racemisierungsgeschwindigkeit	120
7.2	Optimierung der Substratanfangskonzentration	123

7.3	Kontinuierliche Prozessführung im Feed-and-Bleed Verfahren	126
	Literatur	130

Symbolverzeichnis

Lateinische Buchstaben

Symbol	Definition	Einheit
a	spezifische Oberfläche	cm^{-1}
a_i	Koeffizienten des Diskretisierungsschemas ($i = E, P, W$)	<i>verschieden</i>
A	Querschnittsfläche	cm^2
A	Enzymaktivität	$\text{mmol}/(\text{g s})$
c	Konzentration	mol/cm^3 <i>oder</i> $\text{mM} = \text{mmol}/\text{L} = \text{mol}/\text{m}^3$
\underline{c}	mehrere zu einem Vektor zusammengefasste Konzentrationen	
\bar{c}	Beladung	$\text{mol}/\text{g}_{\text{feuchter Träger}}$
d_K	Partikel- bzw. Korndurchmesser ($d_K = 2 R$)	cm
d_S	Sauterdurchmesser	μm
d_{50}	mittlerer Durchmesser	μm
D_{ax}	axialer Dispersionskoeffizient	cm^2/s
D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient	cm^2/s
D_0	molarer Diffusionskoeffizient	cm^2/s
ee	Enantiomerenüberschuß	-
E	Enantioselektivität	-
E	Verweilzeitverteilung	s^{-1}
F	Verweilzeitsumme	-
I	elektrischer Strom	mA
k_i	Geschwindigkeitskonstante der Reaktion i	<i>verschieden</i>
k_f	Stoffübergangskoeffizient	cm/s
k_H	Koeffizient einer linearen Adsorptionsisotherme	L/g
k_1	Koeffizient 1 einer Adsorptionsisotherme	mmol/g
k_2	Koeffizient 2 einer Adsorptionsisotherme	mmol/L
k_s	Parameter der Auflösungskinetik	$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-2}$
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante	-
K_i	Inhibitionskonstante	mM
K_{IAT}	Selektivitätskoeffizient eines Ionenaustauschers	-
K_m	Michaelis-Menten Konstante	mM
l	Schichtdicke einer Messküvette	cm
L	Länge eines Festbettreaktors	cm
m	Masse	g
M	molare Masse	g/mol
n	Stoffmenge	mol
n	Drehzahl	min^{-1}

N	Anzahl Rührkessel	-
pK_i	Gleichgewichtsexponent i	-
P	Produktivität	mmol/(kg h)
Q	Volumenstrom	cm ³ /s
r	Ortskoordinate in radiale Richtung	cm
r	volumenbezogene Reaktionsrate	mM/s
r, r^{spez}	spezifische Reaktionsrate (auf die Enzymmasse bezogen)	mmol/(g s)
R	Radius ($R = d_K/2$)	cm
S	Oberfläche	cm ²
t	Zeit	s
t_m	mittlere Verweilzeit	s
t_m	terminale Mischzeit	s
$t_{1/2}$	Halbwertszeit	h
T	Temperatur	°C
u_0	Leerrohrgeschwindigkeit	cm/s
U	Umsatz	- bzw. %
U	elektrische Spannung	V
u_{max}	maximale spezifische Reaktionsrate (auf die Enzymmasse bezogen)	mmol/(g s)
V	Volumen	cm ³
x	Ortskoordinate	cm
X_{Enzym}	Enzymbeladung	g _{Enzym} /g _{feuchter Träger}
X_{IAT}	Kapazität eines Ionenaustauschers	mmol/L
Y	Ausbeute	%
z	Anzahl Partikel	-

Griechische Buchstaben

Symbol	Definition	Einheit
α	optischer Drehwert	°
$\langle \alpha \rangle$	spezifischer Drehwert	°/(mM cm)
β	Dissoziationsgrad	-
ϵ	optische Absorption	-
$\langle \epsilon \rangle$	spezifische Absorption	1/(mM cm)
ϵ_{Fb}	spezifisches Lückenvolumen eines Festbettreaktors	-
ϵ_{ges}	gesamter Hohlraumanteil eines Festbettreaktors	-
ϵ_K	Hohlraumanteil eines porösen Partikels bzw. Korn	-
η	Wirkungsgrad	-
θ	dimensionslose Zeit	-
θ	Gradientenverhältnis	-

κ	elektrische Leitfähigkeit	mS/cm
λ	Wellenlänge	nm
μ	dynamische Viskosität	g/(cm s)
ν	kinematische Viskosität	cm ² /s
ξ	Volumenanteil	-
ρ	Dichte	g/cm ³
ρ_K	Dichte eines porösen Partikels bzw. Korn	g/cm ³
ρ_S	Dichte eines massiven Partikels bzw. Korn	g/cm ³
σ	Standardabweichung	<i>verschieden</i>
τ	mittlere hydrodynamische Verweilzeit	s
τ_u	Umwegfaktor	-
ϕ	volumenbezogener Stoffstrom	mol/(cm ³ s)
Φ	Thiele-Modul	-
Φ	Limiter-Funktion im TVD Diskretisierungsschema	-
χ^2	statistische Kenngröße	-

Indizes und Abkürzungen

Symbol	Definition
<i>BnH</i>	Benzylhydantoin (geladen und ungeladen)
<i>BnH⁻</i>	negativ geladenes Benzylhydantoin
<i>Bulk</i>	Bulkphase (Strömungskern)
<i>Ca</i>	Carbamoylase
<i>calc</i>	berechneter Wert (calculated)
<i>CPhe</i>	Carbamoylphenylalanin
<i>D</i>	D-Enantiomer
<i>D-BnH</i>	D-Benzylhydantoin
<i>D-CPhe</i>	D-Carbamoylphenylalanin
<i>D-Phe</i>	D-Phenylalanin
<i>e, w</i>	Indizes der Ränder finiter Volumenelemente
<i>EE, E, P, W, WW</i>	Indizes finiter Volumenelemente
<i>ext</i>	externe Größe
<i>f</i>	feucht
<i>f</i>	Hinreaktion (forward)
<i>Fb</i>	Festbettreaktor
<i>finit</i>	finites Volumen
<i>ges</i>	gesamt
<i>Hy</i>	Hydantoinase
<i>IAT</i>	Ionenaustauscher
<i>int</i>	interne Größe

<i>K, Korn</i>	Korn <i>oder</i> Kornphase
<i>L</i>	L-Enantiomer
<i>L-BnH</i>	L-Benzylhydantoin
<i>L-CPhe</i>	L-Carbamoylphenylalanin
<i>L-Phe</i>	L-Phenylalanin
<i>lös</i>	Auflösen eines Feststoffs
<i>max</i>	Maximum
<i>min</i>	Minimum
<i>obs</i>	Messwert (observed)
<i>P</i>	Produkt
<i>P</i>	Protein
<i>P</i>	Puffer
<i>Phe</i>	Phenylalanin
<i>r</i>	Rückreaktion (reverse)
<i>R</i>	Rührer
<i>Rac</i>	Racemisierung
<i>RK</i>	Rührkessel
<i>s</i>	Feststoff (solid)
<i>S</i>	Substrat
<i>Sch</i>	Schüttung
<i>T</i>	Träger
<i>tr</i>	trocken
<i>zu</i>	Zulauf zum Festbett- bzw. Membranreaktor
<i>Zulauf</i>	Zulauf zum Gesamtsystem
<i>0</i>	Anfangswert
<i>*</i>	Sättigungswert

Dimensionslose Kennzahlen

Definition	Bezeichnung
$Bi = k_f R / D_{eff}$	Biot-Zahl
$Pe = u_0 L / (\epsilon_{Fb} D_{ax})$	Peclet-Zahl
$Pe_P = u_0 d_K / (\epsilon_{Fb} D_{ax})$	Partikel-Peclet-Zahl
$Re_P = u_0 d_K / \nu$	Partikel-Reynolds-Zahl
$Re_R = n d_R^2 / \nu$	Rührer-Reynolds-Zahl
$Sc = \nu / D_0$	Schmidt-Zahl
$Sh = k_f d_K / D_0$	Sherwood-Zahl

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines vollständigen Verfahrens zur Synthese von enantiomerenreinen L-Aminosäuren durch Biotransformation mit immobilisierten Enzymen. Als Modellsystem wurde die zweistufige Hydrolyse von D,L-Benzylhydantoin über L-Carbamoylphenylalanin zu L-Phenylalanin gewählt. Die erste Stufe wurde durch das enantioselektive Enzym Hydantoinase katalysiert und die zweite durch das enantiospezifische Enzym L-Carbamoylase. In der Literatur ist dieser Syntheseweg auch als Hydantoinase-Verfahren bekannt. Verwendet wurden aufgereinigte und immobilisierte Enzyme aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747.

Ein Schwerpunkt war die Analyse und Modellierung des gegebenen Reaktionssystems, das die reversible Reaktion von D- bzw. L-Benzylhydantoin zu D- und L-Carbamoylphenylalanin, die irreversible Reaktion von L-Carbamoylphenylalanin zu L-Phenylalanin sowie die Racemisierung des Substrats Benzylhydantoin umfasste. Die Parameter in den enzymkinetischen Gleichungen wurden aus Anfangsreaktionsraten und zeitlichen Konzentrationsverläufen abgeschätzt. Ebenfalls untersucht wurden der Einfluss des pH-Werts auf die Reaktionsrate sowie die Enzymstabilität unter verschiedenen Bedingungen. Dabei wies die L-Carbamoylase eine deutlich geringere Halbwertszeit als die Hydantoinase auf. Der Vergleich von rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 mit einer Wildtyp-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 zeigte keine signifikanten Unterschiede, so dass der Ursprung des Enzyms keinen gravierenden Einfluss auf die Gestaltung des Verfahrens ausübte. Bezüglich der Wechselwirkungen zwischen den beiden hydrolytischen Reaktionen konnte eine geringfügige Inhibierung der Hydantoinase durch das Endprodukt L-Phenylalanin festgestellt werden, die so für ähnliche Enzyme noch nicht beschrieben wurde. Da in einer Versuchsanlage an poröse Partikel immobilisierte Enzyme Verwendung fanden, wurden die enzymkinetischen Modelle um Gleichungen für den externen Transport der Reaktanten an die Partikeloberfläche und den internen Transport in den Partikeln erweitert. Aus den Betriebsbedingungen in der Versuchsanlage ergab sich bezüglich des schneller umgesetzten Enantiomers L-Benzylhydantoin eine leichte Stofftransportlimitierung ($\eta = 0,96$), die jedoch keine Maßnahmen zur Optimierung des Immobilisats z.B. durch Verringerung des Partikeldurchmessers erforderte. Für D-Benzylhydantoin wurde hingegen keine Stofftransportlimitierung festgestellt. Die Racemisierung des Substrats Benzylhydantoin wurde mit zwei Modellen beschrieben, die sich in ihrem Detaillierungsgrad unterschieden. Während das erste Modell die Dissoziation des Benzylhydantoin berücksichtigte und die basenkatalysierte Racemisierung in wässriger Lösung von der Racemisierung an einem Ionenaustauscher differenzierte, vereinigte das zweite Modell die verschiedenen Mechanismen zu einer reversiblen Reaktion mit Hin- und Rückreaktion jeweils pseudo-erster Ordnung. Vorteilhaft war das vereinfachte Modell für Simulationen des Gesamtsystems, da so zahlreiche Bilanzgleichungen und die rechenintensive Lösung der (örtlich verteilten) Ionenaustausch- und Dissoziationsgleichgewichte entfielen. Wichtigstes Ergebnis des detaillierten Modells war die Beschleunigung der Racemisierung durch Verschiebung des pH-Werts, wobei der durch Katalyse am Ionenaustauscher erzielte Geschwindigkeitszuwachs im Vergleich zur sponta-

nen Reaktion exponentiell anstieg.

Auf der reaktionstechnischen Analyse bauten die Gestaltung einer Versuchsanlage im Labormaßstab und die Erstellung eines mathematischen Prozessmodells dieser Versuchsanlage auf. Mit Rücksicht auf die begrenzte Aktivität der Enzymimmobilisate und die geringe Löslichkeit des Benzylhydantoins wurde das Verfahren, welches drei Operationen umfasste, absatzweise betrieben: Auflösung von D,L-Benzylhydantoin in einem gerührten Membranreaktor, zweistufige enzymatische L-Phenylalanin Synthese in einem Festbettreaktor mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase sowie Racemisierung des nicht abreagierten Substrats D-Benzylhydantoin in einem zweiten mit starkem Anionenaustauscher gefüllten Festbettreaktor. Alle drei Apparate waren hintereinandergeschaltet und bildeten einen geschlossenen Kreislauf. Optional erfolgte eine nachgeschaltete Aufreinigung des Produkts L-Phenylalanin durch Elektrodialyse. Eine Variante zur kontinuierlichen Prozessführung wurde anhand von Simulationsstudien untersucht. Der Reaktionsfortschritt wurde offline mittels chiraler HPLC und online mit einer analytischen Methode erfasst, die polarimetrisch den optischen Drehwert und photometrisch die Absorption der Reaktionslösung bestimmte. Für die Untersuchungen zur Enzymkinetik erlaubte diese Methode die einfache Messung von Anfangsreaktionsraten sowie die Berechnung der Konzentrationen aller vier Reaktanten im ersten Hydantoinase-katalysierten Syntheseschritt.

Im Vorfeld zu den experimentellen Arbeiten an der Versuchsanlage - und später auch diese begleitend - wurde ein mathematisches Modell des gesamten Verfahrens erstellt und mit Versuchsdaten parametrisiert. Dieses Modell bildete die Auflösung von festem Benzylhydantoin in einem ideal durchmischten Membranreaktor, die enzymatische Umsetzung im ersten und anschließende Racemisierung im zweiten Festbettreaktor sowie die Rückführung in den Membranreaktor ab. Bezüglich der Festbettreaktoren wurden die Stoffbilanzen getrennt für das Hohlraumvolumen sowie die porösen Partikel der Schüttung aufgestellt. Verkoppelt waren sie durch den Stoffübergang an der Oberfläche eines jeden Partikels. Die Strömung im Hohlraumvolumen eines Festbettreaktors war neben der Konvektion durch Dispersion in axialer Richtung gekennzeichnet. In den porösen Partikeln katalysierten die an der inneren Oberfläche immobilisierten Enzyme die im vorangehenden beschriebenen Reaktionen. Es resultierten hauptsächlich partielle Differentialgleichungen, die mit einem finite Volumen Verfahren (TVD) örtlich diskretisiert und dem numerischen Integrator LIMEX gelöst wurden. Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Kinetiken erforderte das Gesamtsystem Isothermen zur Modellierung der Adsorption der Reaktanten an den Anionenaustauscher.

Da die vollständige Umsetzung des racemischen Substrats D,L-Benzylhydantoin zum enantiomerenreinen Produkt L-Phenylalanin wesentlich von der Racemisierung abhing, kam dieser Umlagerungsreaktion eine zentrale Bedeutung zu. Es zeigte sich, dass eine Steigerung der Produktausbeute eine überproportionale Erhöhung der Ionenaustauschermasse erforderte. Andererseits bedeutete die Erhöhung der Ionenaustauschermasse einen zunehmenden Verlust an Produkt, da es durch Bindung an den Ionenaustauscher in der Reaktionslösung abgereichert wurde. Bezüglich des theoretisch möglichen Enantiomerenüberschusses von 100 % bei vollständiger Umsetzung des race-

mischen Substrats erwies sich beim gegebenen pH-Wert auch mit maximaler Racemisierungsgeschwindigkeit die langsame Rückreaktion von D-Carbamoylphenylalanin zu D-Benzylhydantoin als limitierend, und es resultierte ein maximaler Enantiomerenüberschuss von 64 %. Simulationsergebnisse belegten den vernachlässigbaren Einfluss der Auflösungskinetik des Benzylhydantoin auf das Gesamtgeschehen. Bei Dosierung in einen unzureichend gerührten Membranreaktor bildeten sich jedoch aufgrund der schlechten Benetzbarkeit des Benzylhydantoinpulvers mit wässrigen Lösungen leicht größere Agglomerate, deren Auflösung viel Zeit beanspruchte.

Abstract

The aim of this work was to develop a complete process for the synthesis of optical pure L-amino acids by biotransformation with immobilized enzymes. Two-step enzymatic hydrolysis of D,L-benzylhydantoine via L-carbamoylphenylalanine to L-phenylalanine was employed as a model system. The first step was catalysed by an enantioselective hydantoinase and the second step by an enantiospecific L-carbamoylase. This synthesis is well known in literature as Hydantoinase-Process. Purified and immobilized enzymes from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 were used.

A main focus was to analyze and model the given reaction system. It consists of a reversible conversion of D- and L-benzylhydantoine to D- and L-carbamoylphenylalanine, respectively, an irreversible conversion of L-carbamoylphenylalanine to L-phenylalanine and the racemization of the substrate benzylhydantoine. Parameters appearing in the kinetic rate equations were identified from experimentally obtained initial rates and time courses of concentration. The effect of pH on reaction rates and enzyme stability under various conditions were studied as well. It appeared that half time of L-carbamoylase as compared with hydantoinase was noticeably lower. A comparison of recombinant hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 with a wild type hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 did not show significant differences so that the origin of enzymes did not exert serious influence on the design of the process. With respect to the interactions between both hydrolytic reactions a negligible inhibition of hydantoinase by the final product L-phenylalanine was observed which has not been reported for similar enzymes previously. Immobilized enzymes were utilized with a bench-scale pilot plant. Additional equations for external mass transfer at the surface of a particle and internal mass transport in a porous particle expanded the capability of the kinetic model to immobilized enzymes. Under operation conditions of the bench-scale pilot plant a slight mass transfer limitation ($\eta = 0,96$) was found regarding the faster converted enantiomer L-benzylhydantoine. Due to low severity no measures were required to improve the catalyst e.g. by scale-down of the particle diameter. Conversion of D-benzylhydantoine on the other hand was not affected by mass transport limitations. Racemization of substrate benzylhydantoine was described with two models of different complexity. The first model included dissociation of benzylhydantoine and distinguished between general base catalytic racemization in aqueous solution and racemization at an ion exchanger. And the second model combined these different mechanisms to a single reversible reaction with forward and back reaction of pseudo-first order. The simplified model was advantageous for simulations of the overall process because the number of differential equations was reduced and no (spatial distributed) ion and dissociation balances had to be solved. An important result of simulations with the detailed model was an acceleration of the racemization rate by shifting the pH to higher values. In doing so the contribution of the catalytic ion exchanger exceeded the contribution of spontaneous racemization in an exponential way.

Both design of a bench-scale pilot plant and its mathematical modelling were based on the above-

mentioned analysis of the reaction system. Considering low activities of the immobilized enzymes and low solubility of benzylhydantoine batch operation of the process was favourable. It consisted of three units: dissolution of D,L-benzylhydantoine in a stirred membrane reactor, two-step enzymatic synthesis of L-phenylalanine in a fixed-bed reactor packed with immobilized hydantoinase and L-carbamoylase and racemization of non-converted substrate D-benzylhydantoine in a second fixed-bed reactor packed with a strong anion exchanger. All three units were connected in series and formed a closed cycle. Following the synthesis, an electro dialysis module was optionally used for purification of the product L-phenylalanine. A variant for continuous operation was examined on the basis of simulation studies. The course of reaction was analyzed off-line by means of chiral HPLC and on-line using an analytic method that determined polarimetrically the optical rotation and photometrically the absorption of the reaction solution. Regarding kinetic studies of enzymes, the latter method allowed for simple measurement of initial reaction rates as well as calculation of concentrations of all four reactants involved in the hydantoinase catalyzed step.

A mathematical model of the complete process was established prior to experimental work with the bench-scale pilot plant. It was modified together with the pilot plant and parameterized with experimental data. This model included the dissolution of solid benzylhydantoine in an ideally mixed membrane reactor, the enzymatic conversion in the first and following racemization in the second fixed bed reactor as well as the feedback into the membrane reactor. Concerning the fixed bed reactors the material balances were set up separately for bulk-fluid phase and particle phase. Both phases were coupled by the mass transfer at the surface of each particle. The flow through the void volume of a fixed bed reactor was characterized by convection and dispersion in axial direction. Immobilized enzymes at the internal surface of the porous particles catalyzed the reactions explained above. Basically this model consisted of partial differential equations which were spatially discretized using a finite volumes method (TVD) and solved with the numeric integrator LIMEX. Additionally to the kinetic model described so far the overall system required isotherms for modelling the adsorption of the reactants to the anion exchanger.

Since complete conversion of racemic substrate D, L-benzylhydantoine to optically pure product L-phenylalanine depended substantially on racemization, this rearrangement reaction was of central importance. It was shown that maximizing the product yield required a disproportionately high increase of the ion exchanger mass. On the other hand the increase of ion exchanger mass meant a rising loss of product because it was depleted in the reaction solution by binding to the ion exchanger. Concerning the theoretically possible enantiomeric excess of 100 % after total conversion of the racemic substrate the slow back reaction from D-carbamoylphenylalanine to D-benzylhydantoine was proved as limiting at the given pH value also with maximum racemization rate, and it resulted a maximum enantiomeric excess of 64 %. Simulation results showed the negligible influence of dissolution kinetics of benzylhydantoine on the total reaction. With dosage into an insufficiently agitated membrane reactor larger agglomerates of benzylhydantoine were formed easily due to the bad wettability of the benzylhydantoine powder with aqueous solutions. And dissolution of these agglomerates required much time.

1 Einleitung

Etablierte Verfahren zur industriellen Herstellung von α -Aminosäuren sind die Proteinhydrolyse und die Fermentation von Mikroorganismen mit geeigneter Syntheseleistung [51]. Bedingt durch die Nutzung natürlicher Ressourcen und Synthesewege liegt ihr Schwerpunkt auf der Gewinnung *proteinogener* Aminosäuren, bei denen es sich entsprechend ihrem Vorkommen in der Natur um die L-Enantiomere dieser chiralen Moleküle handelt. Ungewöhnliche D-Aminosäuren aus Bakterien (enthalten in Zellwänden und Peptidantibiotika) zählen nicht zum Produktspektrum der genannten Verfahren, weil sie z.B. fermentativ nur mit geringer optischer Reinheit und schlechter Produktivität zugänglich sind [104].

Aminosäuren werden in der Tierernährung als Zusatzstoffe von Futtermitteln, in der Lebensmitteltechnologie als Würzstoffe, Geschmacksverstärker (L-Glutamat) und Bestandteil von Süßstoffen (L-Aspartat, L-Phenylalanin) sowie der Diätetik, der Medizin (Infusionslösungen) und der Kosmetik eingesetzt.

Chemische Synthesen, wie die industrielle Produktion von achiralem Glycin und D,L-Methionin, zählen ebenfalls zu den etablierten Verfahren und eignen sich prinzipiell auch zur Darstellung *seltener* oder *unnatürlicher* Aminosäuren für pharmazeutische Anwendungen, liefern jedoch zu meist die zunehmend unerwünschten Racemate [87]. Der technische Einsatz chiraler Katalysatoren scheitert hingegen häufig an geringen Ausbeuten und hohen Kosten [104].

Einen alternativen Weg der Synthese natürlicher und unnatürlicher D- oder L- Aminosäuren bieten Biotransformationen mit ruhenden Zellen, gelösten oder immobilisierten Enzymen. In industriellem Maßstab katalysieren Aminoacylasen und Hydantoinasen die Umsetzung verschiedener Aminosäure-Vorstufen. Diese Umsetzungen erfolgen meist *enantiospezifisch*. Zielverbindungen sind L-Methionin, L-Valin und L-Phenylalanin (Fa. Tanabe, Japan und Degussa, Deutschland) mit dem Aminoacylase-Verfahren sowie die unnatürlichen Aminosäuren D-Phenylglycin (Fa. Kanegafuchi, Japan) und D-p-Hydroxyphenylglycin (Fa. Recordati, Italien) mit dem Hydantoinase-Verfahren [92, 5, 82, 81]. Verglichen mit Hydrolyse und Fermentation, die einen erheblichen Aufwand zur Abtrennung der Aminosäuren durch Extraktion, Fällung oder Umkristallisation erfordern, ist die Aufreinigung nach einer Biotransformation einfacher, da insbesondere beim Einsatz isolierter Enzymen eine wohl definierte Produktlösung vorliegt.

Das Hydantoinase-Verfahren erlaubt je nach Wahl der eingesetzten Enzyme die Umsetzung racemischer 5-monosubstituierter Hydantoine zu D- oder L- Aminosäuren. Die Reaktion läuft in zwei aufeinanderfolgenden Schritten ab. Mit enantiospezifischer Hydantoinase, welche nur ein Enantiomer des racemischen Hydantoins als Substrats akzeptiert, entsteht durch hydrolytische Öffnung des Hydantoinrings zunächst enantiomerenreine Carbamoylaminosäure als Zwischenprodukt. Im zweiten Schritt, der chemisch oder enzymatisch mit einer (enantiospezifischen) Carbamoylase durchgeführt wird, erfolgt die Decarbamoylierung des Zwischenprodukts zur enantiomerenreinen Aminosäure. Eine interessante Eigenschaft der Hydantoine ist ihre spontane Racemisierung bei

basischen pH-Werten. Ist die Racemisierungsgeschwindigkeit unter Reaktionsbedingungen ausreichend hoch, so ermöglicht das Hydantoinase-Verfahren die vollständige Umsetzung des racemischen Substrats zu enantiomerenreiner Aminosäure. Entwicklungsmöglichkeiten des Verfahrens bietet u.a. die enzymatische Beschleunigung der Racemisierungsgeschwindigkeit mit Hilfe einer Hydantoin-Racemase [95, 97].

Eingeteilt nach ihrer Enantiospezifität können drei Klassen, nämlich D-, L- und unspezifische Hydantoinasen unterschieden werden [86]. Die bisher untersuchten Carbamoylasen hingegen sind eindeutig D- oder L-spezifisch. Wie bei der industriellen Anwendung, so finden sich auch in der Literatur überwiegend D-Hydantoinase Systeme zur Gewinnung von D-Aminosäuren, welche als Komponenten für Antibiotika, pharmazeutische Wirkstoffe oder Pestizide vorgesehen sind.

Neben *Flavobacterium* sp. AJ-3940 [107], *Bacillus brevis* AJ-12299 [105] und *Pseudomonas* sp. NS671 [35] gehören die Bodenbakterien *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 und DSM 3747 zu den wenigen Mikroorganismen, deren Mechanismus der Produktion von L-Aminosäuren aus Hydantoinen untersucht und in der Literatur beschrieben wurde. Gemeinsam ist den aus diesen Mikroorganismen isolierten Hydantoinasen, dass sie im Unterschied zu den D-Hydantoinasen ein weniger breites Substratspektrum aufweisen und racemisches Hydantoin lediglich *enantioselektiv* hydrolysieren. Ein Substratenantiomer wird also bevorzugt, d.h. mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit als das andere Enantiomer, umgesetzt. Dabei kann die Enantioselektivität in Abhängigkeit des Substrats vom L- zum D-Enantiomer wechseln [107], z.B. setzen die Hydantoinasen aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 und DSM 3747 D,L-Benzylhydantoin L-selektiv und D,L-Methylthioethylhydantoin D-selektiv um [57, 93].

Einschließlich seiner spontanen Racemisierung ergab sich für das Substrat D,L-Benzylhydantoin und die Enzyme aus *Arthrobacter aurescens*, welche in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem dienten, das auf einer Untersuchung von Yokozeki et al. [107] beruhende Reaktionsschema in Abb. 1. Es veranschaulicht die Notwendigkeit einer L-spezifischen Carbamoylase, da mit den L-selektiven Hydantoinasen andernfalls keine enantiomerenreinen L-Aminosäuren herzustellen sind.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit waren die reaktionstechnische Analyse und Modellierung des in Abb. 1 dargestellten Reaktionssystems. Zur Orientierung geben die Tabellen 1 und 2 einen Überblick über Veröffentlichungen aus den Jahren 1987 bis 2002, die sich mit dem Mechanismus bzw. der Kinetik des Hydantoinase-Verfahrens befassen. Tab. 1 zeigt, welche der fünf Teilsysteme „Stoffumsetzung durch Hydantoinase“, „Stoffumsetzung durch Carbamoylase“, „Racemisierung des Substrats“, „Auflösung des gegebenenfalls als Feststoff vorgelegten Substrats“ sowie „Transport der Reaktanten durch technische oder biologische Membranen“ berücksichtigt wurden und listet exemplarisch einige reaktionstechnische Parameter auf. In Tab. 2 sind ergänzend die verwendeten Biokatalysatoren und Substrate aufgeführt. Verglichen mit der Gesamtzahl von mehr als 130 Veröffentlichungen im gleichen Zeitraum zum übergeordneten Stichwort Hydantoinase, bedeuten die 13 zitierten Arbeiten, dass reaktionstechnische Fragestellungen neben den mikrobiologischen, biochemischen und genetischen Untersuchungen eher am Rande des Interesses standen.

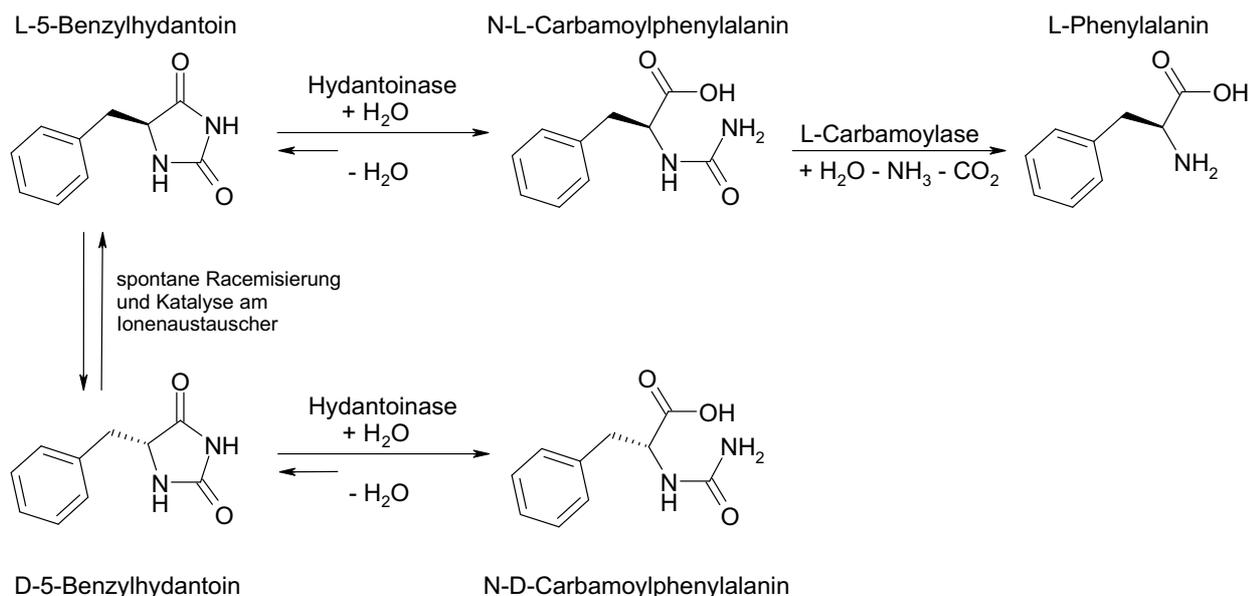


Abbildung 1: Synthese von D,L-Carbamoylphenylalanin aus D,L-Benzylhydantoin durch hydrolytische Öffnung des Hydantoinrings mit L-selektiver Hydantoinase. Im zweiten Schritt katalysiert L-spezifische Carbamoylase die Hydrolyse der Carbamoylgruppe des L-Carbamoylphenylalanins, und es entsteht L-Phenylalanin. Die Enantiomere des Substrats Benzylhydantoin racemisieren im basischen Milieu spontan.

Den selektiven bzw. L-spezifischen Hydantoinasen, zu denen auch die in dieser Arbeit verwendete Hydantoinase zählt, widmeten sich bisher vier Autoren (Einträge Nr. 1 bis 4 der Tabellen 1 und 2), ohne jedoch sämtliche Parameter der im übrigen teilweise unvollständigen kinetischen Modelle bestimmt zu haben. Gegenstand der weiteren Arbeiten sind D-spezifische Hydantoinasen, zumeist in Verbindung mit dem Substrat D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin. Enantiospezifische Hydantoinasen ermöglichen eine einfachere enzymkinetische Modellierung, da nur ein Enantiomer der Carbamoylaminosäure als Zwischenprodukt entsteht, ohne Bildung des anderen Enantiomers als Nebenprodukt.

Die vom Substrat (und pH-Wert) abhängige Reversibilität der Hydantoinase-katalysierten Reaktion bezogen drei Autoren (Nr. 1, 3 und 8) in das kinetische Modell ein, wohingegen die anderen zitierten Publikationen irreversible Reaktionen annehmen. Diese Vereinfachung ist im Zusammenhang mit enantioselektiven Hydantoinasen nicht möglich, da eine korrekte Bilanzierung der als (unerwünschtes) Nebenprodukt erhaltenen Carbamoylaminosäure (D-Carbamoylphenylalanin in Abb. 1) die Kenntnis des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen Hydantoin und eben dieser Carbamoylaminosäure voraussetzt.

Da der zweite Schritt des Hydantoinase-Verfahrens ursprünglich meist chemisch und nicht enzymatisch realisiert wurde, sind kinetische Parameter der Carbamoylase nur in sieben der 13 Arbeiten (Nr. 1, 2, 5, 6, 10, 11 und 13) angegeben, und allein K. Yokozeki et al. sowie A. Yamashiro et al. (Nr. 1 und 2) charakterisierten eine L-Carbamoylase.

Ein einfaches kinetisches Modell der Racemisierung inklusive Parametern gibt es in fünf Untersuchungen (Nr. 8, 9, 10, 12 und 13), die ausnahmslos das Substrat D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin betreffen, welches hinsichtlich der Reaktionsführung den Vorteil besitzt, dass es aufgrund geringer Halbwertszeiten weder chemische (Ionenaustauscher) noch enzymatische (Racemase) Katalyse erfordert.

Der Literaturüberblick verdeutlicht den Aufwand, sämtliche Parameter insbesondere der komplexeren Modelle zu bestimmen. So griffen z.B. C.-K. Lee et al. (Nr. 10) auf enzymkinetische Parameter zurück, die zuvor für einen anderen Mikroorganismus bestimmt worden waren [42], und kombinierten diese mit eigenen Ergebnissen zur Racemisierung. G.-J. Kim et al. (Nr. 11) übernahmen eine einzelne Inhibitionskonstante aus einer Arbeit von Olivieri et al. [63]. Und die Parameter zum Stofftransport durch biologische Membranen schätzten alle Autoren (Nr. 6, 10, 12 und 13) ohne gesonderte Experimente gemeinsam mit enzymkinetischen Daten ab. Die aus der Literatur bekannte Problematik der Identifizierung von Michaelis-Menten Konstanten [26] zeigte sich auch bei C.-K. Lee et al., die für die gleiche Hydantoinase unter identischen Reaktionsbedingungen zwei deutlich verschiedene Michaelis-Menten Konstanten veröffentlichten (Nr. 7 und 9).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass alle relevanten Teilsysteme einschließlich kinetischer Parameter nur von J.-H. Park et al. (Nr. 13) beschrieben wurden. Wesentliche Unterschiede zwischen dem Modellsystem dieser Arbeit und demjenigen von J.-H. Park et al. [64] bestehen in den folgenden Punkten:

- Hydantoinase war lediglich enantioselektiv.
- Bildung des Zwischenprodukts war reversibel.
- Die langsame Racemisierung des Substrats (Benzylhydantoin: $t_{1/2} = 7$ h, p-Hydroxyphenylhydantoin: $t_{1/2} = 0,9$ h) erforderte eine Beschleunigung durch heterogene Katalyse am Ionenaustauscher.
- Die geringe Löslichkeit des Substrats (Benzylhydantoin: 8,6 mM, p-Hydroxyphenylhydantoin: 40 mM) reduzierte die Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute).

Vorteile hinsichtlich der Gestaltung des Prozesses bereitete der Umstand, dass

- die L-Hydantoinase anders als jene der Arbeiten Nr. 2 und 4 keinen Cofaktor benötigte.

Mit einem reaktionstechnischen Modell als Grundlage war es das Ziel dieser Arbeit, am Beispiel des Benzylhydantoin durch Verzahnung eines mathematischen Prozessmodells mit experimentellen Untersuchungen ein vollständiges Verfahren zur Synthese von L-Aminosäuren zu entwickeln.

	K. Yokozeki 1987	A. Yamashiro 1988	D. Vökel 1995	T. Ishikawa 1997	K. Yokozeki 1987	L. Tranchino 1990	C.-K. Lee 1996	C.-K. Lee 1999	C.-K. Lee 2001	C.-K. Lee 2001	G.-J. Kim 1995	D.-C. Lee 1999	J.-H. Park 2002	diese Arbeit
	[107]	[105]	[91]	[35]	[106]	[90]	[49]	[46]	[47]	[48]	[41, 42]	[50]	[64]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
(1) Hydantoïnase														
enantiospezifisch oder enantioselektiv	-	L	-	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	-
- $K_{m, L-Hyd}^{Hy}$ [mM]	L	-	D	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
- $K_{m, D-Hyd}^{Hy}$ [mM]	2,67	1,0	25	n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,58
irreversible Reaktion oder reversible Reaktion	n.b.	-	11	n.b.	5,6	50	71,6	n.b.	35,8	1,28 [42]	1,28	23	10,3	0,64
- K_{eq}^{Hy} [-]	-	ja	-	ja	ja	ja	ja	-	ja	ja	ja	ja	ja	-
Inhibitor	ja	-	ja	-	-	-	-	ja	-	-	-	-	-	ja
Inaktivierung: $t_{1/2}$ [h]	n.b.	-	n.b.	-	-	-	-	24	-	-	-	-	-	27,4
(2) Carbamoylase	-	-	-	-	-	19	20,7	-	-	-	-	25,3	61,9	7
enantiospezifisch	L	L	L	L	D	D	-	-	-	D	D	-	D	L
- $K_{m, CAS}^{Ca}$ [mM]	0,82	2,0	n.b.	n.b.	1,43	1	-	-	-	3,56 [42]	3,56	-	1,86	0,89
Inhibitor $K_{I, Ammonium}^{Ca}$ [mM]	-	-	-	-	-	40	-	-	-	13 [63]	13 [63]	-	8,0	-
Inaktivierung: $t_{1/2}$ [h]	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-	8,7 [42]	8,7	-	2,4	0,9
(3) Racemisierung	spont	spont	enz	enz	spont	spont	spont	spont	spont	spont	spont	spont	spont	chem
$t_{1/2}$ [min]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	16,3	4,8	16,5	n.b.	4,8	27,5	420
(4) Auflösung von Hydantoin	-	-	-	-	-	-	ja	ja	ja	-	-	ja	ja	ja
Modellparameter	-	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	ja	-	-	ja	ja	ja
(5) Transport durch Membranen	-	-	-	-	-	ja	-	-	ja	ja	-	ja	ja	-
Reaktionsbedingungen														
- Temperatur [°C]	30	50	35	40	30	40	50	40	50	40	30	45	45	37
- pH	8,5	8,0	8,0	8,0	8,5	7,8	8,5	8,5	8,5	8,0	8,0	8,5	8,0	8,5

Tabelle 1: Überblick über Veröffentlichungen zur reaktionstechnischen Analyse und Modellierung des Hydantoïnase-Verfahrens aus den Jahren 1987 bis 2002 (*n.b.*: nicht bestimmt, *spont*: spontane Racemisierung, *enz*: enzymkatalysiert, *chem*: Katalyse am Ionenaustauscher).

Autor	Biokatalysator	Substrat
1 K. Yokozeki et al. [107], 1987	aufgereinigte Hydantoinase und L-Carbamoylase aus <i>Flavobacterium</i> sp. AJ-3940	D,L-Benzylhydantoin
2 A. Yamashiro et al. [105], 1988	Rohextrakt aus <i>Bacillus brevis</i> AJ-12299, L-Hydantoinase benötigte Cofaktor ATP	D,L-Isopropylhydantoin
3 D. Völkel und F. Wagner [91], 1995	ruhende Zellen und aufgereinigte Hydantoinase sowie L-Carbamoylase aus <i>Arthrobacter</i> sp. DSM 7330	D,L-Methylthioethylhydantoin
4 T. Ishikawa et al. [35], 1997	ruhende Zellen und aufgereinigte Enzyme, Hydantoinase und L-Carbamoylase aus <i>Pseudomonas</i> sp. NS671 rekombinant in <i>E. coli</i> , Hydantoinase benötigte Cofaktor ATP	D,L-Methylthioethylhydantoin
5 K. Yokozeki und K. Kubota [106], 1987	aufgereinigte D-Hydantoinase und D-Carbamoylase aus <i>Pseudomonas</i> sp. AJ-11220	D,L-Methylthioethylhydantoin
6 L. Tranchino und F. Melle [90], 1990, (Olivieri et al. [63], 1981)	ruhende Zellen <i>Agrobacterium radiobacter</i> (aktualisiert zu <i>tumefaciens</i>) NRRL B 11291	D,L-Isopropylhydantoin
7 C.-K. Lee und K.-C. Lin [49], 1996	immobilisierte, rekombinante D-Hydantoinase von Boehringer Mannheim	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
8 C.-K. Lee und C.-H. Fan [46], 1999	immobilisierte, rekombinante D-Hydantoinase von Boehringer Mannheim	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
9 C.-K. Lee et al. [47], 2001	immobilisierte, rekombinante D-Hydantoinase von Boehringer Mannheim	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
10 C.-K. Lee et al. [48], 2001	ruhende Zellen <i>Agrobacterium radiobacter</i> (aktualisiert zu <i>tumefaciens</i>) NRRL B 11291	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
11 G.-J. Kim und H.-S. Kim [41, 42], 1995	aufgereinigte D-Hydantoinase und D-Carbamoylase aus <i>Agrobacterium</i> sp. I-671	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
12 D.-C. Lee, H.-S. Kim et al. [50], 1999	ruhende Zellen und aufgereinigtes Enzym, D-Hydantoinase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> SD-1 rekombinant in <i>E. coli</i>	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
13 J.-H. Park, H.-S. Kim et al. [64], 2002	ruhende Zellen, D-Hydantoinase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> SD-1 und D-Carbamoylase aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B11291 rekombinant in <i>E. coli</i>	D,L-p-Hydroxyphenylhydantoin
14 diese Arbeit	aufgereinigte und immobilisierte Enzyme aus <i>Arthrobacter aureescens</i> DSM 3747 und rekombinant in <i>E. coli</i> W3110	D,L-Benzylhydantoin

Tabelle 2: Ergänzung zu Tabelle 1.

2 Prozessbeschreibung

2.1 Grundlagen

Einige Eigenschaften des in der Einleitung vorgestellten Reaktionssystems zur asymmetrischen Synthese von L-Phenylalanin aus D,L-Benzylhydantoin mit Hilfe L-selektiver Hydantoinase und L-spezifischer Carbamoylase nahmen besonderen Einfluß auf die Gestaltung des Verfahrens (Abb. 2, S. 26) und werden im folgenden kurz erläutert.

Angesichts der *raschen Enzyminaktivierung* mit Halbwertszeiten der Carbamoylase im Bereich weniger Stunden (Tab. 1, S. 23) wurden die aufgereinigten Enzyme am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart von K. Ragnitz [69] immobilisiert und erfolgreich stabilisiert. Jedoch verhinderte die begrenzte Aktivität der Immobilisate (Abschnitt 4.4) die Realisierung eines kontinuierlichen Verfahrens ohne Rückführungen. Auch die *geringe Löslichkeit des Substrats* sprach für ein absatzweises Verfahren, um so die Produktivität durch kontinuierliche Substratnachlösung während der Reaktion anzuheben. Aus diesen Gründen wurde eine absatzweise betriebene Versuchsanlage im Labor aufgebaut und eine Variante zur kontinuierlichen Prozessführung mit interner Rückführung anhand von Simulationen untersucht (Abschnitt 7.3).

Aufgrund *ähnlicher Eigenschaften der beiden immobilisierten Enzyme* hinsichtlich pH- und Temperaturoptimum sowie Inaktivierung [69, 23] konnten sie in *einem* Festbettreaktor zusammengebracht werden. Für die enzymkatalysierten Folgereaktionen bot diese Lösung den Vorteil, dass die irreversible zweite Reaktion (Carbamoylase) durch räumliche Nähe einen unmittelbaren Einfluß auf das Gleichgewicht des vorgelagerten ersten Schritts (Hydantoinase) zugunsten der Produktbildung ausübte. Wechselseitige inhibitorischer Effekte der beiden Reaktionen (Abschnitte 5.1.3.4 und 5.2.1) waren geringfügig.

Die *langsame spontane Racemisierung* des Benzylhydantoin identifizierten K. Yokozeki et al. [107] als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, sie erforderte daher eine katalytische Beschleunigung. Zu bevorzugen wäre der Einsatz einer Hydantoin-Racemase, die ebenfalls in *Arthrobacter aurescens* neben Hydantoinase und Carbamoylase vorliegt [97]. Weil die am Institut für Bioverfahrenstechnik durchgeführten Versuche zur Immobilisierung der Racemase allerdings fehlschlugen [75], wurde statt dessen der katalytische Effekt des lokal basischen Milieus eines Anionenaustauscher genutzt. Aus reaktionstechnischen Gründen war für die Racemisierungsreaktion annähernd erster Ordnung ein kontinuierlich durchströmter Festbettreaktor der geeignete Apparat. Das Einbringen von Anionenaustauscher und Enzymimmobilisat in verschiedene Apparate ermöglichte sowohl eine einfache Regenerierung des Ionenaustauschers als auch den unkomplizierten Austausch inaktivierter Enzyme.

Zur Abtrennung des infolge L-selektiver Hydantoinase gebildeten Nebenprodukts D-Carbamoylphenylalanin wurde in Kooperation mit dem Institut für Chemische Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart von F. Sarfert [73, 74] eine der Reaktion nachgeschaltete Elektrodialyse (Abschnitt

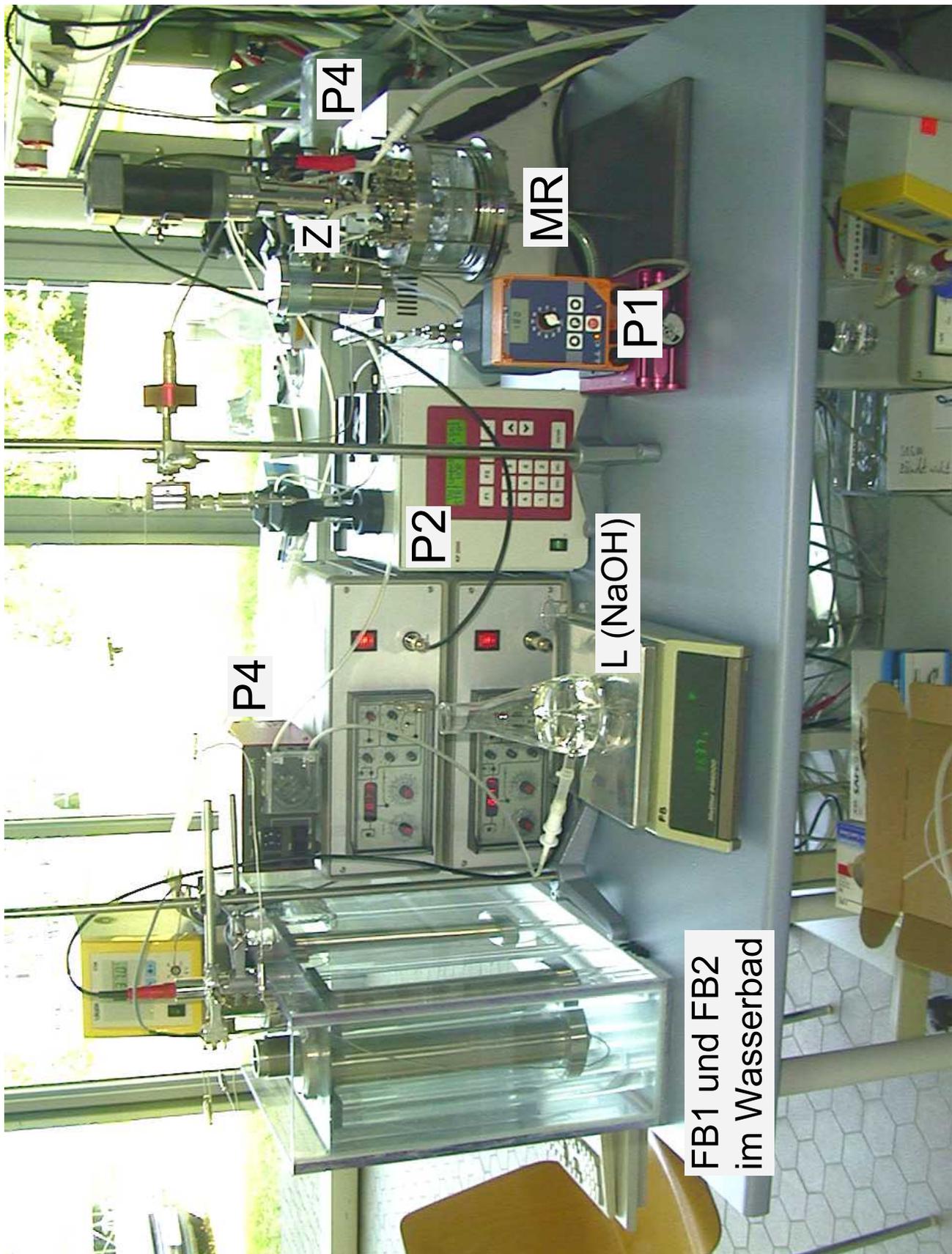


Abbildung 3: Fotografie der Versuchsanlage. Die Bezeichnungen entsprechen Abb. 2.

weise betriebenen Verfahren vereinigt: Auflösung von D,L-Benzylhydantoin (MR), zweistufige enzymatische L-Phenylalanin Synthese (FB1) und Racemisierung des nicht abreagierten Substrats am Anionenaustauscher (FB2).

Zu Beginn einiger Umsetzungen lag im Membranreaktor MR ungelöstes D,L-Benzylhydantoin mit einer Feststoffkonzentration vor, die ein Vielfaches seiner Löslichkeit betrug. Um Kristallisation des stöchiometrisch gebildeten Produkts L-Phenylalanin in den Festbettreaktoren zu verhindern, war die maximale Feststoffkonzentration jedoch immer kleiner als die um den Faktor 20 höhere Produktlöslichkeit. Feste D,L-Benzylhydantoin Partikel wurden von der Membran zurückgehalten und lösten sich kontinuierlich während der Reaktion. Eine Membranpumpe P1 mit hoher Saugleistung (gamma G/4b, Typ 0806, Prominent, Heidelberg) saugte die Reaktionslösung unter der Membran ab und förderte sie in einen Zwischenbehälter Z, der über einen Überlauf mit dem Membranreaktor verbunden war. Am Zwischenbehälter begannen zwei Kreisläufe, die ebenfalls in den Membranreaktor zurückgeführt wurden.

Im ersten Kreislauf befanden sich zwei Festbettreaktoren, wobei der erste (FB1) ein Mischbett aus immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase (Abschnitt 4.4) beinhaltete und der zweite (FB2) mit dem starken Anionenaustauscher Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech, Freiburg) gepackt war. Die Reaktionslösung wurde von oben nach unten durch die Festbettreaktoren gepumpt und der Volumenstrom mit einem Durchflussmessgerät (LFM 10 mit Doppelringkolbenpendel, 0,3–15 L/h, Küppers Elektromechanik, Karlsfeld) überwacht. Zur Temperierung waren die Festbettreaktoren in einem Wasserbad installiert, dessen Einhängethermostat (Lauda, Lauda-Königshofen) auch den Glasdoppelmantel des Membranreaktors auf 37 °C beheizte. Ein Pt-100-Element überwachte die Badtemperatur.

Der zweite Kreislauf diente zur kontinuierlichen Erfassung des optischen Drehwerts und der Absorption als online-Messgrößen, wozu die Durchflussküvetten eines Polarimeters und eines Spektralphotometers (Abschnitt 4.5.3.1) hintereinander geschaltet waren ($Q = 0,85$ L/h). Ferner befand sich am Ablauf des Photometers ein Probennahmeverventil V für die offline-Analytik mittels chiraler HPLC (Abschnitt 4.5.1). Die Umwälzung in den beiden Kreisläufen erfolgte jeweils mit einer Schrittmotor-gesteuerten Doppelkolbendosierpumpe P2 bzw. P3 (KP2000, Desaga, Heidelberg).

Alle Apparate und Geräte waren überwiegend durch 1/16" Edelstahl-Kapillaren mit 1 mm Innendurchmesser, wie sie in der HPLC-Technik üblich sind, untereinander verbunden. Flexible Verbindungen waren in entsprechenden Teflonschläuchen ausgeführt.

Zur Vermeidung von Inaktivierungen der Carbamoylase durch Oxidation [67] diente die Stickstoff-Begasung des Membranreaktors mittels Sintermetallfritte. Bei Verwendung einer ungepufferten Reaktionslösung wurde der pH-Wert im Membranreaktor von einem pH-Regler (pH-Elektroden 405 DPAS-SC-K8S/120, Mettler-Toledo, Gießen) durch Titration mit 2 M NaOH-Lösung konstant gehalten und derjenige im Ablauf des ersten Festbettreaktors (FB1) registriert. Der Verbrauch an NaOH ergab sich durch Wägung (PM 6100, Mettler, Gießen) der Laugen-Vorlage (L). Alle online-Messgrößen (optische Rotation, Absorption, Temperatur im Wasserbad, pH-Werte, Volumenstrom,

Masse der NaOH-Lösung) wurden mit einem Prozessleitsystem (Visual Designer, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen bzw. rho-Prozess Control Pro, rhothron, Bexbach-Frankholz) kontinuierlich erfasst und abgespeichert.

2.2.1 Membranreaktor

Der verwendete Membranreaktor entsprach dem in der Arbeit von M. Indlekofer [34, 33] beschriebenen Reaktor. Er wurde in Form eines Rührkessels mit einem in den Boden integrierten Flachmembranmodul entworfen. Sämtliche produktberührte Bauteile waren in Edelstahl bzw. Glas ausgeführt. Zur Durchmischung seines Inhalts besaß der Reaktor einen elektrisch angetriebenen und elektronisch geregelten (45 Watt Motor, Maximaldrehzahl 3000 min^{-1} , Lenze, Hameln) Scheibenrührer (Durchmesser 40 mm). Die Temperierung des Reaktionsraums, der Reaktionsvolumina von 100 bis 400 mL zuließ, erfolgte über einen Glasdoppelmantel, welcher mit einem thermostatisierten Wasserbad verbunden war. Die Membran (Durchmesser 90 mm) wurde von einer PTFE-beschichteten Siebplatte (Millipore, Eschborn) gestützt und mittels einer austauschbaren Membranhalterung in den Reaktor eingebaut.

Zur Rückhaltung der ungelösten Benzylhydantoinpartikel im Reaktor wurde eine Mikrofiltrationsmembran (Micro PES 2F, Akzo Nobel, Wuppertal) aus Polyethersulfon mit $0,2 \mu\text{m}$ Porendurchmesser und einem spezifischen Wasserfluss von $35 \text{ ml}/(\text{min cm}^2 \text{ bar})$ verwendet.

2.2.2 Festbettreaktoren

Als Festbettreaktoren standen neben kommerziellen Säulen mit 1,6 cm Innendurchmesser und einer variablen Betthöhe bis zu 17 cm (XK16, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) auch selbstgebaute Apparate zur Verfügung. Der in Abb. 4 dargestellte Selbstbau-Festbettreaktor basierte auf einem beidseitig mit Deckeln verschraubbaren Edelstahlrohr (Linnemann, Tübingen) mit 5 cm Innendurchmesser und 29 cm Länge. Ein in die Deckel integriertes Zu- und Ablaufsystem verteilte die Flüssigkeit mit Hilfe einer 1 cm dicken, hochporösen Edelmetall-Sinterplatte (SIKA-R-20, Krebsöge, Radevormwald) gleichmäßig über die Schüttung, welche mit einer ebensolchen Platte am Ablauf gestützt wurde. Durch Kombination eines Gewindebolzens mit verschiedenen langen Distanzhülsen war der Zulauf so einstellbar, dass beliebige Betthöhen bis maximal 22 cm realisiert werden konnten.

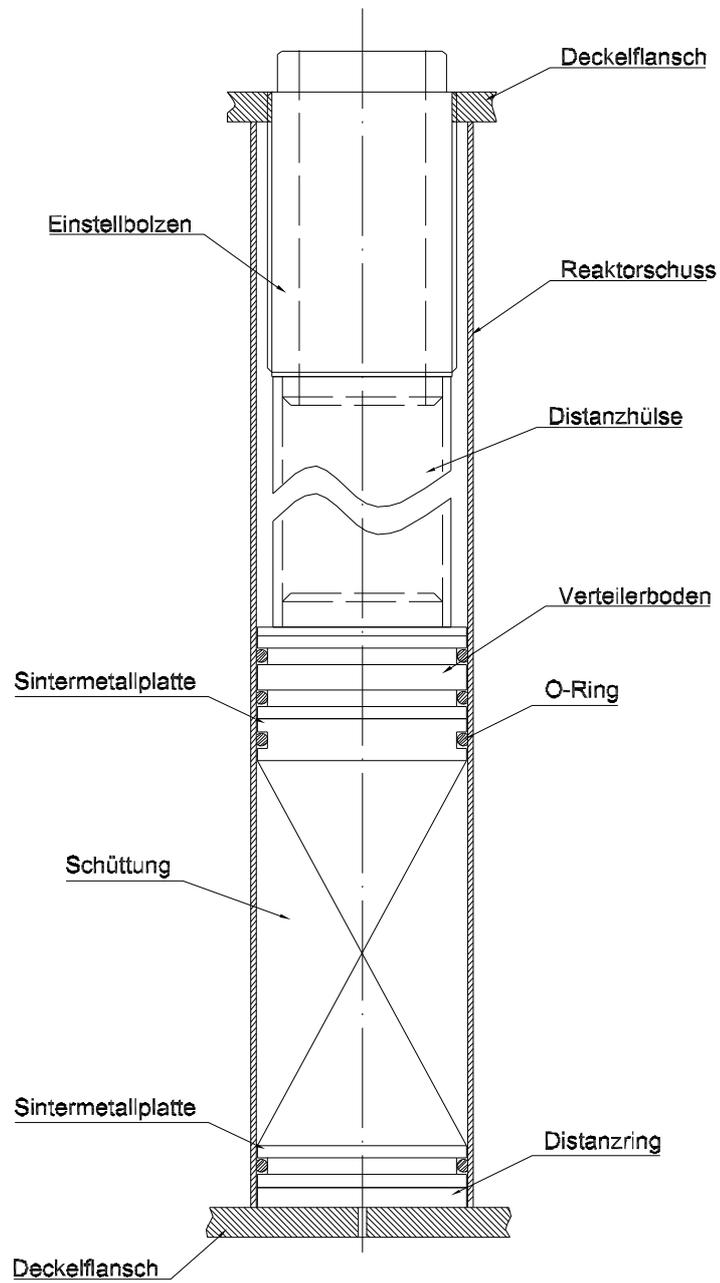


Abbildung 4: Konstruktionsskizze des Selbstbau-Festbettreaktors.

3 Anlagenmodellierung

Die experimentellen Arbeiten mit der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Versuchsanlage wurden durch die detaillierte physikalische Modellierung einzelner Anlagenkomponenten bis hin zum Gesamtsystem begleitet. Für die dynamische Simulation dieser Systeme wurde ein in Fortran 77 realisiertes Programm entwickelt, das aufgrund seines modularen Aufbaus die Implementierung beliebiger Reaktionskinetiken und Adsorptionsisothermen ermöglicht.

3.1 Gesamtsystem aus mehreren verschalteten Apparaten

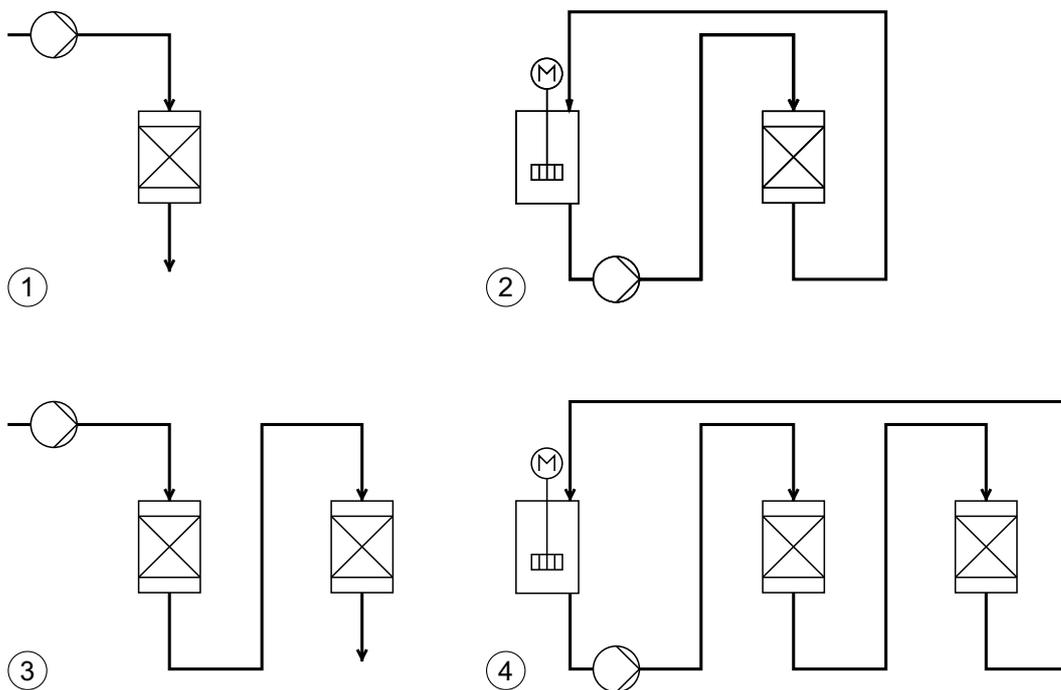


Abbildung 5: Mögliche Verschaltungen verschiedener Apparate für die dynamische Simulation.

In Abb. 5 sind die vier verschiedenen Verschaltungen von Festbett- und Rührkesselreaktoren dargestellt, deren dynamisches Verhalten mit Hilfe eines eigens entwickelten Programms simuliert werden konnte. Die Modellgleichungen für den idealen Rührkesselreaktor und die Festbettreaktoren mit Dispersion werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

Der einfache Festbettreaktor in Abb. 5(1) diente zusammen mit Messdaten aus Puls- und Sprungexperimenten zur Schätzung des axialen Dispersionskoeffizienten (Abschnitt 5.7.2). Die Kinetik der Racemisierung von Benzylhydantoin wurde unter anderem durch experimentelle Untersuchungen und dynamische Simulation eines geschlossenen Systems aus Rührkesselreaktor und Festbettreaktor, wie es Abb. 5(2) zeigt, aufgeklärt (Abschnitt 6.1.1). Der im Abschnitt 2.2 beschriebenen vollständigen Versuchsanlage (Abb. 2) entspricht auf Seiten der Simulation die Verschaltung in

an der Oberfläche eines jeden Einzelkorns miteinander gekoppelt und zeichnen sich durch jeweils eindimensionale Strömungen aus. Für die Komponente j führt die Bilanz eines differentiellen Volumenelements der Bulk-Phase (siehe auch [4]) auf Gl. 2:

$$\frac{\partial c_j}{\partial t} = -\frac{u_0}{\epsilon_{Fb}} \frac{\partial c_j}{\partial x} + D_{ax} \frac{\partial^2 c_j}{\partial x^2} - \frac{1 - \epsilon_{Fb}}{\epsilon_{Fb}} \frac{S_K}{V_K} k_f (c_j - c_j^{Korn}|_{r=R}) + r_j^{Bulk}(\underline{c}(t)) \quad (2)$$

Hier ist u_0 die Leerrohrgeschwindigkeit im Festbettreaktor, die den konvektiven Anteil am Stofftransport kennzeichnet. Abweichungen vom idealen Vermischungsverhalten infolge turbulenter Geschwindigkeitsschwankungen und Wirbelbildung werden durch dispersiven Stofftransport und somit den axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} berücksichtigt. Im Stoffaustauschterm kann das Verhältnis S_K/V_K von Oberfläche zu Volumen eines Partikels der Schüttung durch $3/R$ bzw. $6/d_S$ ersetzt werden, da die Partikel näherungsweise kugelförmig sind. Den Einfluß der Partikelgrößenverteilung auf den Stofftransport erfaßt dabei der Sauterdurchmesser d_S (Abschnitt 5.6.1). Spontane Reaktionen der Komponente j oder solche, die auf homogener Katalyse beruhen, sind in der volumenbezogenen Reaktionsrate r_j^{Bulk} zusammengefasst.

Am Zulauf des Festbettreaktors (Ortskoordinate $x = 0$) gilt, dass der von außen konvektiv zufließende Stoffstrom $\dot{n}_j^{zu} = Q c_j^{zu}$ identisch ist mit dem konvektiv in den Festbettreaktor hineinfließenden Stoffstrom, vermindert um den der Konvektionsströmung entgegengerichteten dispersiven Stoffstrom aus dem Inneren des Festbettreaktors an den Zulauftrand (Randbedingungen nach Dankwerts [21]).

$$Q c_j^{zu} = \frac{u_0}{\epsilon_{Fb}} A c_j^{zu} = \frac{u_0}{\epsilon_{Fb}} A c_j|_{x=0} - A D_{ax} \left. \frac{\partial c_j}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (3)$$

Als Randbedingung für den Zulaufort resultiert somit:

$$\left. \frac{\partial c_j}{\partial x} \right|_{x=0} = \frac{u_0}{\epsilon_{Fb} D_{ax}} (c_j|_{x=0} - c_j^{zu}) \quad (4)$$

Da sich die Konzentrationen stromabwärts hinter dem Ablauf nicht weiter ändern, sieht die Randbedingung für den Ausgang des Festbettreaktors (Ortskoordinate $x = L$) wie folgt aus:

$$\left. \frac{\partial c_j}{\partial x} \right|_{x=L} = 0 \quad (5)$$

Stellvertretend für die Kornphase wird in jedem Volumenelement der Bulk-Phase ein poröses Einzelkorn bilanziert. Erfolgt der Stofftransport im Partikel ausschließlich durch Porendiffusion, so ergibt sich die entsprechende differentielle Bilanzgleichung für Komponente j in eindimensionalen Kugelkoordinaten nach Gl. 6:

$$\frac{\partial c_j}{\partial t} = D_{eff} \left(\frac{2}{r} \frac{\partial c_j}{\partial r} + \frac{\partial^2 c_j}{\partial r^2} \right) + \frac{1}{\epsilon_K} r_j^{Korn}(\underline{c}(t)) - \frac{1}{\epsilon_K} \phi_j^{Adsorption} \quad (6)$$

Voraussetzung für einen solchen Ansatz ist ein ortsunabhängiger und damit konstanter effektiver Diffusionskoeffizient D_{eff} . Sind an der inneren Oberfläche der Partikel Enzyme immobilisiert,

die Reaktionen der Komponente j katalysieren, so gilt für die auf das Volumen eines Partikels bezogene Reaktionsrate $r_j^{Korn} = \rho_K X_{Enzym} r_j^{spez}$. Die spezifische Reaktionsrate r_j^{spez} ist dabei auf die Masse des Enzyms bezogen, und es wird eine gleichmäßige Verteilung der Enzymbeladung X_{Enzym} im porösen Partikel angenommen. Für Komponenten j , die an die innere Oberfläche der porösen Partikel adsorbieren, ist $\phi_j^{Adsorption}$ der notwendige spezifische Stoffstrom zur spontanen Einstellung eines durch eine algebraische Gleichung beschriebenen Adsorptionsgleichgewichts zwischen Partikel und Porenflüssigkeit.

An der äußeren Oberfläche der Partikel findet der Stoffaustausch mit der umgebenden Bulk-Phase statt, und als Randbedingung für den Ort mit der Koordinate $r = R$ ergibt sich daher Gl. 7.

$$\left. \frac{\partial c_j}{\partial r} \right|_{r=R} = \frac{k_f}{D_{eff}} (c_j^{Bulk} - c_j|_{r=R}) \quad (7)$$

Aus Gründen der Symmetrie gilt für den Mittelpunkt eines Partikels (Ortskoordinate $r = 0$) die folgende Randbedingung:

$$\left. \frac{\partial c_j}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (8)$$

Zusätzlich erfolgt in dem differentiellen Volumenelement eine Bilanz der adsorbierten Komponente j mit der Konzentration \bar{c}_j :

$$\frac{\partial \bar{c}_j}{\partial t} = \frac{1}{\rho_K} \phi_j^{Adsorption} + r_j^{Oberfläche}(\bar{c}(t)) \quad (9)$$

Optional kann in Gl. 9 eine Reaktionsrate $r_j^{Oberfläche}$ für Reaktionen adsorbierter Komponenten an der Partikeloberfläche angegeben werden. Verbunden sind die Konzentration c_j in der Porenflüssigkeit und die auf die Partikelmasse bezogene Konzentration \bar{c}_j durch eine Adsorptionsisotherme, die in Gl. 10 in Form einer allgemeinen Funktion f angegeben ist:

$$\bar{c}_j = f(c_j) \quad (10)$$

3.3.1 Ortsdiskretisierung der partiellen Differentialgleichungen

Das durch die Gl. 2 bis 10 gebildete System aus partiellen Differentialgleichungen und algebraischen Gleichungen wurde mit dem numerischen Integrator LIMEX in der Version 4.2B1 vom März 2000 (bezogen aus der Bibliothek CodeLib des Konrad-Zuse-Zentrums für Informationstechnik Berlin, www.zib.de/Numerik/numsoft/CodeLib/ivpode.en.html) gelöst. LIMEX ist ein Extrapolations-Integrator für implizite Differential-Algebra-Systeme (DAE) und greift wahlweise auf direkte oder iterative Löser (GMRES und Bi-CGSTAB) zurück [22]. Die Nutzung von LIMEX setzt somit die Überführung der partiellen Differentialgleichungen 2 und 6 mit Hilfe eines geeigneten Diskretisierungsverfahrens in gewöhnliche Differentialgleichungen voraus. Zur Anwendung kam eine Finite-Volumen-Diskretisierung, welche auf der Integration der partiellen Differentialgleichung beruht [65, 60]. Die Bilanz eines finiten Volumens V_{finit}^{Bulk} beinhaltet

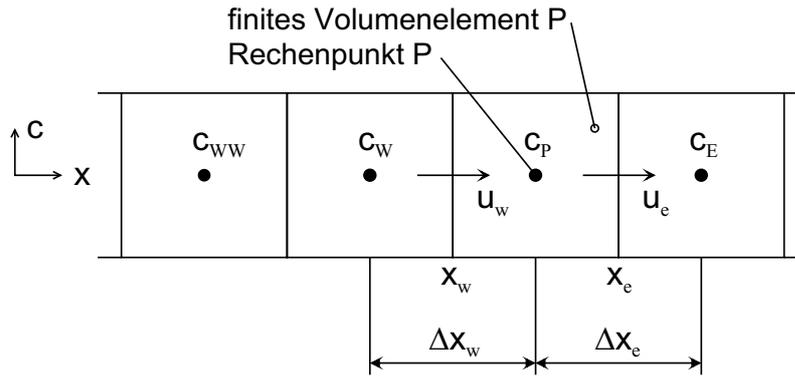


Abbildung 7: Schema der Ortsdiskretisierung.

daher alle über die Oberfläche dieses Kontrollvolumens ein- bzw. austretenden Stoffströme sowie die Quellen und Senken. Für Komponente j (aus Gründen der Übersichtlichkeit wird auf diesen Index im weiteren verzichtet, der Index P bezeichnet das betrachtete Volumenelement) ergibt sich somit Gl. 11 als diskretisierte Form von Gl. 2:

$$\frac{\partial c_P}{\partial t} = \frac{1}{V_{finit}^{Bulk}} \left(\sum_{i=E,W} (a_i c_i) - a_P c_P \right) - \frac{1 - \epsilon_{Fb}}{\epsilon_{Fb}} \frac{S_K}{V_K} k_f \left(c_P - c_P^{Korn} \Big|_{r=R} \right) + r^{Bulk}(c_P(t)) \quad (11)$$

Die Berechnung der Koeffizienten a_i hängt vom Verfahren ab, nach dem der Wert der transportierten Größe c auf der Grenze zwischen zwei benachbarten finiten Volumenelementen ermittelt wird. Im Falle des dispersiven Stofftransports wird in der Literatur der Zentralfdifferenzen Ansatz favorisiert, wohingegen für den konvektiven Stofftransport verschiedene Methoden zur Auswahl stehen. Weit verbreitet ist das Upwind-Schema, bei dem der Wert der transportierten Größe auf der Grenze dem des am nächsten stromaufwärts gelegenen Rechenpunkts entspricht (Abb. 7). Das heißt, dass dieses Verfahren lediglich eine Genauigkeit erster Ordnung besitzt, mit der als Fehler die sogenannte numerische Dispersion einhergeht. Verfahren zweiter (z.B. Zentralfdifferenzen) oder höherer Ordnung tendieren hingegen bei der Berechnung steiler Fronten und bei großen Peclet-Zahlen zu oszillierende Lösungen, die nicht der physikalischen Realität entsprechen [60, 76]. Diese Probleme können mit hochauflösenden Diskretisierungen wie den TVD-Methoden (total variation diminishing) vermieden werden [53, 83, 76]. Sie basieren auf einer Zentralfdifferenzen-Diskretisierung, welche als Kombination des Upwind-Schemas mit einem Korrekturterm dargestellt wird. In den Korrekturterm fließt eine vom Verlauf der Lösung abhängige Limiter-Funktion Φ ein, die beim Vorliegen großer Gradienten die Diskretisierungsordnung so weit reduziert, dass keine Oszillationen auftreten. Als Grenzfall ($\Phi = 0$) enthalten die TVD-Methoden also auch das Upwind-Schema. Für die eindimensionale Strömung in der Bulk-Phase eines Festbettreaktors ergeben sich gemäß der TVD-Methode die folgenden Koeffizienten a_i :

$$a_W = \left(\frac{D_{ax,w}}{\Delta x_w} + \max(u_w, 0) - \frac{1}{2} |u_w| \Phi_w \right) A_w^{Bulk} \quad (12)$$

$$a_E = \left(\frac{D_{ax,e}}{\Delta x_e} + \max(-u_e, 0) - \frac{1}{2} |u_e| \Phi_e \right) A_e^{Bulk} \quad (13)$$

$$a_P = a_W + a_E - u_w A_w^{Bulk} + u_e A_e^{Bulk} \quad (14)$$

Die verschiedenen TVD-Methoden unterscheiden sich in der Berechnung der Limiter-Funktion Φ , die in Abhängigkeit vom Verhältnis der beiden stromaufwärts gelegenen Gradienten der Lösung berechnet wird:

$$\Phi_w = \Phi_w(\theta) \text{ mit } \begin{cases} \theta = \frac{c_W - c_{WW}}{c_P - c_W} & \text{für } u_w \geq 0 \\ \theta = \frac{c_E - c_P}{c_P - c_W} & \text{für } u_w < 0 \end{cases} \quad (15)$$

bzw.

$$\Phi_e = \Phi_e(\theta) \text{ mit } \begin{cases} \theta = \frac{c_P - c_W}{c_E - c_P} & \text{für } u_w \geq 0 \\ \theta = \frac{c_{EE} - c_E}{c_E - c_P} & \text{für } u_w < 0 \end{cases} \quad (16)$$

In dieser Arbeit wurden der superbee-Limiter [71] und der van Leer-Limiter [53] verwendet, die wie folgt definiert sind:

$$\begin{aligned} \Phi &= \max(0, \min(1, 2\theta), \min(2, \theta)) && : \text{superbee-Limiter} \\ \Phi &= \frac{|\theta| + \theta}{1 + |\theta|} && : \text{van Leer-Limiter} \end{aligned} \quad (17)$$

Die Randbedingungen der diskretisierten Bilanzgleichung 11 sind vom Dirichlet-Typ, d.h., es wird für das Zulaufelement ein zusätzlicher Stoffstrom berücksichtigt, der sich (entsprechend Gl. 4) aus der Zulaufkonzentration einer Komponente j ergibt. Analog verläßt den Ablauf ein (gemäß Gl. 5) aus der Konzentration auf dem äußeren Rand des Ablaufelements resultierender Stoffstrom.

Ähnlich wie bei der Bulk-Phase erfolgte die Diskretisierung der Kornphase. Wichtigster Unterschied ist das Fehlen des konvektiven Stofftransports in den porösen Partikeln, so dass für den diffusiven Transport der Wert der transportierten Größe c auf der Grenze zwischen zwei benachbarten finiten Volumenelementen mit dem einfachen Zentralfdifferenzen-Ansatz berechnet werden kann. Außerdem ist das kugelschalenförmige Volumen V_{finit}^{Korn} eines finiten Volumenelements nicht konstant, sondern abhängig von der radialen Ortskoordinate r . Mit der Finite-Volumen-Methode führt die Diskretisierung von Gl. 6 für Komponente j auf Gl. 18:

$$\frac{\partial c_P}{\partial t} = \frac{1}{V_{finit}^{Korn}(r)} \left(\sum_{i=E,W} (a_i c_i) - a_P c_P \right) + \frac{1}{\epsilon_K} r^{Korn}(\underline{c}_P(t)) - \frac{1}{\epsilon_K} \phi_P^{Adsorption} \quad (18)$$

Dabei fließt als alleiniger Modellparameter der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} in die Berechnung der Koeffizienten a_i ein:

$$a_W = \frac{D_{eff,w}}{\Delta r_w} A_w^{Korn} \quad (19)$$

$$a_E = \frac{D_{eff,e}}{\Delta r_e} A_e^{Korn} \quad (20)$$

$$a_P = a_W + a_E \quad (21)$$

Die diskretisierte Gl. 18 für das äußerste Kugelschalenelement erhält durch die Randbedingung an der Partikeloberfläche (Gl. 7) auf der rechten Seite einen zusätzlichen additiven Term gemäß

Gl. 22, welcher mit dem spezifischen Stoffstrom ϕ den Stoffübergang von der Flüssigkeit an ein Partikel berücksichtigt und so die Kornphase mit der Bulk-Phase verbindet:

$$\phi = \frac{1}{\epsilon_K V_{finit}^{Korn} \Big|_{r=R}} S_K k_f \left(c_P^{Bulk} - c_P \Big|_{r=R} \right) \quad (22)$$

Für das innerste Volumenelement mit der Form einer Kugel bedeutet die Randbedingung Gl. 8, dass es in seinem Mittelpunkt keinen Abfluss gibt.

Der durch die Diskretisierung der partiellen Differentialgleichungen verursachte Fehler infolge numerischer Dispersion hängt von der Gitter-Peclet-Zahl Pe_{Gitter} ab, die das Verhältnis von konvektivem zu dispersivem Transport auf einem Rechengitter mit Gitterabstand Δx beschreibt:

$$Pe_{Gitter} = \frac{|u| \Delta x}{D_{ax}} \quad (23)$$

Aus Gl. 23 ist ersichtlich, dass Pe_{Gitter} für ein gegebenes Problem durch die Anzahl der Rechenpunkte bzw. den Gitterabstand beeinflusst werden kann. Dabei verringert sich die numerische Dispersion mit abnehmender Gitter-Peclet-Zahl. Für die in Abschnitt 5.7.2 detailliert beschriebene Konfiguration eines Festbettreaktors wurden Pulsexperimente mit Gitter-Peclet-Zahlen im Bereich $1 \leq Pe_{Gitter} \leq 6, 7$ simuliert. Der mit porösen Partikeln gepackte Festbettreaktor wurde dazu bei der Leerrohrgeschwindigkeit $u_0 = 5, 53 \cdot 10^{-4}$ m/s mit einem inerten Spurstoffpuls (d.h., der Spurstoff diffundiert in die porösen Partikel, wird aber nicht adsorbiert) der Konzentration 3 mol/L und der Dauer von 3 s beaufschlagt. Abb. 8 zeigt die simulierte Antwort am Reaktorausgang in Form der Verweilzeitverteilung

$$E(t) = \frac{\dot{n}}{n_0} = \frac{\dot{V} c(t)}{\int_0^\infty \dot{V} c(t) dt} \quad (24)$$

und es ist zu erkennen, dass die Pulsantworten für $Pe_{Gitter} \leq 3, 3$ fast übereinstimmen. Da die Verweilzeitverteilungen mit $Pe_{Gitter} \leq 2$ keine Abweichungen voneinander aufweisen, wurde dieses Kriterium zur Minimierung des numerischen Fehlers bei der Simulation von Pulsexperimenten eingehalten.

Der Einfluss verschiedener Diskretisierungsverfahren auf die Lösung ist in Abb. 9 dargestellt. Für das oben beschriebene Testbeispiel wurden Verweilzeitverteilungen nach einem Spurstoffpuls berechnet, denen jeweils die gleiche axiale Dispersion sowie Gitter-Peclet-Zahl zugrunde lag. Infolge numerischer Dispersion ist die Antwort auf den Rechteckpuls bei der Upwind-Diskretisierung stärker aufgeweitet, wohingegen das TVD-Verfahren auf einen mit dem experimentellen Ergebnis übereinstimmenden Verlauf führt. Auch im Grenzfall der eindimensionalen Rohrströmungen ohne dispersiven Transport ($D_{ax} = 0$) weist das TVD-Verfahren im Vergleich mit anderen Methoden den geringsten Fehler auf [76], so dass es für alle Simulationen dieser Arbeit genutzt wurde.

3.3.2 Modellparameter für den Festbettreaktor

Das im Abschnitt 3.3 beschriebene Modell des Festbettreaktors enthält Parameter, die auf Grundlage experimenteller Ergebnisse geschätzt bzw. mit Korrelationen aus der Literatur bestimmt wur-

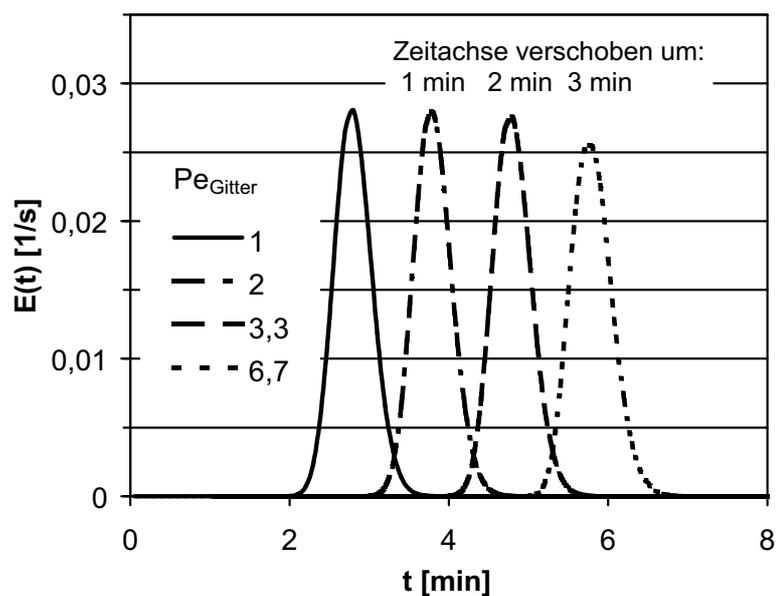


Abbildung 8: Einfluss der Gitter-Peclet-Zahl auf das Antwortverhalten eines Festbettreaktors bei der Simulation eines Spurstoffpulses (aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurden die Verläufe für die Gitter-Peclet-Zahlen 2 / 3,3 / 6,7 um jeweils 1 min / 2 min / 3 min auf der Zeitachse verschoben).

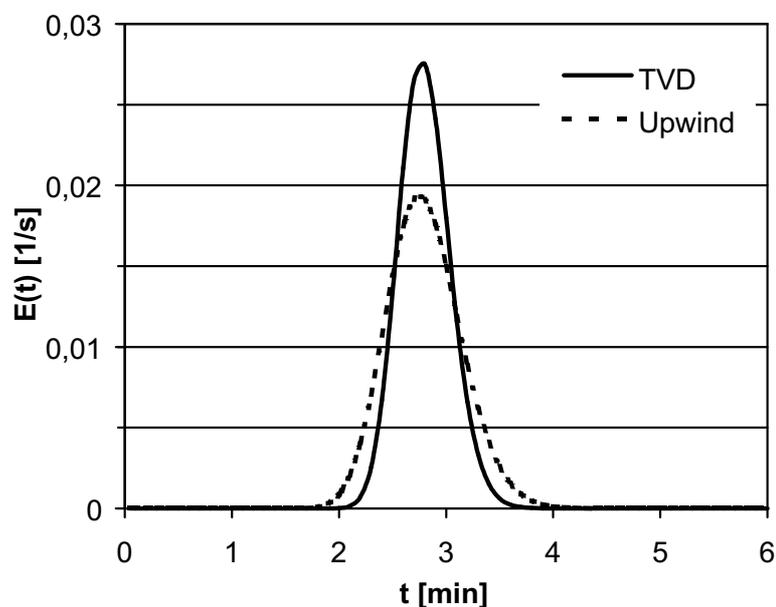


Abbildung 9: Einfluss der Diskretisierungsmethode auf das Antwortverhalten eines Festbettreaktors bei der Simulation eines Spurstoffpulses ($Pe_{Gitter} = 3,3$).

den. Zu den erstern zählen die Porositäten des Festbetts ϵ_{Fb} und der Partikel ϵ_K sowie die axiale Dispersion D_{ax} . Auf diese Parameter gehen die Abschnitte 5.6.1 und 5.7.2 näher ein.

Zur Berechnung des Stoffübergangs von der Bulk-Phase an die Kornphase gibt es in der Literatur verschiedene Ansätze für die Sherwood-Zahl Sh , wie sie z.B. in einem Übersichtsartikel von Seguin et al. [80] dargestellt sind. Da in dieser Arbeit aufgrund der vergleichsweise langen Verweilzeiten in den Festbettreaktoren Strömungsverhältnisse mit kleinen Reynolds-Zahlen vorherrschten, wurden die bei Geankoplis et al. [101, 98] angegebenen Korrelationen verwendet:

$$\begin{aligned} Sh &= \frac{1,09}{\epsilon_{Fb}} Re_P^{1/3} Sc^{1/3} & \text{für } \epsilon_{Fb} = 0,35 \dots 0,75 \quad \text{und} \quad Re_P = 0,0016 \dots 55 \\ Sh &= \frac{0,250}{\epsilon_{Fb}} Re_P^{0,69} Sc^{1/3} & \text{für } \epsilon_{Fb} = 0,35 \dots 0,75 \quad \text{und} \quad Re_P = 55 \dots 1500 \end{aligned} \quad (25)$$

Dabei sind die dimensionslosen Kennzahlen wie folgt definiert:

$$\begin{aligned} Sh &= \frac{k_f d_K}{D_0} & : \text{Sherwood-Zahl} \\ Re_P &= \frac{u_0 d_K}{\nu} & : \text{Partikel-Reynolds-Zahl} \\ Sc &= \frac{\nu}{D_0} & : \text{Schmidt-Zahl} \end{aligned} \quad (26)$$

Mit Hilfe der Sherwood-Zahl wurde der gesuchte flüssig/fest-Stoffübergangskoeffizienten k_f ermittelt.

Der Stofftransport in den Poren der Partikel wird vom effektiven Diffusionskoeffizient D_{eff} bestimmt, welcher nach Gl. 27 vom molekularen Diffusionskoeffizienten D_0 , der Porosität des Korns ϵ_K und dem Umwegfaktor τ_U abhängt [39, 43]:

$$D_{eff} = D_0 \frac{\epsilon_K}{\tau_U} \quad (27)$$

Der Umwegfaktor berücksichtigt die im Vergleich zum Partikelradius vergrößerte Diffusionsweglänge und wird in der Literatur mit $\tau_U = 2 \dots 7$ angegeben [40]. In dieser Arbeit wurde $\tau_U = 2$ gewählt, da insbesondere der Ionenaustauscher Q-Sepharose FF eine Struktur aufweist, bei der ein Großteil der Poren nicht im Partikel endet sondern durch das Partikel hindurchführt.

Eine Abschätzung des molekularen Diffusionskoeffizienten einer gelösten Substanz erlaubt die empirische Beziehung nach Wilke und Chang [2]:

$$D_0 = 7,4 \cdot 10^{-10} \frac{T (X M)^{0,5}}{\mu V_{Kp}^{0,6}} \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \right] \quad (28)$$

mit	T	[K]	absolute Temperatur
	X	[-]	Assoziationsparameter (2,6 für H ₂ O)
	M	[g/mol]	Molmasse des Lösungsmittels
	μ	[g/(cm s)]	dynamische Viskosität der Lösung
	V_{Kp}	[cm ³ /mol]	Molvolumen am Kondensationspunkt bei Normaldruck, berechnet aus atomaren Volumeninkrementen [2]

Tab. 3 fasst die molekularen Diffusionskoeffizienten der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Substanzen für das Lösungsmittel Wasser zusammen. Diese Schätzwerte wurden bei der Identifizierung des axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} (Abschnitt 5.7.2) und anderen Simulationen ebenfalls als optimierbare Parameter angesehen und teilweise um maximal 2,5 % verändert.

Substanz	M [g/mol]	D_0 [cm ² /s] (nach Wilke und Chang [2])
Benzylhydantoin	190,2	$9,81 \cdot 10^{-6}$
Carbamoylpenylalanin	208,2	$9,17 \cdot 10^{-6}$
Phenylalanin	165,2	$10,36 \cdot 10^{-6}$
Aceton	58,08	$17,5 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 3: Molmassen und molekulare Diffusionskoeffizienten verschiedener Substanzen ($T = 37$ °C, Lösungsmittel: Wasser)

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden reinst oder purum von den Firmen Fluka AG (Buchs, Schweiz), Sigma (München) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Zur Herstellung von Lösungen wurde vollentsalztes Wasser und im Fall der kinetischen Untersuchungen Reinstwasser aus einer NANOpure II-Anlage (Barnstead, Newton, Massachusetts, USA) verwendet.

D-, L-, und D,L- Carbamoylphenylalanin sowie D-, L-, und D,L-5-Benzylhydantoin wurden am Institut für Bioverfahrenstechnik aus der entsprechenden Aminosäure synthetisiert [93]. Für Untersuchungen in größerem Maßstab wurden von der Degussa AG, Hanau-Wolfgang, racemisches Benzylhydantoin und Benzylhydantoin mit einem Überschuß des D-Enantiomers von $ee_{D-BnH} = 60\%$ zur Verfügung gestellt. Das racemische Benzylhydantoin, welches ursprünglich eine unbekannte Verunreinigungen mit starker Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 296\text{ nm}$ aufwies, wurde durch zweimalige Umkristallisation in siedendem Ethanol aufgereinigt. Die Ausbeute an Benzylhydantoin betrug jeweils ca. 80 % .

4.2 Puffer

Tris-HCl-Puffer (pH 7,0–9,0)

Die berechnete Masse an Tris (für 500 mL des 0,2 M Standardpuffers waren das 12,114 g) wurde in einem Messkolben in Reinstwasser aufgelöst und der pH-Wert bei Umgebungstemperatur mit konzentrierter Salzsäure eingestellt. Anschließend wurde der Messkolben mit Reinstwasser auf das Endvolumen aufgefüllt und die Pufferlösung durch einen 0,45 μm hydrophilen Polyethersulfon Membranfilter (Supor-450, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) filtriert.

Phosphatpuffer (pH 5,0–8,0)

Die berechneten Massen an Kalium-dihydrogenphosphat und di-Natrium-hydrogenphosphat wurden getrennt voneinander in zwei Messkolben in Reinstwasser aufgelöst. Anschließend wurden die Messkolben mit Reinstwasser auf die Endvolumina aufgefüllt und die Lösungen filtriert. Bei der Herstellung eines Phosphatpuffers mit definiertem pH-Wert wurde eine Pufferkomponente vorgelegt und die zweite Pufferkomponente mit gleicher Konzentration in dem Maße zugegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht war.

Carbonatpuffer (pH 9,2–10,6)

Puffersystem: Natriumcarbonat, Natrium-dihydrogencarbonat. Die Herstellung erfolgte analog zum Phosphatpuffer.

4.3 Substratlösungen

D,L-Benzylhydantoin Lösung

Für die racemische Standardsubstratlösung der Konzentration 8 mM wurden in einem 0,5 L-Messkolben 0,761 g D,L-Benzylhydantoin in zirka 450 mL 0,2 M Tris-HCl-Puffer bei 40 °C unter Rühren aufgelöst. Nach Abkühlung auf Umgebungstemperatur wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 8,5 eingestellt, das Volumen mit Puffer auf 0,5 L ergänzt und die Lösung filtriert.

D- und L-Benzylhydantoin Lösungen

Da Benzylhydantoin in wässriger Lösung einer basenkatalysierten Racemisierung (Halbwertszeit ≈ 7 h bei pH 8,5) unterliegt [45], wurden die reinen Enantiomere in angesäuertem Reinstwasser bei pH $\approx 2,5$ aufgelöst. Unter diesen Bedingungen konnte über eine Woche hinweg keine Racemisierung des Benzylhydantoin nachgewiesen werden [93]. Unmittelbar vor Verwendung der Substratlösung wurde Tris-Salz ergänzt, der pH-Wert eingestellt und mit Reinstwasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Abschließend wurde die D- oder L-Benzylhydantoin Lösung filtriert.

Bei Inhibitionsuntersuchungen wurde der entsprechende Inhibitor gemeinsam mit dem Benzylhydantoin eingewogen.

D- und L-Carbamoylphenylalanin Lösungen

D- und L-Carbamoylphenylalanin Lösungen wurden in gleicher Weise wie die D,L-Benzylhydantoin Lösungen angesetzt.

4.4 Biokatalysatoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme Hydantoinase und L-Carbamoylase aus dem Bodenbakterium *Arthrobacter aurescens* waren kommerziell nicht erhältlich. Zur Verfügung standen verschiedene am Institut für Bioverfahrenstechnik durch Fermentation und anschließende Aufreinigung gewonnene Enzymchargen. Neben der isolierten Wildtyp Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 wurde auch eine rekombinant in *Escherichia coli* W3110 exprimierte Hydantoinase verwendet, deren genomische DNA aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 stammte.

Von der L-Carbamoylase wurde ausschließlich das rekombinante Enzym genutzt [100]. Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Industrielle Genetik an der Universität Stuttgart führte B. Wilms [99] die Arbeiten zur Gewinnung dieser rekombinanten Enzyme durch.

Die kinetische Charakterisierung erfolgte ausschließlich mit den in gelöster Form vorgelegenen Enzyme. Zur Stabilisierung und für die Verwendung in einer Versuchsanlage wurden beide Enzyme an verschiedene polymere Trägermaterialien kovalent gebunden. Entsprechende Methoden der Enzymimmobilisierung sind Gegenstand der Arbeit von K. Ragnitz [69].

Einen Überblick über die verwendeten Enzyme gibt Tab. 4. Spezifische Enzymaktivitäten A wurden gemäß

$$A = \frac{1}{c_P} \left. \frac{dc}{dt} \right|_{t=0} \quad (29)$$

aus Anfangsreaktionsraten und der Enzymkonzentration c_P berechnet. Standardsubstrate für die Hydantoinase und die Carbamoylase waren dabei 8 mM D,L-Benzylhydantoin bzw. 8 mM L-Carbamoylphenylalanin in jeweils 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 bei 37 °C.

Enzym	Trägermaterial	c_P	Aktivität	v_{max}
Organismus / Vektor		[mg _P /mL]	[mmol/(g _P s)]	[mmol/(g _P s)]
rek. Hydantoinase	gelöstes Enzym	1,24	0,55 (L)	3,97 (L)
<i>E. coli</i> W3110 / pBW31			0,22 (D)	0,23 (D)
rek. L-Carbamoylase	gelöstes Enzym	69,7	$5,60 \cdot 10^{-2}$	$6,10 \cdot 10^{-2}$
<i>E. coli</i> W3110 / pBW24				
Immobilisate		[mg _P /g _{T, f}]	[mmol/(g _{T, f} s)]	[mmol/(g _{T, f} s)]
Wildtyp Hydantoinase	Eupergit C 250L ¹	7,0	$3,17 \cdot 10^{-5}$ (L)	$1,58 \cdot 10^{-4}$ (L)
<i>Arthrobacter aureescens</i>			$1,00 \cdot 10^{-5}$ (D)	$9,15 \cdot 10^{-6}$ (D)
DSM 3747				
rek. Hydantoinase	Eupergit C 250L ¹	8,6	$3,58 \cdot 10^{-5}$ (L)	
<i>E. coli</i> W3110 / pBW31			$1,78 \cdot 10^{-5}$ (D)	
rek. L-Carbamoylase	EAH-Sepharose 4B ²	57,3	$2,72 \cdot 10^{-4}$	$2,85 \cdot 10^{-4}$
<i>E. coli</i> W3110 / pBW24				

Tabelle 4: Verwendete Enzyme. Die rekombinanten Enzyme wurden von B. Wilms [99] und die Immobilisate von K. Ragnitz [69] bereitgestellt. Die Proteinkonzentration c_P , die spezifische Aktivität A und die Maximalrate v_{max} beziehen sich bei den Immobilisaten auf die Masse des feuchten Trägermaterials.

¹Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt

²Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

4.5 Analytik

4.5.1 Analytische HPLC

Für die offline-Analytik wurde eine HPLC-Methode mit einer chiralen Cyclodextrin Trennsäule (ET 200/4 Nucleodex β PM, Macherei-Nagel, Düren) verwendet [93]. Die HPLC-Anlage (Thermo Separations Products, San Jose, CA, USA) war mit einer isokratischen Pumpe (P2000), einem automatischen Probengeber einschließlich Injektionsventil (AS3000), einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (UV1000) und der Software TSP PC 1000 ausgestattet. Ferner wurden eine 20 μ L Probenschleife, ein Fluß der mobilen Phase (20%ige Methanollösung in 0,3%iger Phosphorsäure, mit NaOH auf pH 3,7 eingestellt) von 0,2 mL/min und die Detektionswellenlänge $\lambda = 210$ nm gewählt. Wie das beispielhafte Chromatogramm in Abb. 10 zeigt, ergaben sich die in Tab. 5 aufgelisteten Retentionszeiten. Die für D- und L-Benzylhydantoin ermittelten Konzen-

Substanz	Retentionszeit [min]	Bemerkung
Phenylalanin	11,0	D- und L-Phenylalanin wurden nicht getrennt.
D-Carbamoylphenylalanin	24,6	
L-Carbamoylphenylalanin	30,0	
D-Benzylhydantoin	48,8	D- und L-Benzylhydantoin wurden
L-Benzylhydantoin	50,7	nicht bis zur Basislinie getrennt.

Tabelle 5: Retentionszeiten

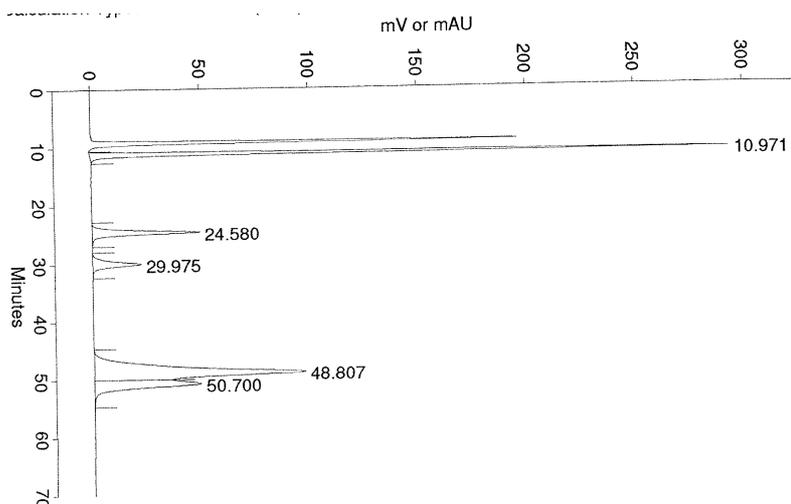


Abbildung 10: Chromatogramm eines mittels Chiral-HPLC aufgetrennten Reaktionsgemischs. Die Komponenten sind in zeitlich aufsteigender Reihenfolge: Phe, D-CPhe, L-CPhe, D-BnH sowie L-BnH.

trationen wiesen aufgrund der unvollständigen Trennung der entsprechenden Peaks im Chromatogramm Unsicherheiten auf und wurden deshalb nicht zur Modellparametrierung verwendet. Eine Trennung von D- und L-Phenylalanin war nicht notwendig, da im untersuchten System ausschließlich L-Phenylalanin vorlag.

Proben, die gelöste Enzyme enthielten, wurden zum Abstoppen der Reaktionen mit Trifluoressigsäure versetzt (2 μL Säure für 50 μL Probe) und anschließend mit dem Fließmittel (948 μL) verdünnt.

4.5.2 Polarimetrie

4.5.2.1 Messung von Konzentrations-Zeit-Verläufen Die in Abschnitt 4.5.1 beschriebene chiral-analytische HPLC-Methode war aufgrund der hohen Retentionszeiten von ca. einer Stunde nicht geeignet für schnelle Enzymtests und die online-Überwachung einer Versuchsanlage. Deshalb wurde eine alternative Analytik entwickelt, bei der die charakteristische Eigenschaft chiraler Substanzen, eine konzentrationsabhängige optische Aktivität aufzuweisen, genutzt wurde, um den Fortschritt einer Reaktion zu verfolgen. Die optische Aktivität kann entweder als Drehwert (optische Rotationsdispersion, ORD) oder als zirkularer Dichroismus (CD) gemessen werden [59]. In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie aus dem optischen Drehwert Konzentrationen berechnet werden können, wenn im untersuchten Reaktionssystem zwei chirale Spezies vorliegen.

Für die Messungen wurde ein Polarimeter (Modell 341, Perkin Elmer Bodenseewerk, Überlingen) mit einer Lichtquelle variabler Wellenlänge genutzt. Um eine ausreichende Sensitivität zum Nachweis von Substanzen in geringer Konzentration zu erreichen, wurden spezielle Filter mit einer kürzesten Wellenlänge von $\lambda = 253$ nm verwendet. Die Wellenlänge beeinflusste die Sensitivität sehr deutlich, da die absoluten Größen der spezifischen Drehwerte von Benzylhydantoin und Carbamoylphenylalanin mit abnehmender Wellenlänge stark ansteigen [88]. Die Reaktionen wurden bei $\lambda = 296$ nm direkt in der Polarimeter-Küvette mit einem Volumen von 1000 μL und einer Schichtdicke von 100 mm durchgeführt. Dabei war die Küvette mit Hilfe eines Umlauf-Wasserbades konstant auf 37 °C beheizt. Vergleichende Untersuchungen mit einer Durchflussküvette zeigten, dass die Messergebnisse unabhängig vom Strömungszustand waren.

Die Messdaten des Polarimeters wurden mit Hilfe des Programms VisualDesigner (Intelligent Instrumentation GmbH, Leinfelden-Echterdingen) über die serielle RS-232 Schnittstelle eines Personalcomputers abgefragt und zur online-Darstellung automatisch in ein Excel-Tabellenblatt eingetragen.

Zur Auswertung der Messdaten waren zwei Gleichungen erforderlich. Die erste führt den beobachteten optischen Drehwert α_{obs} auf die Einzelbeiträge beider chiraler Spezies zurück, welche sich multiplikativ aus einer Konstante, der jeweiligen Konzentration (c_1 bzw. c_2) und der Schichtdicke l der Küvette ergeben [27]:

$$\alpha_{obs} = \alpha_1 + \alpha_2 = \langle \alpha \rangle_1 l c_1 + \langle \alpha \rangle_2 l c_2 \quad (30)$$

Voraussetzung für die Beobachtung einer Reaktion durch Messung von α_{obs} ist ein Unterschied der spezifischen Drehwerte $\langle\alpha\rangle_1$ und $\langle\alpha\rangle_2$ bezüglich ihrer absoluten Größen (Reaktion eines Substrat-antimomers zu einem Produktenantimomer) oder ihres Vorzeichens (Isomerisierung eines Enantiomers). Der Beitrag des katalysierenden Enzyms zum beobachtbaren optischen Drehwert ist in der Regel vernachlässigbar, da seine Konzentration mindestens fünf Größenordnungen kleiner ist als die Konzentrationen der Reaktanten.

Betrachtet man eine äquimolare Reaktion in einem geschlossenen System konstanten Volumens, dann führt eine Bilanz der chiralen Spezies auf folgende Gleichung:

$$c_{ges}^0 = c_{ges}(t) = c_1(t) + c_2(t) \quad (31)$$

Zu jedem Zeitpunkt t ist die Summe der Konzentrationen der chiralen Spezies gleich der Gesamtkonzentration c_{ges} beziehungsweise der Anfangskonzentration c_{ges}^0 . Es folgt, dass die beiden unbekannt Konzentrationen c_1 and c_2 mit Hilfe der Gl. 30 und 31 aus den Messwerten α_{obs} und c_{ges}^0 berechnet werden können:

$$c_2 = \frac{\alpha_{obs} - \langle\alpha\rangle_1 l c_{ges}^0}{(\langle\alpha\rangle_2 - \langle\alpha\rangle_1) l} \quad (32)$$

4.5.2.2 Bestimmung von Anfangsreaktionsraten Anfangsreaktionsraten wurden direkt aus der Anfangssteigung des gemessenen α_{obs}, t -Verlaufs mit der differenzierten Form von Gl. 32 ermittelt:

$$r = \left. \frac{dc_2}{dt} \right|_{t=0} = \frac{1}{(\langle\alpha\rangle_2 - \langle\alpha\rangle_1) l} \left. \frac{d\alpha_{obs}}{dt} \right|_{t=0} \quad (33)$$

Diese Art der Auswertung eignete sich insbesondere für Inhibitionsstudien, bei denen ein achiraler Inhibitor eingesetzt oder ein chiraler Inhibitor nicht umgesetzt wird.

4.5.3 Kopplung von Polarimetrie und Photometrie

4.5.3.1 Messung von Konzentrations-Zeit-Verläufen Bei der Umsetzung eines racemischen Substrats gemäß dem Reaktionsschema in Abb. 11, das eine kinetische Racematspaltung [12, 13] beschreibt, treten insgesamt vier chirale Spezies auf. Da in diesem Fall die Messgröße des Polarimeters allein nicht ausreicht, um alle vier unbekannt Konzentrationen zu ermitteln, wurde der experimentelle Aufbau durch ein Spektral-Photometer (LKB Ultrospec III, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) ergänzt. Unmittelbar nach dem Start einer Reaktion wurde die

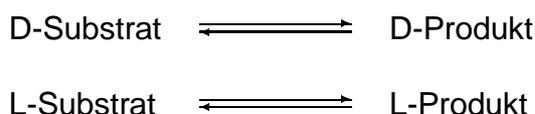


Abbildung 11: Reaktionsschema einer kinetischen Racematspaltung

Reaktionslösung gleichmäßig auf die Polarimeter- und die Photometerküvette verteilt, so dass der Reaktionsverlauf in zwei parallelen Ansätzen verfolgt werden konnte. Die Photometerküvette hatte ein Volumen von 1000 μL , eine Schichtdicke von 10 mm und wurde mit Hilfe eines Umlauf-Wasserbades konstant auf 37 °C beheizt. Die Messwellenlänge variierte in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zwischen 243 nm und 249 nm. Vergleichende Untersuchungen mit einem System, bei dem die Reaktion in einem Topf ablief, wiesen keinen Unterschied zu dem beschriebenen Vorgehen mit zwei parallelen Ansätzen auf.

Die Messdaten von Polarimeter und Photometer wurden mit Hilfe des Programms VisualDesigner (Intelligent Instrumentation GmbH, Leinfelden-Echterdingen) über die serielle RS-232 Schnittstelle eines Personalcomputers abgefragt und zur online-Darstellung automatisch in ein Excel-Tabellenblatt eingetragen.

Zur Berechnung der Konzentrations-Zeit-Verläufe wurden die Gl. 30 und 31 an ein System mit vier chiralen Spezies angepasst:

$$\alpha_{obs} = \langle\alpha\rangle_{D-S} l c_{D-S} + \langle\alpha\rangle_{L-S} l c_{L-S} + \langle\alpha\rangle_{D-P} l c_{D-P} + \langle\alpha\rangle_{L-P} l c_{L-P} \quad (34)$$

$$\begin{aligned} c_S &= c_{D-S} + c_{L-S} \\ c_P &= c_{D-P} + c_{L-P} \end{aligned} \quad (35)$$

Weiterhin impliziert das Reaktionsschema in Abb. 11 die folgende Nebenbedingung, wenn ein racemisches Substrat umgesetzt wird:

$$c_{D-S} + c_{D-P} = c_{L-S} + c_{L-P} = \frac{1}{2} c_{ges}^0 \quad (36)$$

Gl. 34, 35 und 36 zusammen mit der Beziehung zwischen den spezifischen Drehwerten eines Enantiomerenpaares

$$\langle\alpha\rangle_{D-i} = -\langle\alpha\rangle_{L-i} \quad (37)$$

ermöglichen die Berechnung von c_{L-S} aus den Messgrößen α_{obs} und c_S :

$$c_{L-S} = \frac{\alpha_{obs} + c_S (\langle\alpha\rangle_{L-S} - \langle\alpha\rangle_{L-P}) l}{2 (\langle\alpha\rangle_{L-S} - \langle\alpha\rangle_{L-P}) l} \quad (38)$$

Die im Verlauf einer Reaktion veränderliche Gesamtkonzentration des Substrats c_S ließ sich aus den Messdaten des Photometers gemäß Gl. 39 ermitteln, die analog zu Gl. 32 abgeleitet wurde.

$$c_S = \frac{\epsilon_{obs} - \langle\epsilon\rangle_P l c_{ges}^0}{(\langle\epsilon\rangle_S - \langle\epsilon\rangle_P) l} \quad (39)$$

Dabei ist ϵ_{obs} die vom Photometer gemessene Absorption und $\langle\epsilon\rangle_i$ der Absorptionskoeffizient der Spezies i .

4.5.4 Spezifische molare Drehwerte und Absorptionskoeffizienten

In Tab. 6 sind die spezifischen molaren Drehwerte und Absorptionskoeffizienten für Benzylhydantoin, Carbamoylphenylalanin und Phenylalanin zusammengestellt. Weitere Werte für andere Temperaturen, pH-Werte und Messwellenlängen sowie eine Beschreibung der experimentellen Methodik ihrer Bestimmung finden sich in den Arbeiten von T. Waniek [93, 88] und M. Schwickart [78].

	$\langle\alpha\rangle$ [°/(mM cm)]	$\langle\epsilon\rangle$ [1/(mM cm)]
Messwellenlänge	$\lambda = 296 \text{ nm}$	$\lambda = 246 \text{ nm}$
L-Benzylhydantoin	-0,0184	0,450
L-Carbamoylphenylalanin	0,0061	0,101
L-Phenylalanin	-0,0017	n.b.

Tabelle 6: Spezifische molare Drehwerte $\langle\alpha\rangle$ und Absorptionskoeffizienten $\langle\epsilon\rangle$ bei pH 8,5 und $T = 37 \text{ °C}$ (vgl. [93, 88, 78]).

4.6 Standardassays und Bestimmung von Reaktionsraten

Alle Experimente zur Identifizierung der kinetischen Parameter wurden wenn nicht anders vermerkt unter einheitlichen Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C in $0,2 \text{ M}$ Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 durchgeführt. Dabei waren die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass sowohl für die Hydantoinase als auch die L-Carbamoylase Umsetzungen mit maximaler Aktivität zu erwarten waren. Grundlage dieser Festlegung war die Charakterisierung beider Enzyme in den Arbeiten von K. Ragnitz [69] und Dombach [23].

Anfangsreaktionsraten bei verschiedenen Anfangssubstratkonzentrationen wurden mit der in Abschnitt 4.5.2.2 näher erläuterten polarimetrischen Methode bestimmt. Weiterführende Untersuchungen basierten auf ‚dynamischen‘ Experimenten, bei denen die zeitlichen Konzentrationsverläufe der Reaktanten annähernd bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts ermittelt wurden (Abschnitt 4.5.2.1). In beiden Fällen wurden für ein Experiment jeweils $1000 \text{ }\mu\text{L}$ Substratlösung und $100 \text{ }\mu\text{L}$ verdünnte Enzymlösung intensiv vermischt und unmittelbar in der Küvette des Polarimeters vermessen. Es kamen gemäß Abschnitt 4.3 zubereitete Lösungen der enantiomerenreinen Substrate zum Einsatz (L- und D-Benzylhydantoin für die Hydantoinase und L-Carbamoylphenylalanin für die L-Carbamoylase).

Eine Variante der dynamischen Experimente war die Umsetzung racemischer Substrate, deren Beobachtung eine Kombination aus Polarimeter und Photometer erforderte (Abschnitt 4.5.3.1). Da die Reaktionslösung unmittelbar nach dem Start der Reaktion auf die beiden Küvetten des Polarimeters bzw. Photometers verteilt wurde, betrug die Volumina $2000 \text{ }\mu\text{L}$ Substratlösung und

200 μL verdünnte Enzymlösung.

Alle online-Methoden erlaubten eine Erfassung der Messdaten in zeitlichen Intervallen von 1 s.

Die mathematische Identifizierung der Modellparameter beruhte auf den Methoden aus Abschnitt 4.7 zur nichtlinearen Regression durch Minimierung eines Fehlerkriteriums.

Da die Aktivitäten der gelösten Enzyme (Tab. 4, S. 43) für kinetische Untersuchungen zu hoch waren, wurden die Enzymlösungen geeignet verdünnt, aliquotiert und in Portionen zu je 110 μL bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Verdünnungen wurden anhand von Aktivitätstests so festgelegt, dass zum einen die Messung der Anfangsreaktionsraten möglich war. Zum anderen erforderten dynamische Umsetzungen bis zum thermodynamischen Gleichgewicht der Reaktion eine höhere Enzymkonzentration, um im Reaktionszeitraum sowohl eine Enzyminaktivierung (Abschnitte 5.1.2.3 und 5.2.1.1) als auch die spontane Racemisierung des Benzylhydantoin vernachlässigen zu können. Die Bemessung der Reaktionszeit folgte aus dem Kriterium, unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine Konzentrationsabnahme des enantiomerenreinen Substrats infolge Racemisierung von maximal 2,5 % der Anfangskonzentration zuzulassen. Damit resultierten für die Enzymlösungen verschiedene Verdünnungsfaktoren, die abhängig vom Versuchstyp in Tab. 7 dargestellt sind.

Enzym Substrat	Hydantoinase		L-Carbamoylase
	L-BnH	D-BnH	L-CPhe
	D,L-BnH		
Anfangsreaktionsraten	1:80	1:20	1:30
... mit Inhibitor	1:80		1:8
dynamische Umsetzungen	1:20	1:3	1:8

Tabelle 7: Verdünnungsfaktoren für die gelöste Hydantoinase und L-Carbamoylase aus Tab. 4, S. 43 bei verschiedenen enzymkinetischen Untersuchungen.

Die maximale Anfangskonzentration an Substrat richtete sich bei allen Experimenten nach den in Tab. 8 zusammengefassten Angaben von F. Sarfert [73] zur Löslichkeit in reinem Wasser. Jedoch zeigt die Arbeit von T. Waniek [93], dass durch Unterkühlung übersättigte L-Benzylhydantoinlösungen mit Konzentrationen größer 8 mM hergestellt werden konnten, die auch bei mechanischen Erschütterungen nicht auskristallisierten und somit für kinetische Untersuchungen geeignet waren.

	L-BnH	L-CPhe	L-Phe
Löslichkeit [mM]	4,3	9,0	163

Tabelle 8: Löslichkeiten der Reaktanten in reinem Wasser bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8,5 (nach [73]). Ein Racemat weist die doppelte Löslichkeit seiner Enantiomere auf.

4.7 Schätzung von Modellparametern und Berechnung ihrer Konfidenzintervalle

Die Parameter p_j einer enzymkinetischen Gleichung $r = f(\underline{c}; \underline{p})$ wurden mittels nichtlinearer Regression identifiziert ($\underline{c} = [c_1, \dots, c_h, \dots, c_K]^T$: Vektor der Substrat- und eventueller Inhibitorkonzentrationen, $\underline{p} = [p_1, \dots, p_j, \dots, p_N]^T$: Parametervektor). Dieses Verfahren erfordert im Gegensatz zu den Methoden nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee oder Hanes-Wolf keine Linearisierung der Geschwindigkeitsgleichungen und auch keine Maßnahmen zur Korrektur des bei einer Transformation verzerrten Messfehlers, da die experimentellen Daten direkt verwendet werden.

Als Messdaten wurden Anfangsreaktionsraten $r_{obs,i}^0$ in Abhängigkeit von verschiedenen Anfangskonzentrationen \underline{c}_i^0 sowie zeitliche Konzentrationsverläufe $c_{obs}(t_i)$ genutzt ($i = 1 \dots M$). Im letzteren Fall ergab sich die berechnete Konzentration $c_{calc}(t_i) = \int_{t_0}^{t_i} r dt$ durch numerische Integration der Geschwindigkeitsgleichung mit dem Simulationsprogramm ACSL (Mitchell and Gauthier Associates, Concord, MA, USA).

Die Identifizierung beruhte auf der Bestimmung von Parametern p_j , welche ein Gütekriterium χ^2 und damit die Abweichung zwischen Messdaten $X_{obs,i}$ und korrespondierenden Werten $X_{calc,i}$ des kinetischen Modells minimierten.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^M \left(\frac{X_{obs,i} - X_{calc,i}}{\sigma_i} \right)^2 \quad (40)$$

Zur Minimierung wurde der Optimierer OptdesX (Design Synthesis, Inc., Provo, UT, USA) verwendet, der neben den Standard-Gradientenverfahren über Suchverfahren wie das „Simulated Annealing“ verfügt.

Mit der Annahme einer für alle Messungen einheitlichen Standardabweichung σ des Messfehlers entsprach die Minimierung von χ^2 der Methode der kleinsten Fehlerquadrate [68].

$$\text{Fehlerquadratsumme: } FQS = \sum_{i=1}^M (X_{obs,i} - X_{calc,i})^2 \quad (41)$$

Hinsichtlich der enzymkinetischen Parameter erwiesen sich das Gütekriterium „Fehlerquadratsumme“ und der „Simulated Annealing“ Algorithmus als vorteilhaft.

Zur Bewertung des Fehlers eines geschätzten Parameters \hat{p}_j diene das nach einem Ansatz von Draper und Smith [24] berechnete 95%-Konfidenzintervall (siehe auch [38]):

$$P(\hat{p}_j - 2\sigma_{p_j} \leq p_j \leq \hat{p}_j + 2\sigma_{p_j}) \approx 95\% \quad (42)$$

Das heißt, der wahre Parameter p_j liegt mit 95%iger Wahrscheinlichkeit im Intervall $\hat{p}_j \pm 2\sigma_{p_j}$. Draper und Smith definieren den Standardfehler σ_{p_j} des Parameters p_j wie folgt:

$$\sigma_{p_j} = \sqrt{((\hat{Z}^T \hat{Z})^{-1})_{jj} s^2} \quad (43)$$

Hier bezeichnet der Index j das j -te Diagonalelement der invertierten Matrix $(\hat{Z}^T \hat{Z})^{-1}$, s^2 ist die Varianz der Regression

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^M (r_{obs,i}^0 - r(\underline{c}_i^0; \hat{\underline{p}}))^2}{N - M} \quad (44)$$

und

$$\hat{Z} = \left[\frac{\partial r(\underline{c}_i^0; \hat{\underline{p}})}{\partial \hat{p}_j} \right]_{1 \leq i \leq M, 1 \leq j \leq N} \quad (45)$$

eine Matrix mit den partiellen Ableitungen der Geschwindigkeitsgleichung nach den geschätzten Parametern. Gl. 44 und 45 beziehen sich auf die Parameteridentifizierung aus gemessenen Reaktionsraten.

5 Reaktionstechnische Beschreibung der Teilsysteme

5.1 Kinetik der Stoffumsetzung von Benzylhydantoin mit Hydantoinase

5.1.1 Kinetisches Modell

Die reversible Umsetzung des Modellsubstrats Benzylhydantoin zu Carbamoylphenylalanin mit Hydantoinase ist der erste Schritt des in der Einleitung vorgestellten Reaktionssystems zur Synthese enantiomerenreinen L-Phenylalanins. Für einen technischen Prozess stellt das kostengünstigere, racemische Benzylhydantoin, dessen L-Enantiomer von der in dieser Arbeit verwendeten L-selektiven Hydantoinase bevorzugt umgesetzt wird, das Edukt der Wahl dar. Da die Racemisierung des Benzylhydantoins bei geeigneten Versuchsbedingungen aufgrund ihrer geringen Geschwindigkeit vernachlässigbar ist, entspricht die Hydantoinase-katalysierte Reaktion einer kinetischen Racematspaltung.

Chen et al. entwickelten in einer ersten Veröffentlichung [12] zur kinetischen Racematspaltung ein mathematisches Modell, das auf irreversiblen uni-uni Reaktionen vom Michaelis-Menten Typ beruht. Später [13] folgte eine Erweiterung für den reversiblen Fall mit Teilreaktionen jeweils pseudo-erster Ordnung (Abb. 11 auf S. 46). Ein mechanistisch detaillierteres Reaktionsschema wie in Abb. 12 unter Berücksichtigung reversibler Enzym-Substrat-Komplexe wurde von Straathof et al. [85] entwickelt und bildete auch die Grundlage des kinetischen Modells der Hydantoinase. Als steady-state Kinetik ergibt sich aus diesem Reaktionsschema mit kompetitiver Inhibition durch das jeweils andere Substratenantiomer die Gesamtreaktionsrate $r^{Hy,L}$ für die Umsetzung von L-Benzylhydantoin nach Gl. 46:

$$-r^{Hy,L} = \frac{v_{max,f}^{Hy,L} \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhe}}{K_{eq}^{Hy}} \right)}{K_{m,L-BnH}^{Hy} \left(1 + \frac{c_{L-CPhe}}{K_{m,L-CPhe}^{Hy}} + \frac{c_{D-BnH}}{K_{m,D-BnH}^{Hy}} + \frac{c_{D-CPhe}}{K_{m,D-CPhe}^{Hy}} \right) + c_{L-BnH}} \quad (46)$$

Analog ist die Gleichung der Gesamtreaktionsrate $r^{Hy,D}$ aufgebaut, wobei die Indices „L“ und „D“ miteinander vertauscht sind. Die Gleichgewichtskonstante K_{eq}^{Hy} einer uni-uni-Reaktion ist definiert als:

$$\begin{aligned} K_{eq}^{Hy} &= \frac{c_{L-CPhe}}{c_{L-BnH}} \Big|_{t \rightarrow \infty} = \frac{c_{D-CPhe}}{c_{D-BnH}} \Big|_{t \rightarrow \infty} \\ &= \frac{v_{max,f}^{Hy,L}}{K_{m,L-BnH}^{Hy}} \frac{K_{m,L-CPhe}^{Hy}}{v_{max,r}^{Hy,L}} = \frac{v_{max,f}^{Hy,D}}{K_{m,D-BnH}^{Hy}} \frac{K_{m,D-CPhe}^{Hy}}{v_{max,r}^{Hy,D}} \end{aligned} \quad (47)$$

Division von Gl. 46 durch diejenige des D-Enantiomers führt auf die erweiterte Gleichung von Chen et al. [13]:

$$\frac{r^{Hy,L}}{r^{Hy,D}} = E \frac{c_{L-BnH} - c_{L-CPhe}/K_{eq}^{Hy}}{c_{D-BnH} - c_{D-CPhe}/K_{eq}^{Hy}} \quad (48)$$

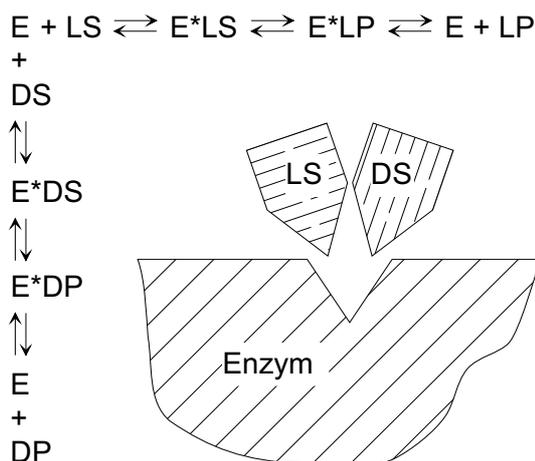


Abbildung 12: Reaktionsmechanismus für die Hydrolyse von D,L-Benzylhydantoin mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*.

Das für die Qualität einer kinetischen Racematspaltung entscheidende Verhältnis der Reaktionsraten lässt sich somit durch zwei Parameter beschreiben. Neben der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^{Hy} wurde hier als weitere konzentrationsunabhängige Größe die Enantioselektivität E definiert:

$$E = \frac{v_{max,f}^{Hy,L}}{K_{m,L-BnH}^{Hy}} \frac{K_{m,D-BnH}^{Hy}}{v_{max,f}^{Hy,D}} \quad (49)$$

Aus Gl. 48 folgt durch Integration und Einführung des Umsatzes U sowie des Enantiomerenüberschusses ee_S die Gl. 50 zur Identifizierung des Parameters E bei bekanntem K_{eq}^{Hy} mit Hilfe von Messwertpaaren U und ee_S :

$$E = \frac{\ln \left(1 - (1 + 1/K_{eq}^{Hy})(U + ee_S(1 - U)) \right)}{\ln \left(1 - (1 + 1/K_{eq}^{Hy})(U - ee_S(1 - U)) \right)} \quad (50)$$

$$\text{mit } U = 1 - \frac{c_{D-BnH} + c_{L-BnH}}{c_{D-BnH}^0 + c_{L-BnH}^0} \quad (51)$$

$$ee_S = \frac{c_{D-BnH} - c_{L-BnH}}{c_{D-BnH} + c_{L-BnH}}$$

Somit resultiert aus dem detaillierteren Modell unter Berücksichtigung reversibler Enzym-Substrat-Komplexe wiederum das Ergebnis von Chen et al. [13].

5.1.2 Voruntersuchungen

5.1.2.1 Gleichgewichtskonstante

Die Gleichgewichtskonstante ergab sich aus chromatografisch bestimmten Konzentrationen gemäß Gl. 47 zu $K_{eq}^{Hy} = 27,4$. Hierfür wurde 1 mL 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung, pH 8,5 zu Beginn des Experiments sowie nach Ablauf von zwei Stunden jeweils mit 10 μ L unverdünnter Hydantoinaselösung versetzt. Nach insgesamt vier Stunden wurde der pH-Wert kontrolliert und eine Probe mittels HPLC vermessen.

5.1.2.2 Enantioselektivität Voruntersuchungen von M. Schwickart [78] zum Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin zeigten, dass sowohl der pH-Wert als auch die Temperatur in weiten Bereichen variiert werden konnten, ohne die Enantioselektivität E signifikant zu beeinflussen. So verringerte sie sich im Temperaturintervall 25 ... 45 °C von $E = 4,1$ auf $E = 3,4$. Dieser Befund entspricht qualitativ den Ergebnissen einer Arbeit von Holmberg und Hult [32], lässt sich jedoch nicht durch die Beziehung

$$E_1^{T_1} = E_2^{T_2} \quad (52)$$

beschreiben, die für die Hydrolyse und Umesterung von 1-Phenethylbutyrat mit einer Lipase aus *Candida cylindracea* angegeben wird. Wichtig an dieser Stelle ist, dass die Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität nicht allein eine Enzymeigenschaft ist, sondern wesentlich durch das Substrat [44, 6], das Lösungsmittel für die Reaktion [61] und die Aufarbeitungsmethode des Enzyms [61] festgelegt wird.

Einen weitaus stärkeren Einfluss auf den maximal erreichbaren Enantiomerenüberschuß wies in diesem Zusammenhang die Gleichgewichtskonstante K_{eq}^{Hy} auf, die mit zunehmender Temperatur abnimmt, da die hydrolytische Spaltung von Benzylhydantoin exotherm verläuft.

Für die Variation des pH-Wertes im Bereich 7,5 bis 9,5 gelten sinngemäß die gleichen Aussagen wie für den Temperatureinfluss. Während sich die Enantioselektivität E nur geringfügig änderte (ein Befund, der auch bei anderen Enzymen beobachtet wurde [28]), bestimmte auch hier die Gleichgewichtskonstante, die bei der Verschiebung ins Basische von $K_{eq}^{Hy} = 5,3$ auf 102 anstieg, maßgeblich das Ergebnis der Umsetzung.

Weiterer Gegenstand der Voruntersuchungen war der Einfluss der Salzkonzentration (NaCl), der insofern interessierte, als für die Durchführung der Reaktion in der Versuchsanlage die Kontrolle des pH-Wertes durch Titration mit NaOH-Lösung vorgesehen war. Hierbei konnte im Konzentrationsbereich $c_{NaCl} = 0 \dots 0,2$ mM keine Abhängigkeit vom Salzgehalt festgestellt werden.

5.1.2.3 Stabilität der gelösten Hydantoinase Die Stabilität der gelösten Hydantoinase wurde untersucht, um für die im Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Experimente zur Parametrierung der kinetischen Gleichungen eine maximale Reaktionszeit abschätzen zu können, innerhalb derer der Einfluss durch Enzyminaktivierung vernachlässigbar war. Neben der Stabilität einer auf Eis gelagerten Hydantoinaselösung, die für die praktische Durchführung von Serienexperimenten bedeutsam ist, interessierte die Stabilität unter Reaktionsbedingungen und im Vergleich dazu bei Lagerung im Reaktionspuffer.

Für ein Experiment wurden 200 μ L 1:10 verdünnte Hydantoinaselösung (Tab. 4, S. 43) mit 800 μ L Reaktionspuffer (0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5) bzw. 800 μ L 8mM D,L-Benzylhydantoinlösung, pH 8,5 versetzt. Je ein Ansatz mit dem Reaktionspuffer lagerte für ca. vier Stunden auf Eis bzw. bei der Reaktionstemperatur 37 °C. Der Ansatz mit der Reaktionslösung wurde ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Aktivitätstests erfolgten über die polarimetrische Bestimmung der Anfangsre-

aktionsrate (Abschnitt 4.5.2.2), indem 100 μL einer Inkubationslösung zu 1000 μL 8mM D,L-Benzylhydantoinlösung, pH 8,5 zugegeben wurden.

Im Untersuchungszeitraum konnte für die auf Eis gelagerte Hydantoinaselösung keine Inaktivierung festgestellt werden, so dass diese Methode eine einfache Handhabung des Enzyms bei der praktischen Arbeit erlaubte. Die auf die jeweiligen Werte zum Zeitpunkt $t = 0$ bezogenen Aktivitäten der beiden anderen Versuchsreihen sind in Abb. 13 dargestellt. Im Fall der Inkubation

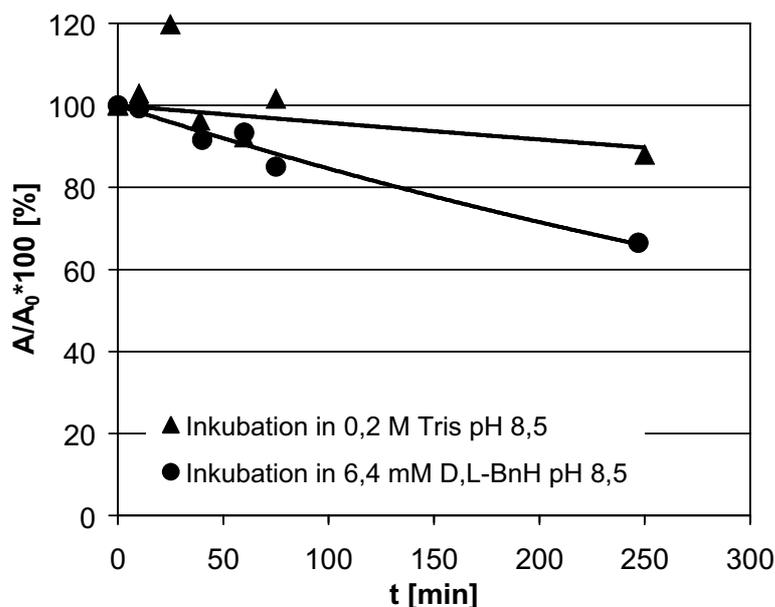


Abbildung 13: Stabilität der rekombinanten Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

der Hydantoinase mit der Reaktionslösung zeigt sich eine stärkere Inaktivierung als bei der Lagerung im Reaktionspuffer. Da die Messwerte für den Ansatz mit dem Reaktionspuffer jedoch stark streuten, ließ sich nicht mit Sicherheit sagen, dass die Anwesenheit von Benzylhydantoin oder Carbamoylphenylalanin die Stabilität der Hydantoinase verringerte.

Die quantitative Auswertung der Messdaten beruhte auf einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung, was im mechanistischen Sinne der Lösung einer einzelnen Bindung im Enzym entspricht. Es ergaben sich die Halbwertszeiten von $t_{1/2} = 29\text{ h}$ (Reaktionspuffer) bzw. $t_{1/2} = 7\text{ h}$ (Reaktionslösung). Diese geringe Stabilität schloß die technische Anwendung der gelösten Hydantoinase von vornherein aus, jedoch war sie für kinetische Untersuchungen ausreichend, da sich ein akzeptabler Verlust von 5 % der anfänglichen Enzymaktivität erst nach 30 min Reaktionszeit einstellte. Detailliertere Modelle der Enzyminaktivierung in mehreren Schritten, wie z.B. die von Dagsys et al. [18] beschriebene Inaktivierung einer D-Hydantoinase aus *Bacillus circulans* wurden nicht betrachtet, da der erhöhte experimentelle Aufwand zur Modellparametrierung dem Ziel einer ersten Abschätzung widersprach.

Eine überaus deutliche Verbesserung der Stabilität erreichte K. Ragnitz [69] durch Immobilisierung der Hydantoinase an eine polymere Matrix (Abschnitt 5.3).

5.1.3 Modellvalidierung

5.1.3.1 Schätzung der kinetischen Parameter aus Anfangsreaktionsraten Die Schätzung der kinetischen Parameter in Gl. 46 erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden Anfangsreaktionsraten gemäß dem im Abschnitt 4.6 erläuterten Standardassay bestimmt.

Mit der Beschränkung auf Anfangsreaktionsraten entfallen in Gl. 46 diejenigen Terme, die den Einfluss des Produkts Carbamoylphenylalanin abbilden. Ebenso verschwinden aufgrund der Umsetzung enantiomerenreiner Substrate bei vernachlässigbarer Racemisierung alle Konzentrationen der jeweils entgegengesetzten Substrat- und Produktenantiomere. Damit vereinfacht sich Gl. 46 zu einer reinen Michaelis-Menten Kinetik

$$-r^{Hy,L} = \frac{v_{max,f}^{Hy,L} c_{L-BnH}}{K_{m,L-BnH}^{Hy} + c_{L-BnH}} \quad (53)$$

und es bleiben die kinetischen Parameter $v_{max,f}^{Hy,L}$ und $K_{m,L-BnH}^{Hy}$ bzw. $v_{max,f}^{Hy,D}$ und $K_{m,D-BnH}^{Hy}$ für die Rate $r^{Hy,D}$ übrig.

Abb. 14 stellt die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate von der Anfangskonzentration an L-Benzylhydantoin im Bereich $c_{L-BnH} = 1 \dots 4$ mM dar. Es ist deutlich, dass die Kinetik im untersuchten Konzentrationsbereich nicht durch eine Reaktion 1. Ordnung angenähert werden kann. Andererseits wurde die für eine statistisch sichere Identifizierung insbesondere der Michaelis-Menten Konstante $K_{m,L-BnH}^{Hy}$ notwendige Substratsättigung aufgrund der geringen Löslichkeit des Benzylhydantoin nicht erreicht (Duggelby und Clarke [26] empfehlen z.B. eine Substratanfangskonzentration, die das Zwei- bis Dreifache der Michaelis-Menten Konstante beträgt). Trotz der erhöhten statistischen Unsicherheit stimmen die zu $v_{max,f}^{Hy,L} = 3,97$ mmol/(g s) und $K_{m,L-BnH}^{Hy} = 4,05$ mM geschätzten Parameter gut mit den Ergebnissen von T. Waniek [93] überein, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

In gleicher Art und Weise erfolgten Experimente mit D-Benzylhydantoin als Substrat, deren Ergebnisse Abb. 15 zeigt. Als Resultat der Parameterschätzung wurden $v_{max,f}^{Hy,D} = 0,23$ mmol/(g s) und $K_{m,D-BnH}^{Hy} = 0,78$ mM erhalten.

Das Verhältnis der Maximalraten $v_{max,f}^{Hy,L} / v_{max,f}^{Hy,D} = 17,3$ verdeutlicht, dass die untersuchte Hydantoinase das Substrat L-Benzylhydantoin bevorzugt umsetzte. Unerwartet und bisher nicht in der Literatur beschrieben (vgl. Tab. 1, S. 23) war jedoch die höhere Affinität des Enzyms zum schlechter umgesetzten Substrat D-Benzylhydantoin, wie sie die im Vergleich mit $K_{m,L-BnH}^{Hy}$ um den Faktor 0,2 kleinere Michaelis-Menten Konstante $K_{m,D-BnH}^{Hy}$ belegt. Die nach Gl. 49 (S. 53) aus den kinetischen Parametern berechnete Enantioselektivität ($E = 3,3$) bestätigte das Ergebnis der Voruntersuchung, bei der racemisches Substrat umgesetzt und E direkt aus Messwerten gemäß Gl. 50 erhalten wurde.

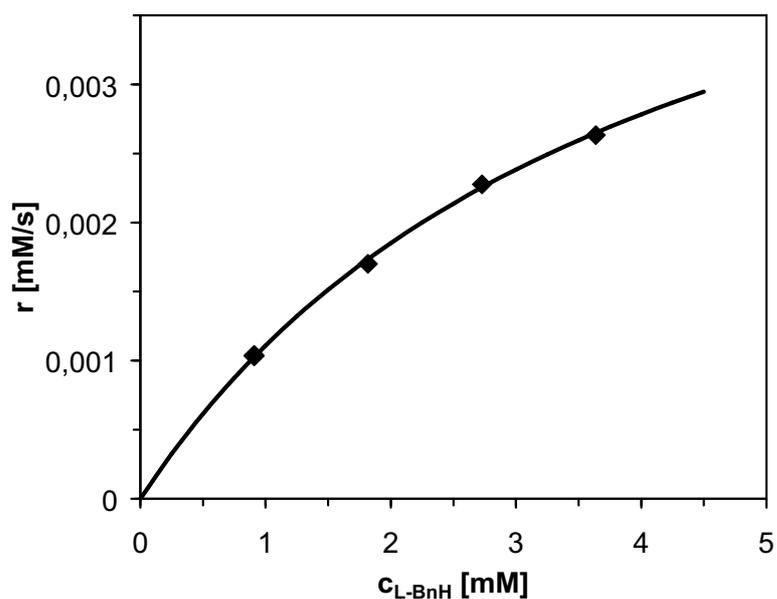


Abbildung 14: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate von der Anfangskonzentration bei der Hydrolyse von L-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aure-scens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

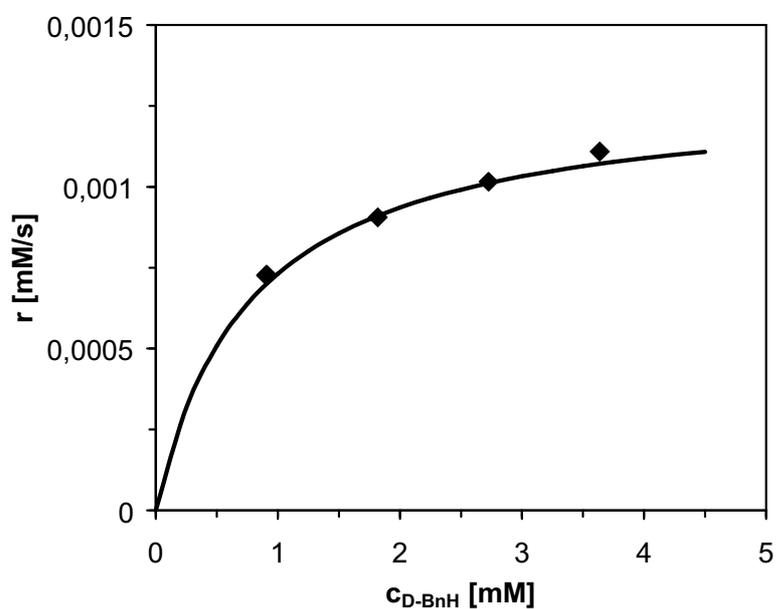


Abbildung 15: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate von der Anfangskonzentration bei der Hydrolyse von D-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aure-scens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

5.1.3.2 Vergleich der kinetischen Parameter für Wildtyp-Enzym und rekombinante Hydantoinase In Zusammenarbeit mit T. Waniek [93] erfolgten zur Etablierung der auf der Polarimetrie beruhenden analytischen Methoden erste kinetische Untersuchungen mit einer erstmals von O. May [57, 55] aufgereinigten Wildtyp-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Durch Unterkühlung wurden übersättigte metastabile L- bzw. D-Benzylhydantoinlösungen mit Konzentrationen $> 4,3$ mM hergestellt, so dass die kinetischen Parameter im Vergleich zu Abschnitt 5.1.3.1 mit einer größeren statistischen Sicherheit geschätzt werden konnten.

Die Ergebnisse für die Umsetzung der Substrate L-Benzylhydantoin bzw. D-Benzylhydantoin sind in den Abb. 16 und 17 zusammengefasst. Gefunden wurden die in Tab. 9 angegebenen kinetischen Parameter. Ein Vergleich mit der rekombinanten Hydantoinase (DSM 3747) aus Abschnitt 5.1.3.1 zeigt, dass beinahe alle Parameter bei einer maximalen Abweichungen von 15 % gut mit-

Parameter	$v_{max, f}^{Hy, L}$ [mmol/(g s)]	$K_{m, L-BnH}^{Hy}$ [mM]	$v_{max, f}^{Hy, D}$ [mmol/(g s)]	$K_{m, D-BnH}^{Hy}$ [mM]
	7,1	4,32	0,26	0,76

Tabelle 9: Kinetische Parameter für die Hydrolyse von L- bzw. D-Benzylhydantoin mit Wildtyp-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745.

einander übereinstimmen. Lediglich die spezifische Maximalrate $v_{max, f}^{Hy, L}$ bei der Umsetzung von L-Benzylhydantoin war für die Wildtyp-Hydantoinase (DSM 3745) etwa um den Faktor 1,8 erhöht, womit eine geringfügige Verbesserung der Enantioselektivität E von 3,3 auf 4,8 einherging. Insgesamt bleibt festzustellen, dass die kinetische Charakterisierung der Wildtyp-Hydantoinase keine signifikanten Unterschiede zur rekombinanten Hydantoinase ergab und die bestehenden Abweichungen einzelner Parameter wahrscheinlich auf statistische Streuung, verursacht z.B. durch geringfügig veränderte Fermentations- oder Aufreinigungsbedingungen, zurückzuführen sind.

5.1.3.3 Dynamische Simulation der Stoffumsetzung und Schätzung kinetischer Parameter Der Einfluss des Reaktionsprodukts L-Carbamoylphenylalanin auf die Umsetzung von L-Benzylhydantoin wird in Gl. 46 durch die Michaelis-Menten Konstante $K_{m, L-CPh_e}^{Hy}$ berücksichtigt. Entsprechendes gilt beim Substrat D-Benzylhydantoin für die Michaelis-Menten Konstante $K_{m, D-CPh_e}^{Hy}$. Diese beiden kinetischen Parameter wurden nicht anhand der Rückreaktionen bestimmt, da das thermodynamische Gleichgewicht stark auf Seiten des Carbamoylphenylalanins liegt und die notwendigen Experimente somit infolge langer Reaktionszeiten durch Enzyminaktivierung und Racemisierung stark beeinflusst gewesen wären. Stattdessen erfolgte die Parameterschätzung mit Hilfe von dynamischen Experimenten gemäß Abschnitt 4.6, bei denen die zeitlichen Konzentrationsverläufe der Reaktanten für verschiedene Anfangssubstratkonzentrationen annähernd bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts online (Abschnitt 4.5.2.1) gemessen wurden.

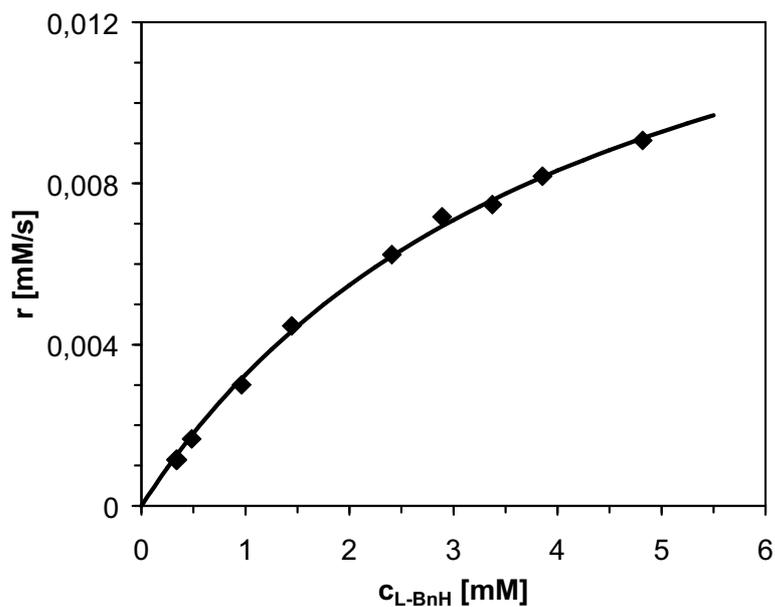


Abbildung 16: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate von der Anfangskonzentration bei der Hydrolyse von L-Benzylhydantoin mit Wildtyp-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

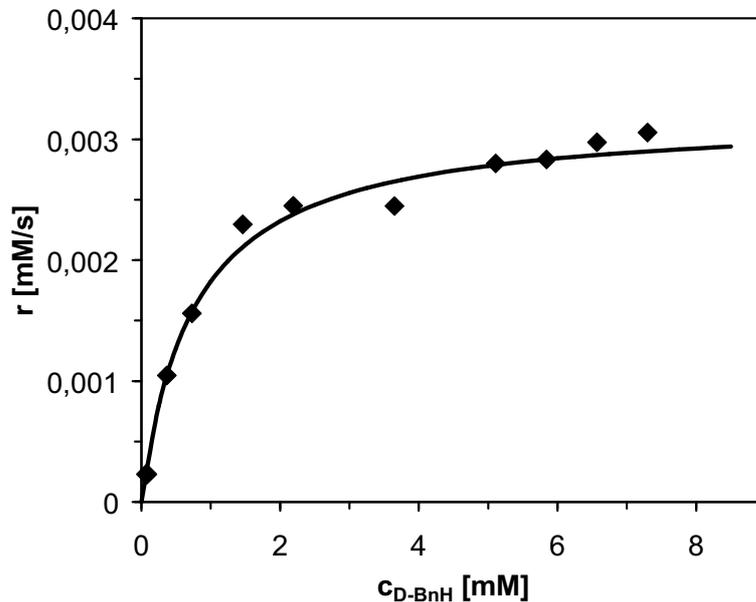


Abbildung 17: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate von der Anfangskonzentration bei der Hydrolyse von D-Benzylhydantoin mit Wildtyp-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

Aufgrund der Umsetzung enantimerenreiner Substrate verschwinden in Gl. 46 bei vernachlässigbarer Racemisierung alle Terme, die sich auf das jeweils entgegengesetzte Substrat- oder Produkt- enantiomer beziehen, und es folgt die vereinfachte Gl. 54 für das Substrat L-Benzylhydantoin:

$$-r^{Hy,L} = \frac{v_{max,f}^{Hy,L} \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhE}}{K_{eq}^{Hy}} \right)}{K_{m,L-BnH}^{Hy} \left(1 + \frac{c_{L-CPhE}}{K_{m,L-CPhE}^{Hy}} \right) + c_{L-BnH}} \quad (54)$$

Für die Identifizierung der Michaelis-Menten Konstante $K_{m,L-CPhE}^{Hy}$ wurde Gl. 54 numerisch integriert und der erhaltene Verlauf zur Berechnung eines Fehlerkriteriums mit den experimentell bestimmten Konzentrationen verglichen (Abschnitt 4.7). Diese Prozedur umfasste mehrere Integrationen mit unterschiedlichen Anfangssubstratkonzentrationen, so dass in das Fehlerkriterium der Informationsgehalt verschiedener Experimente einfluss. Zur Reduzierung des Rechenaufwands arbeitete der entsprechende Algorithmus nicht mit der vollständigen Anzahl an online-Messwerten (900 Messdaten in 15 min), sondern ohne Qualitätseinbußen jeweils mit einer Auswahl von 10 bis 15 äquidistanten Datenpunkten.

Neben der Michaelis-Menten Kostante $K_{m,L-CPhE}^{Hy}$ (bzw. $K_{m,D-CPhE}^{Hy}$) enthält Gl. 54 als weiteren unbekanntem kinetischen Parameter die Gleichgewichtskonstante K_{eq}^{Hy} , die aus den Voruntersuchungen (Abschnitt 5.1.2.1) übernommen wurde.

Abb. 18 fasst die zeitlichen Konzentrationsverläufe bei der Umsetzung von L-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase für vier verschiedene Anfangskonzentration im Bereich $c_{L-BnH} = 0,9 \dots 3,6$ mM zusammen. Die Parameterschätzung unter Verwendung aller dargestellten Messdaten ergab für $K_{m,L-CPhE}^{Hy}$ einen Wert größer 1000 mM. Daher konnte der Term $c_{L-CPhE}/K_{m,L-CPhE}^{Hy}$ in Gl. 54 als vernachlässigbar entfallen, weshalb die Rückreaktion von L-Phenylalanin zu L-Benzylhydantoin einer Reaktion 1. Ordnung folgte.

Völlig analog verliefen Experimente mit dem Substrat D-Benzylhydantoin, deren Ergebnisse Abb. 19 zeigt, und es resultierte die Michaelis-Menten Kostante zu $K_{m,D-CPhE}^{Hy} = 11,23$ mM.

Die im Abschnitt 5.1.3.1 identifizierten Parameter wurden hier zum Teil unverändert übernommen ($v_{max,f}^{Hy,L}$, $v_{max,f}^{Hy,D}$) oder dienten als Startwerte ($K_{m,L-BnH}^{Hy}$, $K_{m,D-BnH}^{Hy}$), die bei der Schätzung von $K_{m,L-CPhE}^{Hy}$ bzw. $K_{m,D-CPhE}^{Hy}$ um maximal 20 % verändert werden durften. Abschließend gibt Tab. 10 einen Überblick über die konsolidierten kinetischen Parameter der Hydantoinase und ihre 95%-Konfidenzintervalle (Abschnitt 4.7).

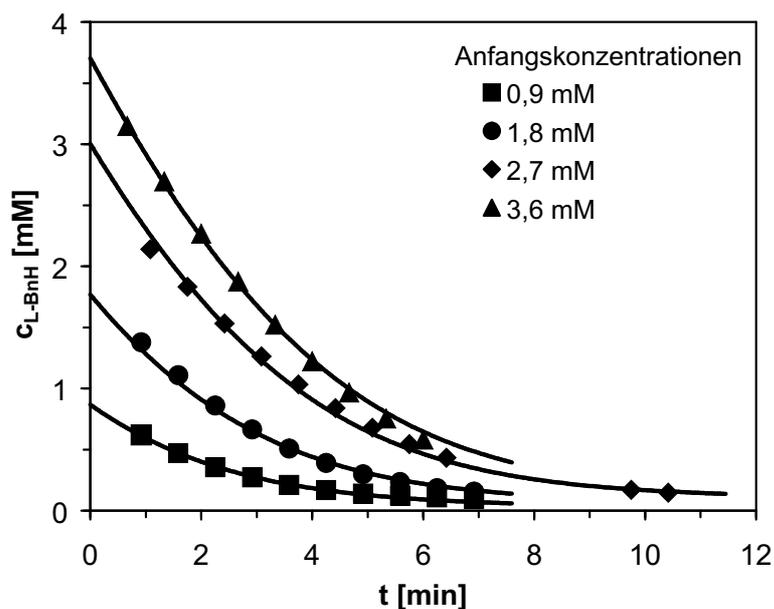


Abbildung 18: Zeitliche Konzentrationsverläufe bei der Umsetzung von L-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

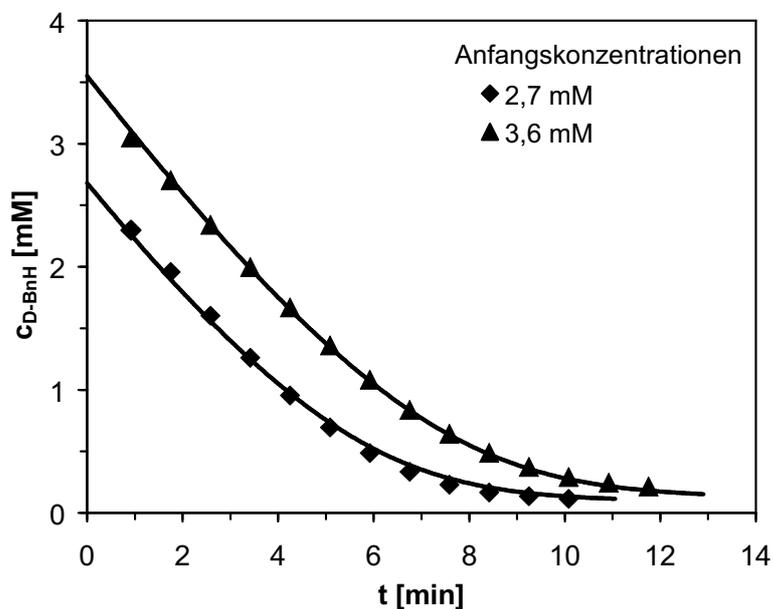


Abbildung 19: Zeitliche Konzentrationsverläufe bei der Umsetzung von D-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

Parameter	$K_{m,L-BnH}^{Hy}$	$v_{max,f}^{Hy,D}$	$K_{m,D-BnH}^{Hy}$	$K_{m,D-CPhe}^{Hy}$	K_{eq}^{Hy}	$K_{i,L-Phe}^{Hy}$ (s. 5.1.3.4)
[mmol/(g s)]	[mM]	[mmol/(g s)]	[mM]	[mM]	[-]	[mM]
3,97	3,58	0,23	0,64	11,23	27,4 ¹	30,45
95%-Konfidenzintervall (vgl. Abschnitt 4.7)						
±11,6 %	±19,2 %	±10,4 %	±37,8 %	≤ ±40 %	±6,3 %	±10,9 %

Tabelle 10: Kinetische Parameter für die Hydrolyse von Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*.

Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin

Zur gemeinsamen Verifikation der kinetischen Parameter in Tab. 10 sowie des aus Gl. 46 abgeleiteten Gesamtmodells, das für racemisches Substrat die simultane Umsetzung von L-Benzylhydantoin gemäß Gl. 55 und von D-Benzylhydantoin gemäß Gl. 56 umfasst, wurden Experimente mit verschiedenen Anfangskonzentrationen an D,L-Benzylhydantoin bis in die Nähe des thermodynamischen Gleichgewichts durchgeführt (Abschnitt 4.6).

$$-r^{Hy,L} = \frac{v_{max,f}^{Hy,L} \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhe}}{K_{eq}^{Hy}} \right)}{K_{m,L-BnH}^{Hy} \left(1 + \frac{c_{D-BnH}}{K_{m,D-BnH}^{Hy}} + \frac{c_{D-CPhe}}{K_{m,D-CPhe}^{Hy}} \right) + c_{L-BnH}} \quad (55)$$

$$-r^{Hy,D} = \frac{v_{max,f}^{Hy,D} \left(c_{D-BnH} - \frac{c_{D-CPhe}}{K_{eq}^{Hy}} \right)}{K_{m,D-BnH}^{Hy} \left(1 + \frac{c_{D-CPhe}}{K_{m,D-CPhe}^{Hy}} + \frac{c_{L-BnH}}{K_{m,L-BnH}^{Hy}} \right) + c_{D-BnH}} \quad (56)$$

Dabei ermöglichte die im Abschnitt 4.5.3.1 beschriebene Kombination aus Polarimetrie und Photometrie eine kontinuierliche Erfassung der Konzentrationen beider Substrat- sowie Produktenantimere.

Die in Abb. 20 zusammen mit den experimentellen Daten dargestellten Modellsimulationen wurden ohne weitere Optimierung der kinetischen Parameter aus Tab. 10 berechnet, welche wie beschrieben allein mit Hilfe von Umsetzungen enantiomerenreiner Substrate identifiziert worden waren. Dass diese Parameter geeignet sind, die Reaktion von D,L-Benzylhydantoin zu D,L-Carbamoylphenylalanin ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Messwerten abzubilden, bestätigt das kinetische Modell sowie die zugehörigen Gl. 55 und 56. Alle weiteren Simulationen in dieser Arbeit beruhen daher auf den in Tab. 10 zusammengefassten kinetischen Parametern.

Anschaulich belegen in Abb. 20 die dynamischen Verläufe mit dem Substrat D,L-Benzylhydantoin die bereits bei den Untersuchungen mit enantiomerenreinem Benzylhydantoin festgestellte Eigen-

¹ K_{eq}^{Hy} wurde unabhängig von den übrigen Parametern bestimmt (Abschnitt 5.1.2.1).

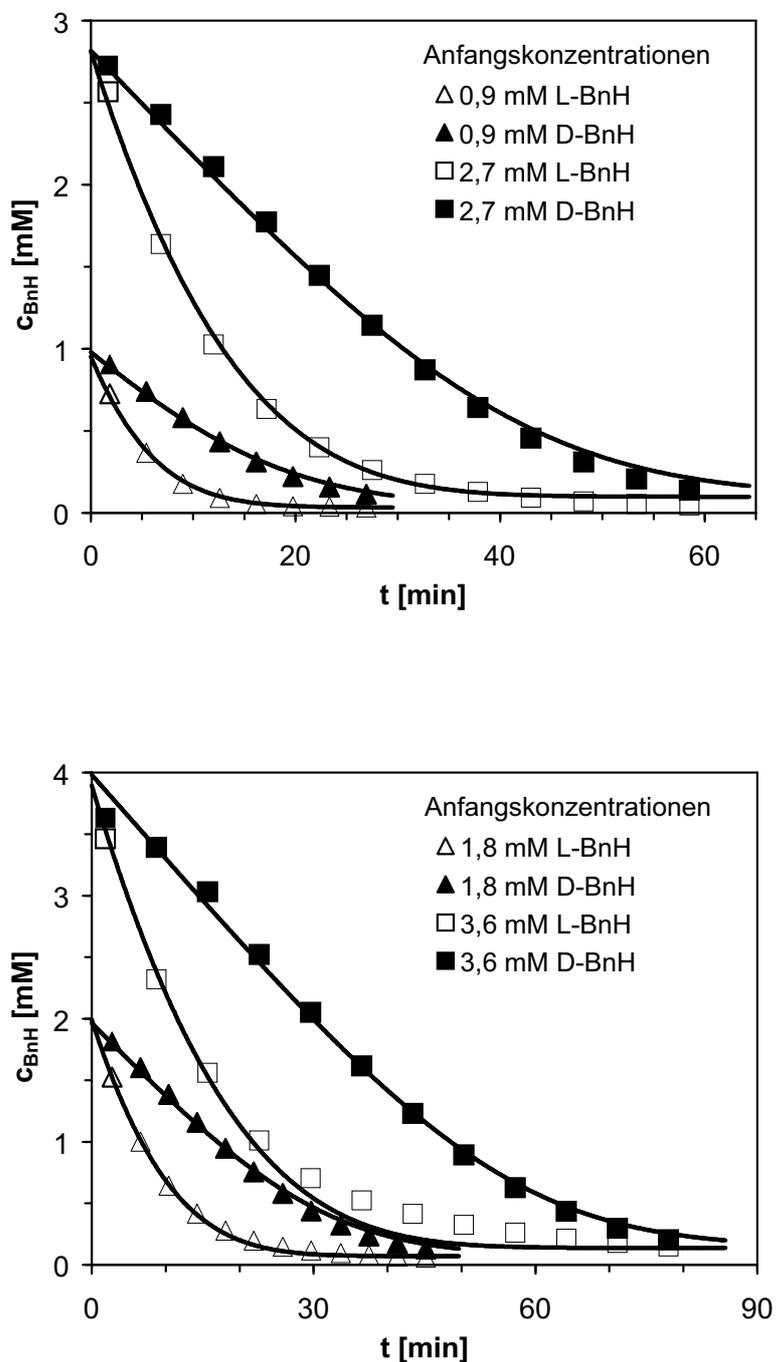


Abbildung 20: Zeitliche Konzentrationsverläufe bei der Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

schaft der rekombinanten Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*, das L-Substrat bevorzugt umzusetzen.

5.1.3.4 Wechselwirkung mit der Carbamoylase-katalysierten Reaktion, Inhibition durch L-Penylalanin Neben den vier Spezies D,L-Benzylhydantoin und D,L-Carbamoylphenylalanin, die das Substrat bzw. das Produkt der Hydantoinase sind, gehört zu dem gesamten Reaktionssystem darüber hinaus das L-Penylalanin, welches als Produkt der Carbamoylase-katalysierten Reaktion entsteht. Da für die Versuchsanlage der Einsatz beider Enzyme am gleichen Ort vorgesehen war, ergab sich die Frage nach einem eventuellen inhibitorischen Einfluss des L-Penylalanins auf die Hydantoinase, auch wenn für die in der Einleitung beschriebenen Hydantoinasen keine solche Inhibierung bekannt ist.

Zunächst wurde mit entsprechenden Aktivitätstests ausgeschlossen, dass die Hydantoinase oder eine unbekannte Verunreinigungen in der Enzymlösung L-Phenylalanin umsetzt. Da nun die Konzentration an L-Phenylalanin während eines Experiments als konstant angesehen werden konnte, war das polarimetrische Verfahren zur Bestimmung von Anfangsreaktionsraten gemäß Abschnitt 4.5.2.2 als analytische Methode für eine Inhibitionsstudie geeignet. Wie Abb. 21 zeigt, wurde für die beiden Inhibitorkonzentrationen $c_{L-Phe} = 9 \text{ mM}$ und $c_{L-Phe} = 39 \text{ mM}$ jeweils die Konzentration des Substrats L-Benzylhydantoin im Bereich $c_{L-BnH} = 0,9 \dots 3,6 \text{ mM}$ variiert und die Anfangsreaktionsraten bestimmt. Deutlich zu erkennen ist die zunehmende Inhibition der Umsetzung von

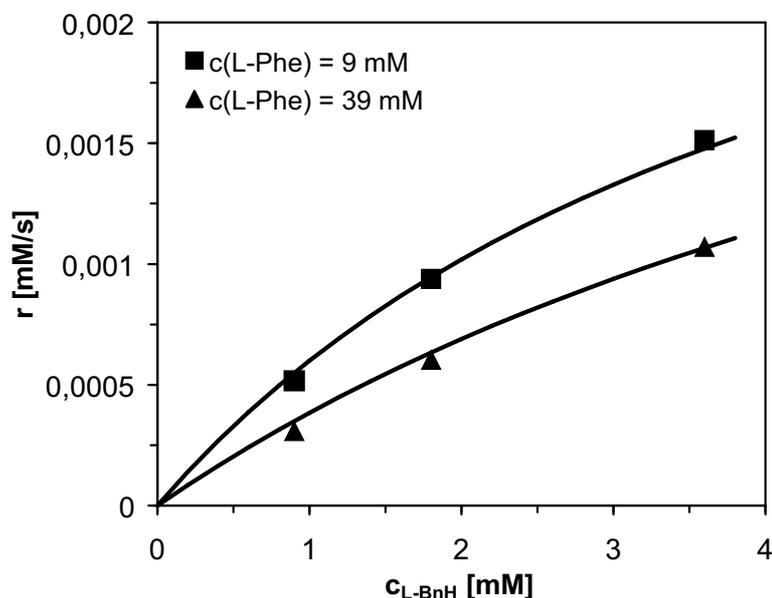


Abbildung 21: Einfluss des kompetitiven Inhibitors L-Phenylalanin auf die Anfangsreaktionsrate bei der Hydrolyse von L-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

Benzylhydantoin mit steigender Konzentration an L-Phenylalanin. Im reaktionskinetischen Modell wird dies durch einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus berücksichtigt, so dass Gl. 55 um die Inhibitionskonstante $K_{i,L-Phe}^{Hy}$ ergänzt auf Gl. 57 führt:

$$-r^{Hy,L} = \frac{v_{max,f}^{Hy,L} \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhe}}{K_{eq}^{Hy}} \right)}{K_{m,L-BnH}^{Hy} \left(1 + \frac{c_{D-BnH}}{K_{m,D-BnH}^{Hy}} + \frac{c_{D-CPhe}}{K_{m,D-CPhe}^{Hy}} + \frac{c_{L-Phe}}{K_{i,L-Phe}^{Hy}} \right) + c_{L-BnH}} \quad (57)$$

Die Inhibitionskonstante wurde analog zu dem im Abschnitt 5.1.3.1 erläuterten Vorgehen unter Verwendung aller in Abb. 21 dargestellten Anfangsreaktionsraten mit Gl. 57 und den weiteren kinetischen Parametern aus Tab. 10 zu $K_{i,L-Phe}^{Hy} = 30,45$ mM geschätzt.

Eine detaillierte Untersuchung des Einflusses von L-Phenylalanin auf die Umsetzung von D-Benzylhydantoin erfolgte nicht, da sich dieser bei der Simulation des Gesamtsystems als vernachlässigbar erwies.

5.1.4 Einfluss des pH-Werts

Ein wichtiger Aspekt bei der Auslegung eines enzymkatalysierten Prozesses ist die Abhängigkeit der maximalen Reaktionsrate vom pH-Wert. Zur Absicherung entsprechender Untersuchungen mit anderem Substrat (Indolylmethylhydantoin bei K. Ragnitz [69]) bzw. der Wildtyp-Hydantoinase (Dombach [23]) wurden wie in Abschnitt 5.1.3.1 Anfangsreaktionsraten für die Umsetzung von 3,6 mM L-Benzylhydantoin bei verschiedenen pH-Werten experimentell bestimmt. Wie das Ergebnis in Abb. 22 zeigt, weist die Reaktionsrate bezüglich des pH-Werts ein Maximum auf. Dieses Verhalten kann mit einem kinetischen Modell beschrieben werden, bei dem das aktive Zentrum des Enzyms (mindestens) eine ionisierbare zweiprotonige Säuregruppe enthält, die an der Substratbindung oder dem katalytischen Schritt beteiligt ist. Mit der Annahme, dass alle drei Dissoziationsstufen des Enzyms das Substrat binden, aber nur eine ionische Form katalytisch aktiv ist, gibt Segel [79] die folgende Gleichung für die Maximalrate v_{max} an:

$$v_{max} = \frac{v_{max}^{lim}}{1 + \frac{c_{H^+}}{K_{SE1}} + \frac{K_{SE2}}{c_{H^+}}} \quad (58)$$

Bezüglich des Substrats impliziert das Modell eine gleichbleibende Ladung im betrachteten pH-Bereich. Zudem ist das Proton H^+ in Gl. 58 formal ebenfalls ein Substrat, welches nach einem Substrat-Inhibitions-Mechanismus umgesetzt wird.

Eine nichtlineare Regression ergab für die Dissoziationskonstanten K_{SE1} und K_{SE2} die Werte $pK_{SE1} = 8,2$ bzw. $pK_{SE2} = 9,2$. Daraus resultiert eine maximale Reaktionsrate bei pH 8,7. Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen von K. Ragnitz [69] und Dombach [23] überein, die die Lage des Optimums mit pH 8,5 angeben. Eine Einschränkung der Gültigkeit erfährt das erläuterte Modell durch den pK_S -Wert des Substrats Benzylhydantoin ($pK_S = 8,7$), so dass das experimentelle

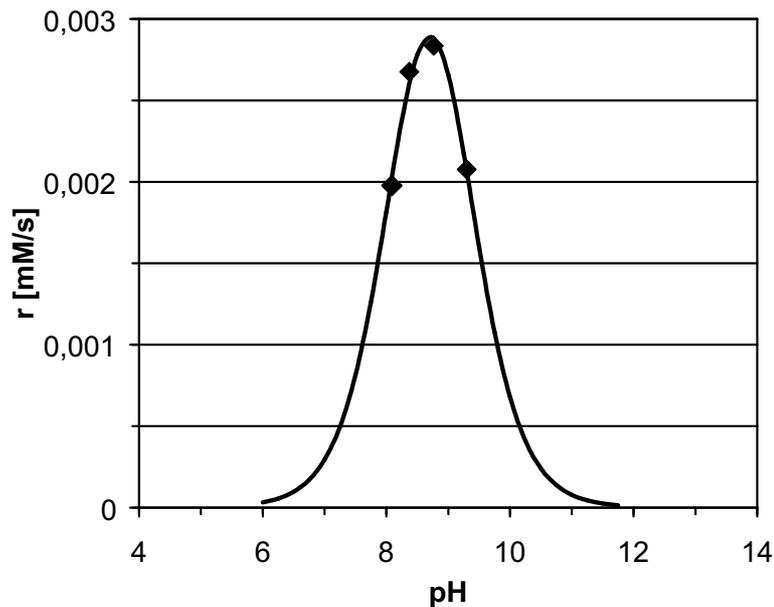


Abbildung 22: Einfluss des pH-Werts auf die Anfangsreaktionsrate bei der Umsetzung von 3,6 mM L-Benzylhydantoin mit rekombinanter Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

Ergebnis nicht notwendigerweise allein der Dissoziation einer zweiprotonigen Gruppe im aktiven Zentrum zugeschrieben werden kann.

5.2 Kinetik der Stoffumsetzung von L-CPhe mit L-Carbamoylase

5.2.1 Kinetische Modellierung und Voruntersuchungen

Die Zielverbindung L-Phenylalanin entsteht als Endprodukt einer Folgereaktion, deren zweiter Schritt eine durch L-Carbamoylase katalysierte hydrolytische Spaltung von L-Carbamoylphenylalanin ist, welches als Produkt des in Abschnitt 5.1 dargestellten ersten Reaktionsschritts gebildet wird. Voruntersuchungen zur Kinetik der Stoffumsetzung von L-Carbamoylphenylalanin mit gelöster L-Carbamoylase (Tab. 4, S. 43) zeigten, dass

- die Reaktion irreversibel abläuft,
- das Enzym spezifisch für das Substrat L-Carbamoylphenylalanin ist,
- das Produkt L-Phenylalanin die Reaktion kompetitiv inhibiert,
- sowohl D,L-Benzylhydantoin als auch D-Carbamoylphenylalanin keinen (inhibitorischen) Einfluss auf die L-Carbamoylase hat.

Als steady-state Kinetik ergibt sich aus diesen Bedingungen mit einem Michaelis-Menten Ansatz die Gesamtreaktionsrate r^{Ca} für die Umsetzung von L-Carbamoylphenylalanin nach Gl. 59:

$$-r^{Ca} = \frac{v_{max}^{Ca} c_{L-CPhe}}{K_{m,L-CPhe}^{Ca} \left(1 + \frac{c_{L-Phe}}{K_{i,L-Phe}^{Ca}} \right) + c_{L-CPhe}} \quad (59)$$

Alle Experimente zur Identifizierung der kinetischen Parameter v_{max}^{Ca} , $K_{m,L-CPhe}^{Ca}$ und $K_{i,L-Phe}^{Ca}$ wurden wie im Abschnitt 4.6 beschrieben durchgeführt.

5.2.1.1 Stabilität der gelösten L-Carbamoylase Analog zu dem im Abschnitt 5.1.2.3 beschriebenen Vorgehen wurde die Stabilität der gelösten L-Carbamoylase untersucht. Die auf Eis gelagerte und im Reaktionspuffer gelöste L-Carbamoylase erlitt wie schon die Hydantoinase innerhalb von vier Stunden keinen Aktivitätsverlust. Abb. 23 zeigt hingegen die mit der Zeit fortschreitende Inaktivierung der bei 37 °C, pH 8,5 im Reaktionspuffer bzw. in 7,2 mM L-Carbamoylphenylalaninlösung inkubierten L-Carbamoylase. Dabei wies die L-Carbamoylase in Gegenwart ihres Substrats eine deutlich geringere Stabilität auf, wie es auch die Halbwertszeiten $t_{1/2} = 2$ h (Reaktionspuffer) bzw. $t_{1/2} = 0,9$ h (Reaktionslösung) verdeutlichen. Das Substrat verursachte vermutlich eine Änderung in der Konformation des Enzyms, die der Denaturierung weniger widerstand. Im Vergleich mit der gelösten Hydantoinase liegen diese Halbwertszeiten um zirka eine Größenordnung niedriger. Für die kinetischen Untersuchungen folgte somit, dass die maximale Reaktionszeit lediglich wenige Minuten betragen durfte, da sich ein akzeptabler Verlust von 5 % der ursprünglichen Aktivität bereits nach 4 min einstellt.

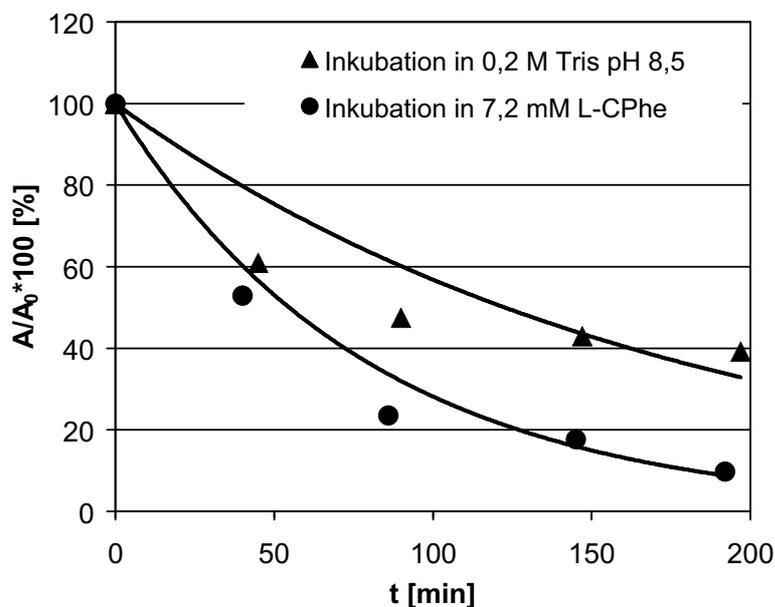


Abbildung 23: Stabilität der rekombinanten L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aureescens* unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ($T = 37$ °C).

Im übrigen erzielte K. Ragnitz [69] auch bei der L-Carbamoylase durch Immobilisierung an eine polymere Matrix (Abschnitt 5.3) eine überaus deutliche Verbesserung der Stabilität.

5.2.2 Modellvalidierung

5.2.2.1 Schätzung der kinetischen Parameter aus Anfangsreaktionsraten, Inhibition durch das Produkt L-Phenylalanin

Sämtliche kinetischen Parameter der Gl. 59 resultierten aus Anfangsreaktionsraten, die für verschiedene Anfangssubstratkonzentrationen mit Hilfe der polarimetrischen Methode (Abschnitt 4.5.2.2) bestimmt wurden. Reaktionslösungen für Inhibitionsstudien enthielten zusätzlich zum Substrat L-Carbamoylphenylalanin verschiedene Mengen an L-Phenylalanin.

Abb. 24 zeigt Anfangsreaktionsraten für verschiedene Anfangssubstratkonzentrationen im Bereich $c_{L-CPh_e}^0 = 0,9 \dots 8,2$ mM (zur Löslichkeit vgl. Tab. 8, S. 49). Aufgrund der Abwesenheit des Produkts L-Phenylalanin unter diesen experimentellen Bedingungen ($c_{L-Phe}^0 = 0$ mM) reduzierte sich Gl. 59 auf eine Reaktion vom Michaelis-Menten Typ, so dass die Parameter v_{max}^{Ca} und $K_{m,L-CPh_e}^{Ca}$ (Tab. 11) bestimmt werden konnten.

Den inhibitorischen Einfluss von L-Phenylalanin auf die Anfangsreaktionsrate verdeutlicht Abb. 25 ($c_{L-Phe}^0 \approx 25 \dots 100$ mM). Die dargestellten Messdaten bildeten zusammen mit den zuvor identifizierten Parametern die Grundlage zur Schätzung der Inhibitionskonstante $K_{i,L-Phe}^{Ca}$. In Tab. 11 sind alle kinetischen Parameter einschließlich ihrer 95%-Konfidenzintervalle (Abschnitt 4.7) zusammengefasst.

Parameter	v_{max}^{Ca} [mmol/(g s)]	$K_{m,L-CPh_e}^{Ca}$ [mM]	$K_{i,L-Phe}^{Ca}$ [mM]
	$6,10 \cdot 10^{-2}$	0,89	5,99
95%-Konfidenzintervall (Abschnitt 4.7)			
	$\pm 9,8 \%$	$\pm 43,1 \%$	$\pm 17,6 \%$

Tabelle 11: Kinetische Parameter für die Hydrolyse von L-Carbamoylphenylalanin mit rekombinanter L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens*.

5.2.2.2 Dynamische Simulation der Stoffumsetzung

Zur Verifikation der in Abschnitt 5.2.2.1 aus Anfangsreaktionsraten geschätzten kinetischen Parameter wurde der zeitliche Konzentrationsverlauf einer dynamischen Umsetzung mit der polarimetrischen online-Analytik gemäß Abschnitt 4.6 aufgezeichnet und dem Ergebnis der numerischen Integration von Gl. 59 gegenübergestellt.

Bei hohen Substratkonzentrationen wie in Abb. 26 ($c_{L-CPh_e}^0 = 8,2$ mM) entsprach die Michaelis-Menten Kinetik beinahe während der gesamten Umsetzung (die ersten drei Minuten in Abb. 26) einer Reaktion 0. Ordnung, welche im Sinne einer Angleichung des Simulationsergebnisses an die

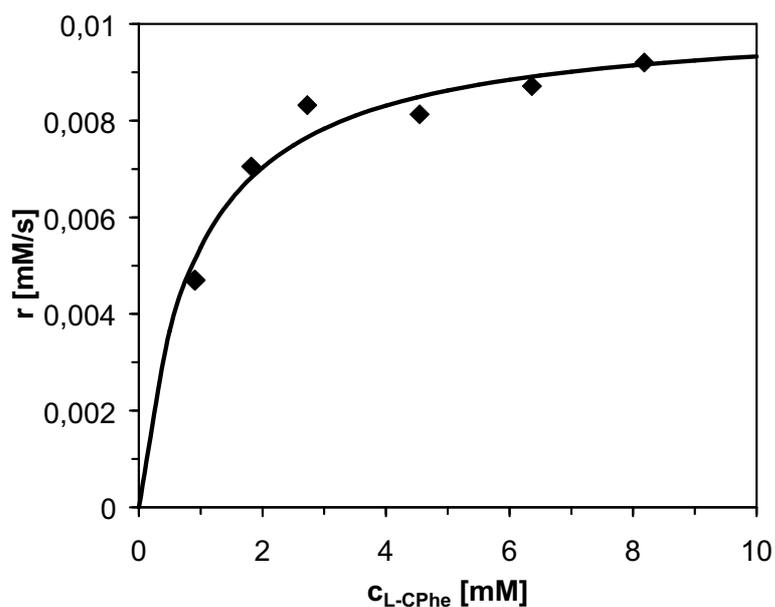


Abbildung 24: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate von der Anfangskonzentration bei der Hydrolyse von L-Carbamoylphenylalanin mit rekombinanter L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

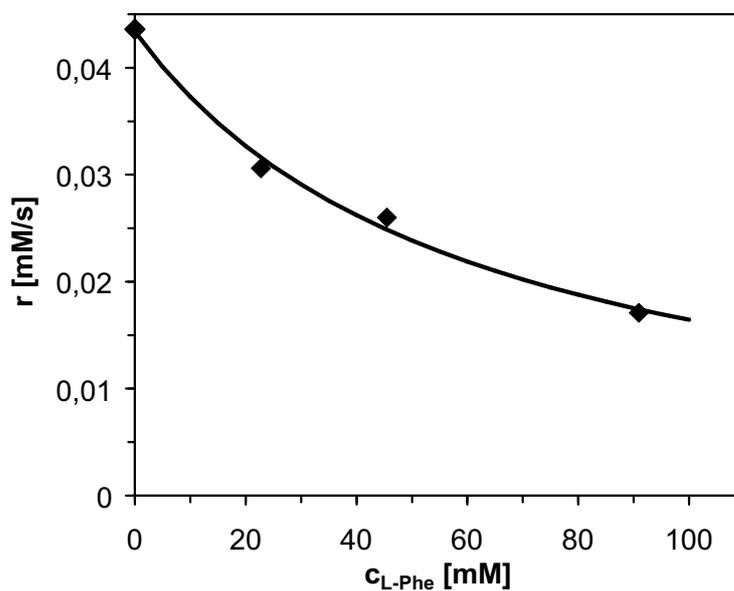


Abbildung 25: Einfluss der kompetitiven Produktinhibition durch L-Phenylalanin auf die Anfangsreaktionsrate bei der Hydrolyse von L-Carbamoylphenylalanin ($c_{L-CPhe} = 8,2$ mM) mit rekombinanter L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

ausgewählten Messwerte eine Anpassung der kinetischen Parameter aus Tab. 11 erforderte, die insbesondere $K_{m,L-Cphe}^{Ca}$ an den unteren Rand ihres Konfidenzintervalls verschob.

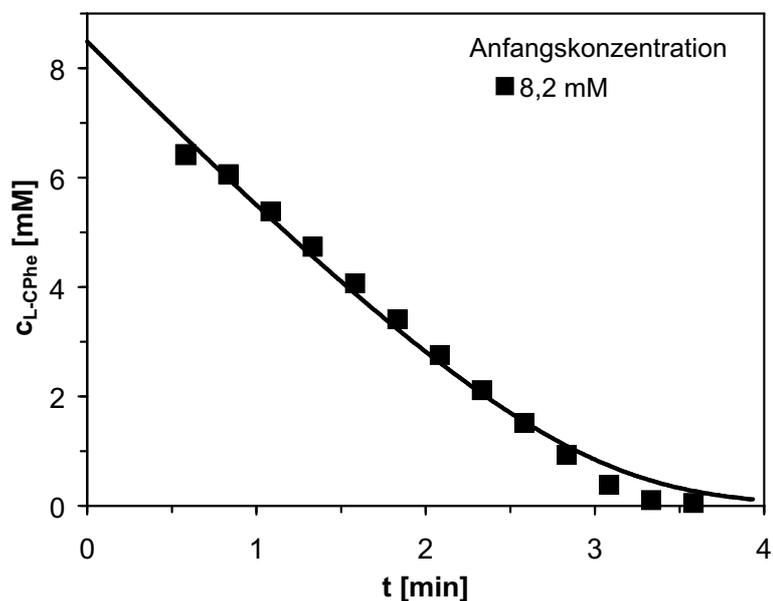


Abbildung 26: Zeitlicher Konzentrationsverlauf bei der Umsetzung von L-Carbamoylphenylalanin mit rekombinanter L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aureus*. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

5.2.3 Einfluss des pH-Werts

Die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate vom pH-Wert wurde im Bereich pH 7,5 ... 9,5 für die Umsetzung von 8,2 mM L-Carbamoylphenylalanin mit der rekombinanten L-Carbamoylase untersucht, jedoch zeigte sich kein Einfluss des pH-Werts auf die (konstante) Rate.

Dieses Ergebnis ermöglichte es nun, einen Prozess mit der Enzymkaskade Hydantoinase und L-Carbamoylase hinsichtlich des pH-Werts wesentlich nach den Anforderungen der Hydantoinase auszulegen.

5.3 Immobilisierte Enzyme

5.3.1 Allgemeines und Betriebsstabilität

Die beiden Enzyme Hydantoinase und L-Carbamoylase wurden für Experimente mit der Versuchsanlage in immobilisierter Form verwendet. Wesentliche Vorteile bestehen dabei in der einfachen Abtrennung des Biokatalysators vom Produkt, seiner mehrfachen Verwendbarkeit sowie einer un-

problematischen Handhabung [9]. Ferner führt die Bindung eines Enzyms an einen Träger häufig zur Erhöhung seiner Beständigkeit gegen (thermische) Inaktivierung.

Die Auswahl eines geeigneten Trägermaterials wird im Hinblick auf dessen chemische Eigenschaften durch die angestrebte Art der Bindung mit dem Enzym (ionisch, adsorptiv oder kovalent) bestimmt [94]. Außerdem legt das zur Enzymrückhaltung eingesetzte System Anforderungen an die Geometrie des Trägers fest. Die beabsichtigte Verwendung eines Festbettreaktors erforderte z.B. aus hydrodynamischen Gründen granuläre Partikel mit möglichst geringem Strömungswiderstand als Träger der Enzyme. Erfüllt wurden alle Anforderungen durch kovalente Immobilisierung an die makroporösen polymeren Träger Eupergit C 250L (Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt) im Fall der Hydantoinase bzw. EAH-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) für die L-Carbamoylase (Tab. 4, S. 43). Eine Charakterisierung verschiedener Eigenschaften der Träger wie Dichte und Porosität findet sich in Abschnitt 5.6.1. Die Immobilisierungsprozeduren mit optimierten Bedingungen hinsichtlich Aktivitätsverlust und Kopplungsausbeute werden detailliert in der Arbeit von K. Ragnitz [69] beschrieben.

Zur Untersuchung der Betriebsstabilität verwendete K. Ragnitz [69] bei konstantem Volumenstrom kontinuierlich betriebene Festbettreaktoren (XK16, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) mit einem Hydantoinase- bzw. Carbamoylaseimmobilisat als Schüttung. Experimentell ermittelt wurde der Umsatz des Substrats D,L-Indolylmethylhydantoin bzw. D,L-Carbamoyltryptophan mit Hilfe der entsprechenden am Reaktorablauf gemessenen Konzentration.

Die zeitliche Abnahme des Umsatzes bei 37 °C, 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 ließ sich für beide Enzyme sehr gut mit einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung beschreiben und führte auf die Halbwertszeiten $t_{1/2} = 14000$ h für die Hydantoinase sowie $t_{1/2} = 1000$ h für die L-Carbamoylase. Ein Vergleich mit den Halbwertszeiten der gelösten Enzyme (Abschnitte 5.1.2.3 und 5.2.1.1) zeigt, dass die Immobilisierung die Betriebsstabilität um mehr als den Faktor 1000 erhöhte.

Obwohl die Anwesenheit des Substrats Benzylhydantoin bzw. Carbamoylphenylalanin die Stabilität der gelösten Enzyme negativ beeinflusste, wurden gesonderte Versuche zur Ermittlung der Betriebsstabilität der Immobilisate nicht mit diesen Substraten wiederholt. Statt dessen wird im Abschnitt 6.1.1.3 die Stabilität der immobilisierten Enzyme bei mehrfacher Verwendung im Gesamtprozess untersucht.

5.3.2 Untersuchung auf Stofftransportlimitierung

Bei der heterogenen Katalyse durch immobilisierte Enzyme wird die beobachtete Gesamtgeschwindigkeit von der Reaktionskinetik im Zusammenspiel mit dem Transport des Substrats aus der Umgebung an die katalytisch aktiven Zentren im makroporösen Partikel bestimmt. Die Umsetzung läuft dabei reaktions- oder diffusionskontrolliert ab. Im letztern Fall können sowohl der externe Stofftransport an die Katalysatoroberfläche als auch die Porendiffusion im Partikel langsamer als der katalytische Schritt mit der Rate r sein und so die Gesamtgeschwindigkeit r_{eff} begrenzen. Daraus resultiert ein verringerter Wirkungsgrad η , da die Gesamtaktivität der Katalysators nicht vollständig genutzt wird:

$$\eta = \frac{r_{eff}}{r} \quad (60)$$

Der Wirkungsgrad η in Gl. 60 ist das Verhältnis von effektiver Reaktionsgeschwindigkeit r_{eff} zu derjenigen ohne Stofftransportlimitierung.

Zur Bewertung eines gegebenen Katalysators ist es in der Literatur [3, 2] üblich, den Einfluss des Stofftransports auf den Wirkungsgrad mit Hilfe der dimensionslosen Kennzahlen Bi und Φ zu beschreiben. Die Biot-Zahl Bi ist definiert als das Verhältnis von externem Stofftransport zu internem diffusivem Transport in den Poren des Katalysators:

$$Bi = \frac{k_f R}{D_{eff}} \quad (61)$$

Das Verhältnis der effektiven Reaktionsgeschwindigkeit zur internen Transportgeschwindigkeit im Katalysator legt der effektive Thiele-Modul Φ fest:

$$\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{r_{eff}}{D_{eff} c^{Korn}|_{r=R}}} \quad (62)$$

Für einen differentiellen Festbettreaktor wurde nun der Wirkungsgrad η mit dem im Abschnitt 3.3 beschriebenen Modell und der vollständigen Kinetik der Hydantoinase (Abschnitt 5.1) sowie der Carbamoylase (Abschnitt 5.2) in Abhängigkeit von Bi und Φ aus der numerischen Lösung berechnet. Die effektive Reaktionsgeschwindigkeit r_{eff} ergab sich aus der Stoffbilanz an einem einzelnen Katalysatorpartikel und ist im stationären Zustand identisch mit dem diffusiven Zufluss des Substrats:

$$r_{eff} = \frac{S_K}{V_K} \left(D_{eff} \frac{\partial c^{Korn}}{\partial r} \Big|_{r=R} \right) = \frac{S_K}{V_K} k_f (c - c^{Korn}|_{r=R}) \quad (63)$$

Als Ergebnis der Simulationsrechnungen resultierten die auf die zweistufige Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin abgestimmten Diagramme in Abb. 27. Das heißt, die Umsetzung von L-Benzylhydantoin wurde auch durch den Transport und die Umsetzung des Zwischenprodukts L-Carbamoylphenylalanin beeinflusst. Die Diagramme zeigen jeweils den Wirkungsgrad der beiden Substrat-entiomere in zwei verschiedenen literaturüblichen Darstellungen.

Für Thiele-Moduln $\Phi \leq 0,06$ läuft die Umsetzung von L-Benzylhydantoin ($\Phi \leq 0,25$ für D-Benzylhydantoin) mit allen gegebenen Biot-Zahlen reaktionskontrolliert ab, und es stellt sich der

Wirkungsgrad $\eta = 1$ ein. In diesem Bereich bleibt eine Verbesserung des Transports in den Katalysatorporen, also ein abnehmender Thiele-Modul, ohne Einfluss auf die effektive Reaktionsgeschwindigkeit, da beide Stofftransportmechanismen schneller als die Reaktion sind. Eine Optimierung des Katalysators durch Verminderung des Partikeldurchmessers oder der Enzymbeladung, die eine geringere Gesamtaktivität bei besserer Nutzung des Enzyms mit sich bringt, waren hier nicht zweckmäßig.

Mit zunehmenden Thiele-Moduln beginnt die Limitierung der Reaktion durch unzureichenden Transport der Substrate. Bezüglich D-Benzylhydantoin belegt die Bi - η -Darstellung rechts unten, dass im untersuchten Bereich $Bi = 13 \dots 27$ der externe Stofftransport nur für den größten be-

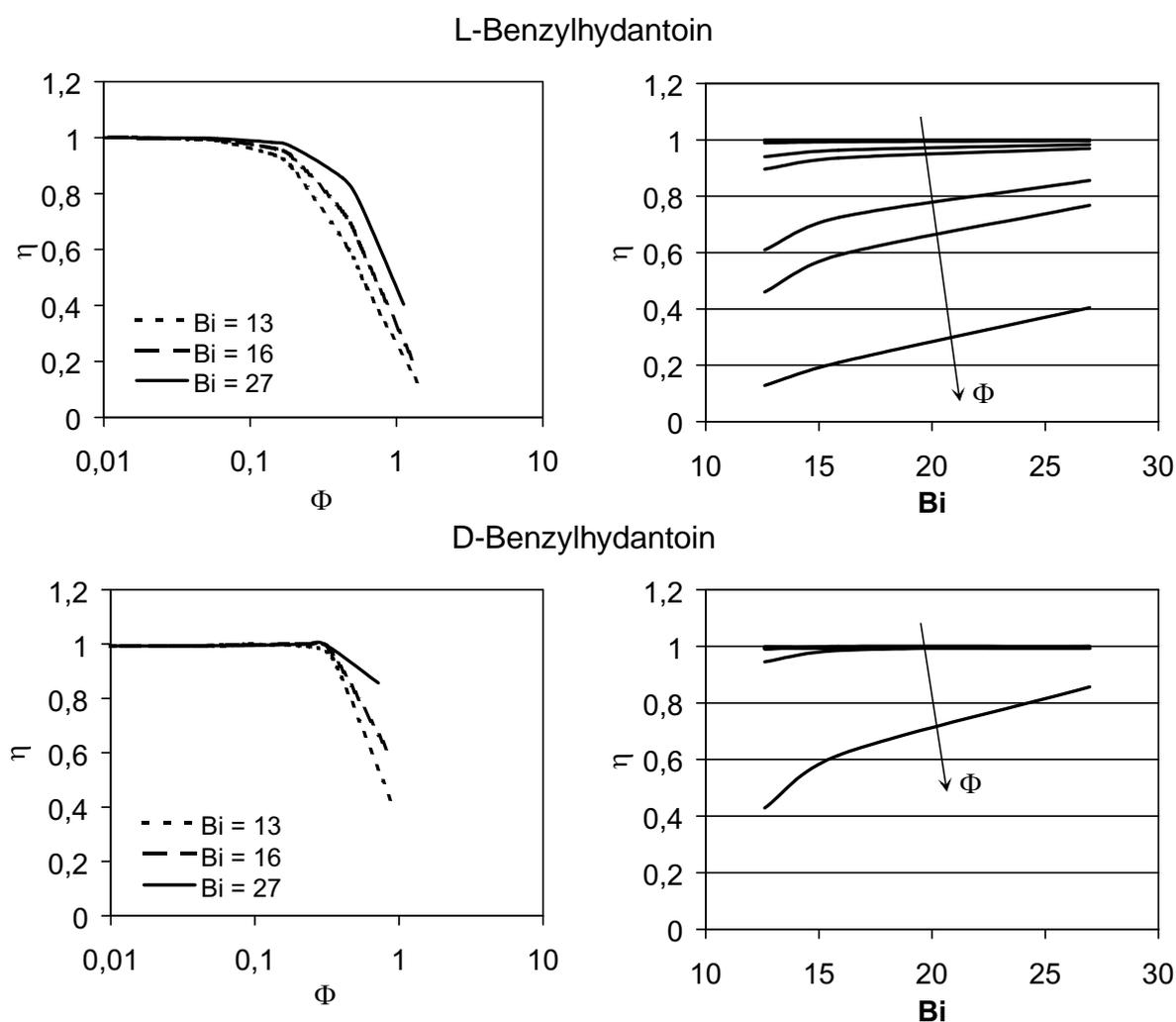


Abbildung 27: Abhängigkeit des Wirkungsgrads η vom externen und internen Stofftransport (Bi bzw. Φ) bei der zweistufigen Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin zu L-Phenylalanin mit den Enzymen Hydantoinase und L-Carbamoylase. Die Darstellungen in einer Zeile sind äquivalent zueinander.

trachteten Thiele-Modul relevant war, da der Wirkungsgrad ansonsten unabhängig von Bi bei $\eta = 1$ liegt.

Aus den Betriebsbedingungen in der Versuchsanlage ergab sich bezüglich des schneller umgesetzten Substrats L-Benzylhydantoin der Thiele-Modul $\Phi = 0,14$ ($Bi = 16$), so dass eine geringfügige Limitierung vorlag ($\eta = 0,96$). Für D-Benzylhydantoin wurde hingegen keine Stofftransportlimitierung festgestellt ($\Phi = 0,07$; $Bi = 16$).

5.4 Kinetik der Racemisierung von Benzylhydantoin

Im folgenden sind einige Ergebnisse der Diplomarbeit von Markus Abendschein [1] zusammengefasst, die einen Überblick über verschiedene Einflüsse auf die Racemisierung von Benzylhydantoin geben. Bezüglich Einzelheiten zur experimentellen Durchführung und kinetischen Modellierung sowie weiterer Untersuchungen sei auf die Diplomarbeit verwiesen.

5.4.1 Racemisierung in wässriger Lösung

Für den Reaktionsmechanismus der spontanen Racemisierung 5-monosubstituierter Hydantoine bestehen in der Literatur mehrere Hypothesen. Dakin et al. [19, 20] führten bereits 1910 den Mechanismus auf die in Abb. 28 dargestellte Keto-Enol-Tautomerie zurück und postulierten damit die Gruppierung $-CRH-CO-$ als notwendige Voraussetzung. Durch intramolekulare Umlagerung des Protons an die Carbonylgruppe verliert das zuvor asymmetrisch substituierte Kohlenstoffatom in Position 5 seine Chiralität. Es resultiert die planare Enol-Form des Hydantoins. Bei der erneuten Umlagerung zur Keto-Form werden abhängig von der zufälligen Anordnung des Protons ober- oder unterhalb der Molekülebene beide Enantiomere mit gleicher Wahrscheinlichkeit gebildet.

Neben diesem verbreiteten Ansatz existieren weitere Modellvorstellungen, die die Wechselwirkungen mit einer Base berücksichtigen und so den Einfluß des pH-Wertes auf die Racemisierungsgeschwindigkeit erklären. Bovarnik und Clarke [7] postulierten die Bildung eines resonanzstabilisierten

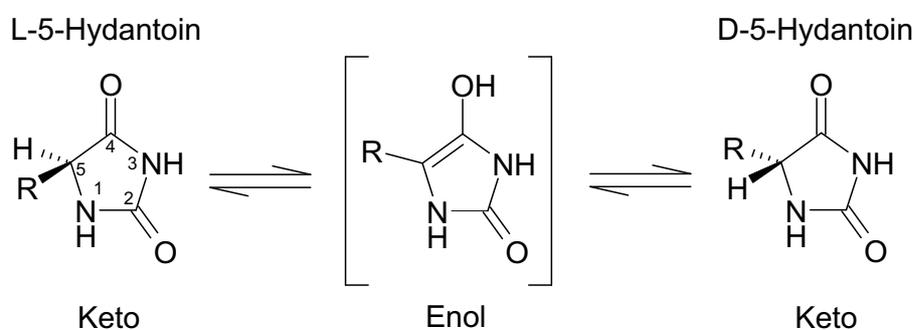


Abbildung 28: Racemisierung 5-monosubstituierter Hydantoine via Keto-Enol-Tautomerie.

sierten, kurzlebigen Carbanions nach Abspaltung des Protons vom chiralen Kohlenstoffatom durch eine Base, Lazarus [45] führte die allgemeine Basenkatalyse auf einen Übergangszustand mit einem auf halbem Wege zwischen C(5)-Atom und Base lokalisierten Proton zurück, und Reist et al. [70] entwickelten einen Mechanismus mit bimolekularer elektrophiler Substitution.

Die pufferkatalysierte Racemisierung beruht nach Dudley und Bius [25] auf der Abgabe eines Protons vom Pufferion an die Carbonylgruppe des Hydantoins in Position 4 und dem entgegengerichteten Transfer eines zweiten Protons vom chiralen Kohlenstoffatom zum Pufferion. Als Übergangszustand entsteht wiederum ein Hydantoin in Enol-Form.

Unabhängig von den Details der einzelnen Reaktionsmechanismen zeigen die Beobachtungen aller zitierten Autoren, dass sich die Racemisierung der Hydantoine als reversible Reaktion mit Hin- und Rückreaktion jeweils pseudo-erster Ordnung beschreiben lässt. Da die Gleichgewichtskonstante notwendigerweise den Wert $K_{eq}^{Rac} = 1$ besitzt, stimmen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion $k_{Rac,f}$ bzw. $k_{Rac,r}$ überein. Durch Integration ergibt sich aus der Reaktionsrate

$$\begin{aligned} r^{Rac} &= -\frac{dc_{D-BnH}}{dt} = \frac{dc_{L-BnH}}{dt} = k_{Rac,r} c_{D-BnH} - k_{Rac,f} c_{L-BnH} \\ &= k'_{Rac} (c_{D-BnH} - c_{L-BnH}) \end{aligned} \quad (64)$$

mit der Gleichgewichtskonzentration c_{L-BnH}^{eq} und $k_{Rac} = k_{Rac,f} + k_{Rac,r} = 2 k'_{Rac}$ die folgende Lösung (Jencks [37]):

$$\ln \frac{c_{L-BnH} - c_{L-BnH}^{eq}}{c_{L-BnH}^0 - c_{L-BnH}^{eq}} = -k_{Rac} t \quad (65)$$

Startet die Reaktion mit optisch reinem Substrat, so entspricht die Konzentration eines Enantiomers im Gleichgewicht der halben Ausgangskonzentration $c_{L-BnH}^{eq} = c_{L-BnH}^0/2$.

Wird Gl. 32 (S. 46), die einen Zusammenhang zwischen Konzentration und gemessenem Drehwert α_{obs} herstellt, in Gl. 65 eingesetzt, so resultiert Gl. 66 zur einfachen experimentellen Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

$$\ln \frac{\alpha_{obs}}{\alpha_{obs}^0} = -k_{Rac} t \quad (66)$$

Um verschiedene Mechanismen der Racemisierung in das kinetische Modell zu integrieren, setzte Lazarus [45] die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{Rac} aus drei additiven Beiträgen zusammen.

$$\begin{aligned} k_{Rac} &= (k'_{OH} a_{OH} + k_B c_B) (1 - \beta_{BnH}) + k_{OH} a_{OH} \beta_{BnH} \\ &= \underbrace{k'_{OH} a_{OH} (1 - \beta_{BnH})}_1 + \underbrace{k_B c_B (1 - \beta_{BnH})}_2 + \underbrace{k_{OH} a_{OH} \beta_{BnH}}_3 \end{aligned} \quad (67)$$

Den Einfluß des Hydroxidions (Aktivität a_{OH}) bzw. des Puffers (Konzentration c_B des Puffers in basischer Form) auf das undissoziierte Benzylhydantoin (Dissoziationsgrad β_{BnH}) repräsentieren

die Konstanten k'_{OH} und k_B (Terme 1 und 2 in Gl. 67). Der basenkatalysierten Racemisierung des dissoziierten Benzylhydantoin ist die Konstante k_{OH} im Term 3 zugeordnet.

Mit der Einführung zusätzlicher Konzentrationen (a_{OH} , c_B) in Gl. 67 erhöht sich im kinetischen Modell die ursprünglich beobachtete Reaktionsordnung von pseudo-eins auf zwei.

Abb. 29 zeigt experimentell bestimmte Racemisierungskonstanten k_{Rac} von M. Abendschein [1] und Lazarus [45] für verschiedene pH-Werte und Puffer sowie Modellrechnungen gemäß Gl. 67 mit den kinetischen Parametern aus Tab. 12. Zur Berechnung der Dissoziationsgleichgewichte dienten die pK-Werte in Tab. 13. Die Simulationsergebnisse stimmen gut mit den Messwerten sowohl von M. Abendschein als auch von Lazarus überein. Hierzu änderte M. Abendschein jedoch die von Lazarus als Startwerte übernommenen Modellparameter zwischen 30 und 90 %. Solche Unterschiede beruhen vermutlich auf Differenzen hinsichtlich der verwendeten pK-Werte (Tab. 13), welche die Auswertung der Messdaten stark beeinflussten.

Dem Reaktionsmechanismus entsprechend begünstigte ein basisches Milieu die Racemisierung. So vervierfachte sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch Anhebung des pH-Werts um zwei Einheiten von 7,5 auf 9,5.

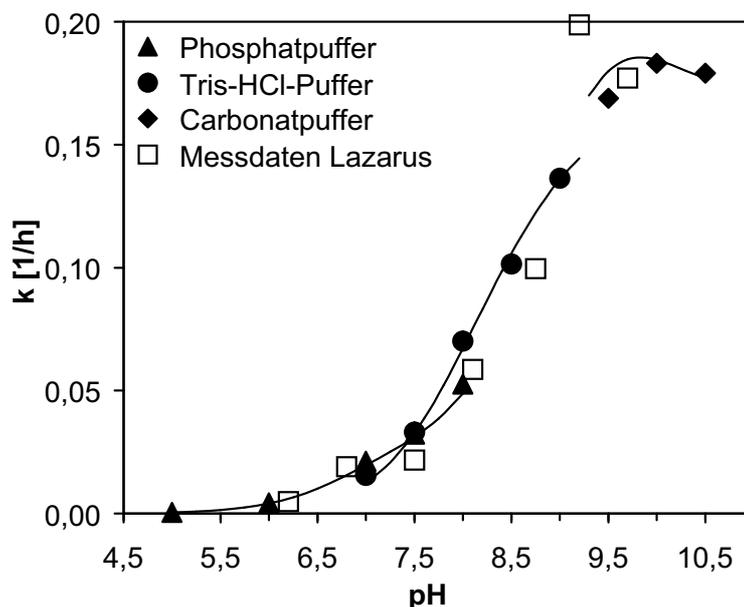


Abbildung 29: Einfluß des pH-Werts auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{Rac} bei der spontanen Racemisierung von L-Benzylhydantoin. Zur Abdeckung eines weiten pH-Bereichs wurden drei Puffersysteme (jeweils 0,1 M Phosphat-, Tris-HCl- bzw. Carbonatpuffer, $T = 37\text{ °C}$) eingesetzt. Vergleich von eigenen experimentellen Daten [1] (gefüllte Symbole), Literaturwerten [45] (leere Symbole) und Modellsimulationen (Linien) unter Berücksichtigung der verschiedenen Puffersysteme.

Parameter	Wert	Wert Lazarus [45]	Einheit
k_{OH}	$4,00 \cdot 10^{-2}$	$4,00 \cdot 10^{-2}$	1/(M min)
k'_{OH}	$2,60 \cdot 10^2$	$7,10 \cdot 10^2$	1/(M min)
$k_B^{Phosphat}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	$3,50 \cdot 10^{-3}$	1/(M min)
k_B^{Tris}	$1,43 \cdot 10^{-2}$	$2,31 \cdot 10^{-2}$	1/(M min)
$k_B^{Carbonat}$	$1,93 \cdot 10^{-1}$	$1,02 \cdot 10^{-1}$	1/(M min)

Tabelle 12: Kinetische Parameter der spontanen Racemisierung von Benzylhydantoin in drei verschiedenen Reaktionspuffern gemäß Gl. 67, $T = 37^\circ\text{C}$.

Parameter	Wert	Wert Lazarus [45]	Gleichgewichtsexponent für
pK_W	13,7	unbekannt	Wasser
pK_S	8,7	8,7	Benzylhydantoin
$pK_S^{Phosphat}$	6,8	6,8	Phosphatpuffer
pK_S^{Tris}	7,9	8,1	Tris-HCl-Puffer
$pK_S^{Carbonat}$	10,0	9,7	Carbonatpuffer

Tabelle 13: Verschiedene pK-Werte zur Gleichgewichtsberechnung bei der Racemisierung von Benzylhydantoin, $T = 37^\circ\text{C}$.

5.4.2 Racemisierung am Ionenaustauscher Q-Sepharose FF

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, ist der pH-Wert ein maßgeblicher Faktor zur Beschleunigung der spontanen Racemisierung von Benzylhydantoin. Da diese jedoch nicht isoliert von den enzymatischen Umsetzungen erfolgen konnte, waren bei der Wahl der Reaktionsbedingungen insbesondere die Anforderungen der Enzyme zu beachten. Hinsichtlich Aktivität und Stabilität empfahl sich hier pH 8,5. Die verstärkte Basen-Katalyse bei pH 9,5 war daher nicht nutzbar.

Alternativ bot sich der Einsatz eines starken Anionenaustauschers an, der durch lokale Erhöhung des pH-Werts an der Oberfläche der Ionenaustauscherpartikel die gewünschte Beschleunigung bewirkte. M. Abendschein untersuchte nach einem Vergleich verschiedener Produkte die Racemisierung an Q-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg), welche die besten Ergebnisse aufwies.

Basierend auf einer Verteilung des Benzylhydantoin im zweiphasigen Reaktionssystem wurden analog zum kinetischen Modell der spontanen Racemisierung mehrere katalytische Einflüsse in Gl. 68 additiv zusammengefasst. Die Verteilung resultierte zum einen aus der Adsorption neutralen Benzylhydantoin an die ungeladene Matrix der Q-Sepharose FF (Abschnitt 5.6.2) und zum anderen aus dem Ionenaustausch zwischen dissoziiertem Benzylhydantoin und Chloridionen (K_{IAT}

und X_{IAT} in Tab. 14).

$$k_{Rac}^{IAT} = \left(\underbrace{\bar{k}'_{OH} \alpha_{OH} \frac{(\bar{c}_{BnH} - \bar{c}_{BnH^-}) \rho_{IAT}}{c_{BnH}}}_1 + \underbrace{\bar{k}_{IAT} \frac{\bar{c}_{BnH^-} \rho_{IAT}}{c_{BnH}}}_2 + \underbrace{\bar{k}_{OH} \alpha_{OH} \frac{\bar{c}_{BnH^-} \rho_{IAT}}{c_{BnH}}}_3 \right) m_{IAT} \quad (68)$$

Der erste Term in Gl. 68 um die Geschwindigkeitskonstante \bar{k}'_{OH} beschreibt die Racemisierung durch Hin- und Rücktransfer eines Protons vom adsorptiv gebundenen, undissoziierten Benzylhydantoin auf ein Hydroxidion in der Flüssigphase. Konzentrationen mit einem Überstrich wie \bar{c}_{BnH} oder \bar{c}_{BnH^-} bezeichnen die an den Ionenaustauscher gebundenen Spezies, und ρ_{IAT} ist die Dichte des feuchten Ionenaustauschers. Ferner wurde angenommen, dass dissoziiertes, negativ geladenes

Parameter	Wert	Einheit	Beschreibung
\bar{k}_{OH}	$4,00 \cdot 10^{-2}$	1/(M min g)	
\bar{k}'_{OH}	$6,35 \cdot 10^1$	1/(M min g)	
\bar{k}_{IAT}	$1,48 \cdot 10^{-2}$	1/(min g)	
K_{IAT}	1,32	-	Selektivitätskoeffizient BnH^- / Cl^- (pH = 8,5)
X_{IAT}	200	mmol/L	Kapazität der Q-Sepharose FF

Tabelle 14: Kinetische Parameter der am Ionenaustauscher Q-Sepharose FF katalysierten Racemisierung von Benzylhydantoin gemäß Gl. 68 ($T = 37$ °C). Der Selektivitätskoeffizient legt die Verteilung der Anionen BnH^- und Cl^- zwischen der Flüssigphase und dem Ionenaustauscher fest.

Benzylhydantoin am Ionenaustauscher ebenfalls infolge von Wechselwirkungen mit Hydroxidionen (\bar{k}_{OH} , Term 3) sowie beim Austausch mit Chloridionen (\bar{k}_{IAT} , Term 2) racemisiert. Die von M. Abendschein identifizierten reaktionskinetischen Parameter sind in Tab. 14 zusammengefaßt.

Zur Bewertung des praktischen Nutzens der Katalyse am Ionenaustauscher Q-Sepharose FF sind in Abb. 30 experimentelle Daten und Modellsimulationen zusammengestellt, die den Einfluß des pH-Werts sowie der Pufferkonzentration auf die effektiven Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für katalysierte bzw. spontane Racemisierung zeigen. Mit zunehmender Pufferkonzentration stieg die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Racemisierung k_{Rac}^L in etwa linear an. Diesem erwünschten Effekt zuwider lief jedoch eine drastische Geschwindigkeitsabnahme der Katalyse am Ionenaustauscher (k_{Rac}^{IAT}), auch wenn ihr Beitrag den der spontanen Reaktion stets übertraf. Das kinetische Modell prognostizierte als Bedingung für maximale Racemisierungsgeschwindigkeit ein pufferfreies System. Ursache der Geschwindigkeitsabnahme bei anwachsender Pufferkonzentration war die Verdrängung der an den Ionenaustauscher gebundenen Benzylhydantoinionen durch Chloridionen, woraus eine Einschränkung der katalytischen Wechselwirkungen resultierte. Die Anreicherung von Benzylhydantoin in der Flüssigphase, in Abb. 30 ersichtlich an der zunehmenden Benzylhydantoinkonzentration c_{BnH} , war Folge des verstärkten Ionenaustauschs. Ein ungepuffertes Reaktionssystem unterstützte daher nicht nur die Bemühungen um eine einfache

Produktaufarbeitung, sondern war auch hinsichtlich der Racemisierung vorzuziehen. Im Abschnitt 6.2 wird ein solches System näher betrachtet.

Die Verschiebung des pH-Werts in den basischen Bereich bewirkte wie erwartet eine Beschleunigung der Racemisierung, wobei der durch Katalyse erzielte Geschwindigkeitszuwachs im Vergleich zur spontanen Reaktion überproportional anstieg. Aufgrund der stärkeren Dissoziation band

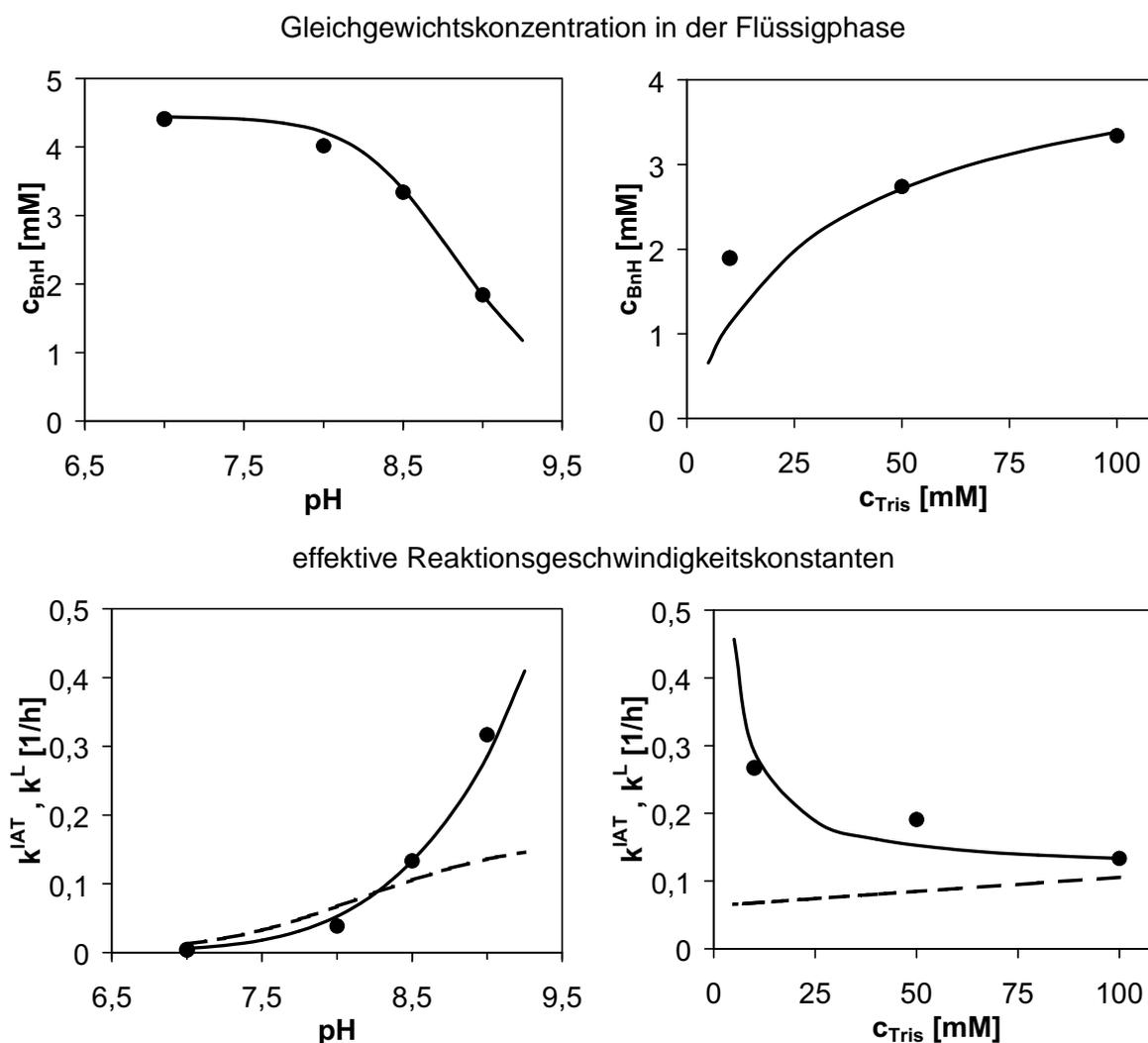


Abbildung 30: Racemisierung von 5 mM L-Benzylhydantoinlösung in einem System aus 54 mL Tri-HCl-Puffer und 5 g Q-Sepharose FF, $T = 37$ °C. Variiert wurde der pH-Wert bei konstanter Pufferkonzentration (0,1 M Tri-HCl-Puffer, Abbildungen linke Spalte) bzw. die Pufferkonzentration bei konstantem pH-Wert (pH 8,5, Abbildungen rechte Spalte). Obere Reihe: Gleichgewichtskonzentration an Benzylhydantoin in der Flüssigphase. Untere Reihe: Effektive Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die katalysierte (k_{Rac}^{IAT} : durchgezogene Linie) und spontane (k_{Rac}^L : gestrichelte Linie) Racemisierung. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

ein größerer Anteil Benzylhydantoin an den Ionenaustauscher und bewirkte so die zunehmende katalytische Aktivität. Zum Ausgleich verarmte die Flüssigphase an Benzylhydantoin und seine Konzentration c_{BH} nahm mit steigendem pH-Wert ab.

Für den hinsichtlich der Enzymeigenschaften optimalen pH-Wert 8,5 ergab sich durch Einsatz von 5 g Ionenaustauscher mit $k_{\text{Rac}}^{\text{IAT}} \approx k_{\text{Rac}}^{\text{L}}$ gegenüber der spontanen Racemisierung eine Verdopplung der resultierenden Gesamtgeschwindigkeit.

5.5 Kinetik der Auflösung von Benzylhydantoin

Für einen Teil der Experimente mit der Versuchsanlage wurde das Substrat Benzylhydantoin nicht in gelöster Form, sondern als Feststoff eingesetzt, der sich im Membranreaktor (Abb. 2, S. 26) kontinuierlich während der Reaktion löste und durch eine Mikrofiltrationsmembran zurückgehalten wurde. Die Simulation dieser Prozessvariante erforderte ein mathematisches Modell, welches die Kinetik der Auflösung von Benzylhydantoin beschreibt.

Wolff et al. [102] entwickelten für die enzymatische Umsetzung suspendierter fester Substrate ein detailliertes kinetisches Modell mit der Annahme, dass das feste Substrat als kugelförmige Partikel vorliegt, die aufgrund der Auflösung kleiner werden, aber weder auseinanderbrechen noch miteinander agglomerieren. Werden die Substratpartikel nach ihrem Durchmesser in i verschiedene Klassen sortiert, so kann der spezifische Stoffstrom $\phi_{\text{lös}}$ von der festen Phase in die Flüssigphase

$$\phi_{\text{lös}} = k_f a (c^* - c) \quad (69)$$

durch die Summe $\phi_{\text{lös}} = \sum \phi_{\text{lös},i}$ ersetzt werden. Dabei ist k_f der Stoffübergangskoeffizient, a die spezifische Phasengrenzfläche aller Substratpartikel und c^* die Löslichkeit des Substrats. Dieser Ansatz erfordert für das Substrat die Kenntnis der Partikelgrößenverteilung.

Da in dieser Arbeit die Kinetik der Auflösung infolge ihrer Schnelligkeit das dynamische Verhalten des Gesamtprozesses kaum beeinflusste, wurde dem detaillierten Modell ein einfacher empirischer Ansatz nach Maxon et al. [54] vorgezogen. Damit entfiel auch der hohe experimentelle Aufwand, eine Partikelgrößenverteilung des fein-kristallinen, aufgereinigten D,L-Benzylhydantoin der Degussa AG (Abschnitt 4.1) zu bestimmen. Die von Maxon et al. angegebene Beziehung

$$\phi_{\text{lös}} = k_s c_s^2 (c^* - c) \quad (70)$$

beruht auf Arbeiten von Higuchi et al. [30, 31] und wurde in der Vergangenheit verschiedentlich im Zusammenhang mit enzymatischen Umsetzungen angewandt [14, 15]. Die Konzentration c_s bezieht sich auf den ungelösten Feststoff, und die Größe k_s ist ein empirischer Parameter, der mit Hilfe von Messdaten identifiziert wurde.

Experimentell bestimmt wurde die Kinetik der Auflösung durch plötzliche Zugabe von festem D,L-Benzylhydantoin in den gerührten ($n = 300$ 1/min) und mit 265 mL 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5,

$T = 37\text{ °C}$, befüllten Membranreaktor (Abschnitt 2.2.1). Bezogen auf das Reaktionsvolumen entsprach die eingesetzte Stoffmenge einer Konzentration von 8,5 mM. Mit der Membranpumpe P1 wurde die Benzylhydantoinlösung permanent unter der Mikrofiltrationsmembran abgesaugt und in den Reaktor zurückgeführt. In diesem Kreislaufstrom befand sich ferner die Durchflussküvette eines Photometers (Wellenlänge $\lambda = 249\text{ nm}$), so dass der zeitliche Konzentrationsverlauf aus der kontinuierlich gemessenen Absorption berechnet werden konnte. Der Transportwiderstand der Mikrofiltrationsmembran ($0,2\text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser) war für diese Betriebsbedingungen vernachlässigbar.

Abb. 31 stellt das Messergebnis dem auf Gl. 70 beruhenden simulierten Verlauf gegenüber. Mit einer Löslichkeit des Benzylhydantoin von $c_{D,L-BnH}^* = 8,6\text{ mM}$ (Tab. 8, S. 49) resultierte der empirische Parameter zu $k_s = 8,54 \cdot 10^{-5}\text{ 1/(s mM}^2\text{)}$. Für die praktische Handhabung des Gesamtprozesses war es wichtig, dass der Lösungsvorgang schnell ablief, jedoch aufgrund der schlechten Benetzbarkeit des Benzylhydantoinpulvers mit wässrigen Lösungen leicht größere Agglomerate entstanden, deren Auflösung viel Zeit beanspruchte.

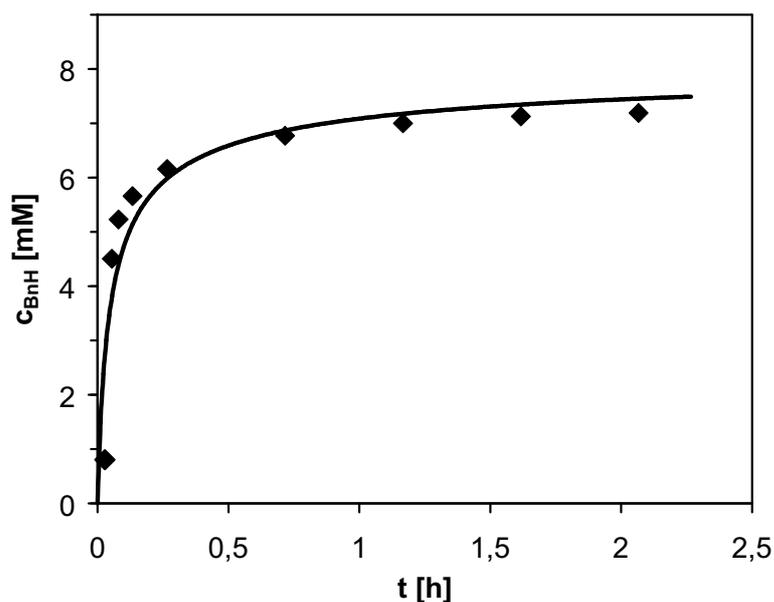


Abbildung 31: Konzentrationsverlauf bei der Auflösung von 8,5 mM festem D,L-Benzylhydantoin im Membranreaktor ($n = 300\text{ 1/s}$, $T = 37\text{ °C}$, 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5). Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

5.6 Physikalische Charakterisierung der Festbett-Schüttungen

5.6.1 Eupergit C 250L und Q-Sepharose FF

Wie im Abschnitt 5.3 erläutert, wurden in der Versuchsanlage die an Eupergit C 250L bzw. EAH-Sepharose 4B immobilisierten Enzyme Hydantoinase und L-Carbamoylase eingesetzt. Eupergit C 250L ist ein kugelförmiger makroporöser Träger mit 200 μm mittlerem Partikeldurchmesser und funktionellen Oxirangruppen zur kovalenten Bindung von Enzymen. Die Matrix besteht aus einem Copolymer auf Acrylamid-Basis, ist elektrisch neutral und überwiegend hydrophil. Industrielle Anwendungen liegen im Bereich der Immobilisierung von Penicillin-Amidase und Trypsin. Hauptsächlich für die Affinitätschromatographie genutzt wird die EAH-Sepharose 4B, die über eine Matrix aus quervernetzter Agarose verfügt und zur Immobilisierung von Enzymen an ihren primären Aminogruppen die Carboxylgruppen der Proteine kovalent binden kann. Nach Herstellerangaben liegt der Partikeldurchmesser im Bereich von 45 bis 165 μm . Da die Experimente mit der Versuchsanlage vergleichsweise geringe Mengen ($< 20\text{ g}$) der immobilisierten L-Carbamoylase erforderten, wurden bei der Modellierung des Mischbetts aus Eupergit C 250L und EAH-Sepharose 4B allein die Eigenschaften des Eupergits C 250L berücksichtigt.

Die Racemisierung von Benzylhydantoin wurde mit Hilfe des stark basischen Anionenaustauschers Q-Sepharose FF katalysiert (Abschnitt 5.4). Er besitzt eine Matrix aus quervernetzter Agarose mit quartären Aminogruppen (Trimethylamin). Der Durchmesser der kugelförmigen Partikel liegt gemäß Produktinformation zwischen 45 und 165 μm bei einem Mittelwert von 90 μm .

Zur Berechnung des Sauterdurchmessers der Q-Sepharose FF bestimmte M. Abendschein [1] die Partikelgrößenverteilung mit Hilfe der Laserbeugung (Particle Sizer 2600, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, GB). Dieses Verfahren ist insbesondere bei Partikeln geeignet, deren äußere Gestalt möglichst wenig von der Kugelform abweicht, was durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden konnte. Der Sauterdurchmesser d_S erlaubt die Berechnung der für den Stofftransport über eine Phasengrenze (Gl. 2, S. 33) wichtigen spezifischen Oberfläche a eines Partikelkollektivs:

$$a = \frac{S_K^{ges}}{V_{Fb}} = (1 - \epsilon_{Fb}) \frac{S_K^{ges}}{V_K^{ges}} = (1 - \epsilon_{Fb}) \frac{\pi \sum (z_i d_{K,i}^2)}{\pi/6 \sum (z_i d_{K,i}^3)} = \frac{6(1 - \epsilon_{Fb})}{d_S} \quad (71)$$

Mit dem Wechsel von einer Anzahlverteilung z_i zur experimentell ermittelten Volumenverteilung ξ_i gilt für den Sauterdurchmesser:

$$d_S = \frac{\sum (z_i d_{K,i}^3)}{\sum (z_i d_{K,i}^2)} = \frac{1}{\sum (\xi_i / d_{K,i})} \quad (72)$$

Abb. 32 zeigt die Volumenverteilung des in Klassen sortierten Partikeldurchmessers. Die Breite der Verteilung stimmt im wesentlichen mit den Angaben des Herstellers überein. Jedoch waren 10 Vol% der Partikel kleiner als 45 μm , was z.B. durch Abrieb infolge mechanischer Beanspruchung verursacht worden sein könnte. Aufgrund ihrer geringen Größe trugen diese Partikel mit

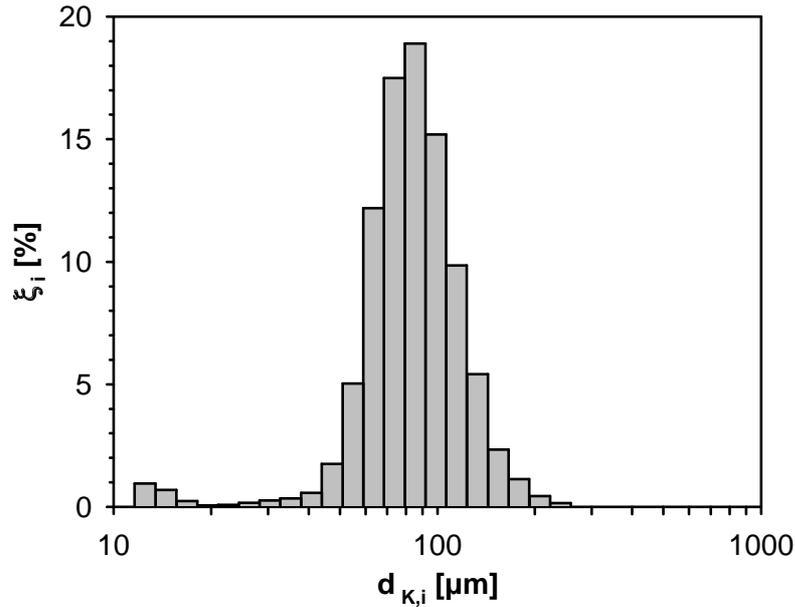


Abbildung 32: Volumenanteile ξ_i der Partikeldurchmesserklassen für den Anionenaustauscher Q-Sepharose FF.

17 % überproportional zur gesamten spezifischen Oberfläche des Partikelkollektivs bei. Der Sauterdurchmesser d_S ergab sich nach Gl. 72 zu $d_S = 80 \mu\text{m}$ und war damit kleiner als der vom Hersteller angegebene mittlere Durchmesser.

Das detaillierte Modell des Festbettreaktors aus Abschnitt 3.3 einschließlich enzym- bzw. ionenaustauscherkatalysierter Stoffumsetzung erforderte außer dem Sauterdurchmesser die Kenntnis der Porosität eines einzelnen Partikels ϵ_K sowie des Hohlraumanteils im Festbett ϵ_{Fb} . Ferner war die Dichte ρ_K des porösen Trägermaterials in gequollenem Zustand für die Umrechnung von massenspezifischen Reaktionsraten in volumenspezifische Raten von Interesse. Zur experimentellen Bestimmung der gesuchten Größen wurden in einen graduierten Glaszylinder getrocknete Partikel der Masse $m_{Sch, tr}$ eingewogen und anschließend mit Pufferlösung versetzt. Nach Beendigung der Quellphase wurde die Schüttung zu einem Festbett verdichtet, der überstehende Puffer abgesaugt und sowohl die Masse m_{Fb} als auch das Volumen V_{Fb} des Festbetts gemessen, welches aufgrund der Quellung nicht mit dem Volumen der trockenen Schüttung übereinstimmte. Im letzten Schritt wurde das Festbett abgenutscht und die Masse $m_{Sch, f}$ der feuchten Schüttung ermittelt. Aus diesen Messgrößen resultierten die Dichte der trockenen Schüttung $\rho_{Sch, tr} = m_{Sch, tr}/V_{Fb}$ sowie der feuchten Schüttung $\rho_{Sch, f} = m_{Sch, f}/V_{Fb}$ und diejenige des Festbetts $\rho_{Fb} = m_{Fb}/V_{Fb}$. Zusammen mit der Feststoffdichte ρ_S des massiven Trägermaterials und der Dichte der Pufferlösung ρ_P dienten diese Größen zur Auswertung der folgenden Beziehungen:

$$\epsilon_{Fb} = (\rho_{Fb} - \rho_{Sch, f})/\rho_P \quad (73)$$

$$\epsilon_{ges} = (\rho_S - \rho_{Sch, tr})/\rho_S \quad (74)$$

$$\epsilon_K = (\epsilon_{ges} - \epsilon_{Fb}) / (1 - \epsilon_{Fb}) \quad (75)$$

$$\rho_K = \rho_{Sch, f} / (1 - \epsilon_{Fb}) \quad (76)$$

Mit den Mittelwerten aus jeweils vier Versuchsreihen ergaben sich die in Tab. 15 zusammengefassten Porositäten und Dichten.

Der Wassergehalt des gequollenen Trägermaterials Eupergit C 250L betrug 2,75 mL/g_{Sch, tr} und lag somit im Bereich der Produktspezifikation von 2,5 ... 3 mL/g_{Sch, tr}.

In einer Untersuchung zur Adsorption von Immunglobulin an Q-Sepharose FF schätzten Chase et al. [11] die Porosität der Partikel anhand des Agarosegehalts mit $\epsilon_K = 0,94$ ab. Whitley et al. [96] geben $\epsilon_K = 0,95$ an. Beide Werte stimmen gut mit ϵ_K aus Tab. 15 überein. Ferner bestätigte M. Abendschein [1] die Dichte ρ_K der gequollenen Q-Sepharose FF durch Messungen im Pyknometer.

Schüttung	d_K [μm]	ϵ_K [-]	ρ_K [g/cm ³]	ϵ_{Fb} [-]	ϵ_{ges} [-]	ρ_S [g/cm ³]
Eupergit C 250L	200 (d_{50})	0,77	1,05	0,34	0,85	1,20
Q-Sepharose FF	80 (d_{Sauter})	0,91	1,07	0,20	0,93	1,79

Tabelle 15: Partikeldurchmesser, Porositäten und Dichten verschiedener Festbett-Schüttungen.

Der Druckabfall beim Durchströmen einer 20 cm hohen Q-Sepharose FF Schüttung ($d_{Fb} = 5$ cm) mit einem Volumenstrom von 2 L/h betrug ca. 200 mbar und entsprach etwa 40 % des gemäß der Ergun-Gleichung $\Delta p = 150 (1 - \epsilon_{Fb})^2 / \epsilon_{Fb}^3 \mu L / d_K^2 u_0$ erwarteten Werts. Dies ist wahrscheinlich auf die besondere Struktur des Fast Flow Materials zurückzuführen, bei dem ein Großteil der Poren nicht im Partikel endet sondern durch das Partikel hindurchführt.

5.6.2 Adsorption an Q-Sepharose FF

Erste Ergebnisse beim Betrieb der Versuchsanlage zeigten, dass die Adsorption bzw. Desorption der Reaktanten in dem mit Q-Sepharose FF gepackten Festbettreaktor das dynamische Verhalten des Prozesses stark beeinflusste.

Adsorption und Desorption sind reversible Vorgänge in einem dynamischen Gleichgewicht, welches sich im Vergleich mit den enzymkatalysierten Reaktionen sehr schnell einstellt. Ein detailliertes Schema der Verhältnisse am Ionenaustauscher Q-Sepharose FF zeigt Abb. 33 für das Substrat Benzylhydantoin. Da Benzylhydantoin als schwache Säure bei den gegebenen Reaktionsbedingungen dissoziiert, kann nicht nur die undissoziierte Form an die Matrix der Q-Sepharose FF adsorbieren, sondern auch das geladene Benzylhydantoin einem Austausch mit den Chloridgegenionen des Ionenaustauschers unterliegen [36].

In der Diplomarbeit von M. Abendschein [1] wurden dieses detaillierte Modell und ein vereinfachter Ansatz ohne Dissoziation, der die Verteilung des gesamten Benzylhydantoins zwischen Flüssig-

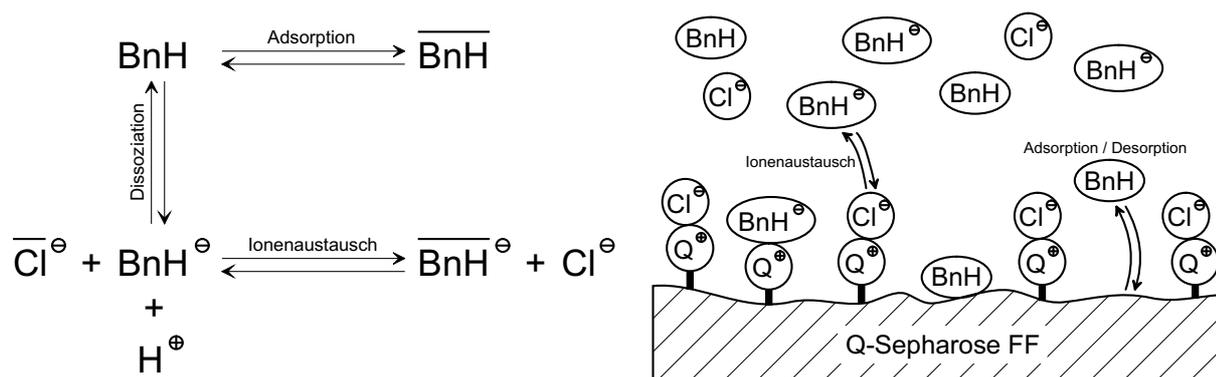


Abbildung 33: Adsorption des undissoziierten Benzylhydantoin und Ionenaustausch der geladenen Form mit Chlorid-Gegenionen am Ionenaustauscher Q-Sepharose FF.

und Festphase mittels einer Adsorptionsisotherme beschreibt, miteinander verglichen, und es folgte, dass das einfache Modell bei konstanten pH-Werten und Pufferkonzentrationen hinreichend genau war. Der Grund dafür bestand im geringen Anteil des in geladener Form an den Ionenaustauscher gebundenen Benzylhydantoin, da bei pH 8,5 zum einen das gelöste Benzylhydantoin ($pK_S = 8,7$) nur unvollständig dissoziiert mit einem Dissoziationsgrad von 39 % vorlag und zum anderen die Q-Sepharose FF keine stark ausgeprägte Selektivität für Benzylhydantoinionen aufwies (vgl. K_{IAT} in Tab. 14, S. 78).

Ein Adsorptionsgleichgewicht lässt sich als Isotherme durch die Konzentration in der Flüssigphase und die von der Schüttung adsorbierte Stoffmenge charakterisieren [43]. Mit dem Ionenaustauscher Q-Sepharose FF wurden die Adsorptionsisothermen von Benzylhydantoin, Carbamoylphenylalanin und Phenylalanin bei 37 °C in 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 experimentell bestimmt. Wechselwirkungen, die bei der Adsorption mehrerer Komponenten auftreten können, blieben im Gesamtsystem unberücksichtigt, ohne die Güte der Überstimmung von Messwerten und Simulationen einzuschränken. Da in den Festbettreaktoren der Versuchsanlage die Masse des Ionenaustauschers Q-Sepharose FF mit $m_{IAT} \approx 300$ g diejenige der Enzymimmobilisate um mehr als das zehnfache überstieg, wurde die Adsorption an diese vernachlässigt.

Für die absatzweise durchgeführten Experimente wurden Lösungen verschiedener Konzentrationen in einem Rührkessel mit 75 mL Volumen vorgelegt und bis zum Erreichen einer zeitlich konstanten Konzentration in der Flüssigphase durch einen mit ca. 15 g Q-Sepharose FF gepackten Festbettreaktor (XK16, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) gepumpt, dessen Ablauf mit dem Rührkessel verbunden war. Die Konzentration in der Flüssigphase wurde polarimetrisch überwacht und diente zusammen mit der Startkonzentration zur Berechnung der von der Schüttung adsorbierten Stoffmenge. Vor jedem Versuch erfolgte ein Austausch der Festbettschüttung gegen frische Q-Sepharose FF der gleichen Charge und die anschließende Äquilibration mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5.

Abb. 34 zeigt die Adsorptionsisothermen für Phenylalanin und Carbamoylphenylalanin. Während

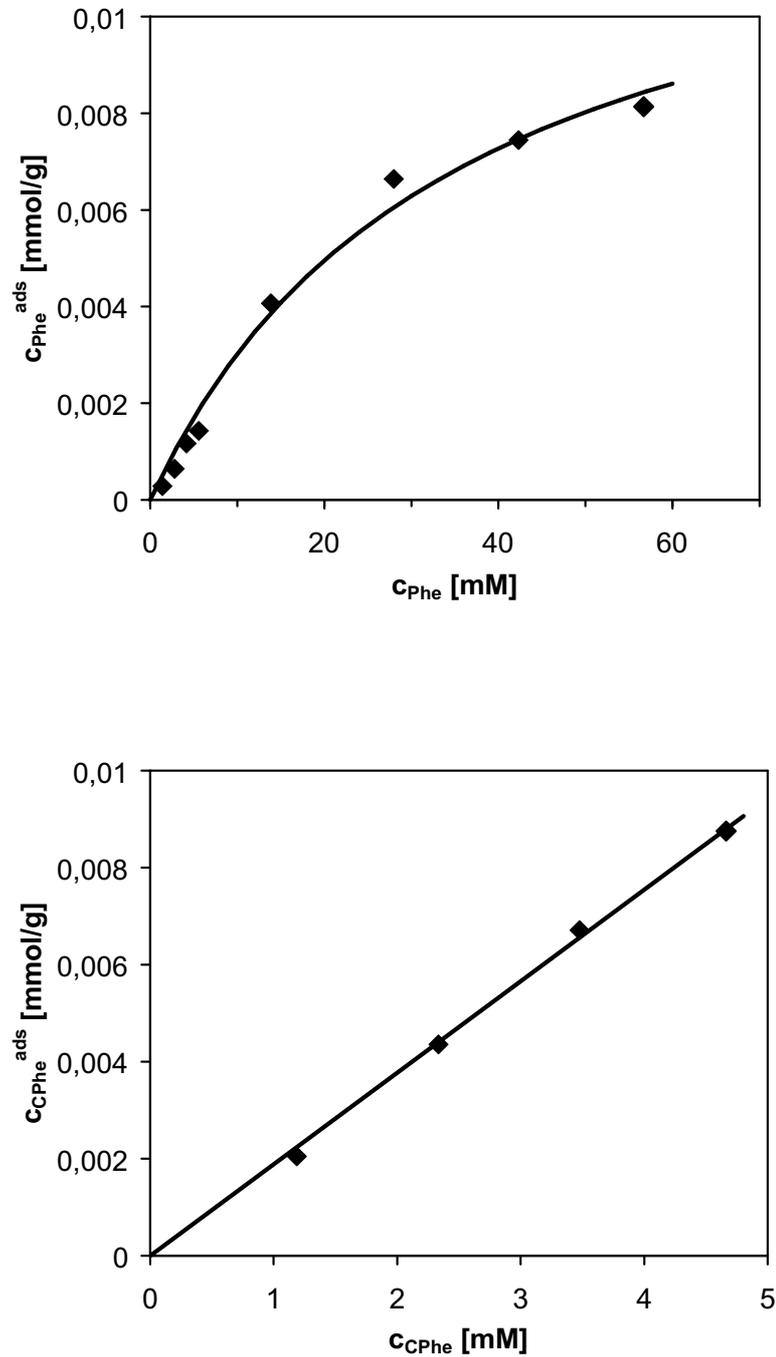


Abbildung 34: Isothermen für die Adsorption von Phe (oben) und CPhe (unten) an Q-Sepharose FF (37 °C, 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5). Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

im Fall der Aminosäure die zufriedenstellende Beschreibung der experimentellen Daten mit einer nichtlinearen Isothermengleichung gelang,

$$\bar{c} = \frac{k_1 c}{k_2 + c} \quad (77)$$

welche von Langmuir für das Gleichgewicht an homogenen Oberflächen bei monomolekularer Beladung abgeleitet wurde, galt für das Carbamoylphenylalanin eine lineare Isotherme, die mit $c \ll k_2$ aus Gl. 77 folgt:

$$\bar{c} = k_H c \quad (78)$$

Ebenso fand M. Abendschein [1] bei Versuchen zur Adsorption von Benzylhydantoin einen linearen Zusammenhang zwischen der Beladung und der Konzentration in der Flüssigphase.

Die Gültigkeit der Langmuir-Isotherme für Phenylalanin ist vor allem auf seine bessere Löslichkeit (Tab. 8, S. 49) zurückzuführen, die Experimente mit zehnfach höheren Konzentrationen erlaubte. Alle geschätzten Modellparameter der Isothermengleichungen 77 bzw. 78 sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Bei mehrfacher Verwendung des Ionenaustauschers zeigte sich eine starke Abnahme des Adsorptionsvermögens bezüglich Benzylhydantoin, die die in Abschnitt 6.1.1.4 beschriebene Korrektur des Parameters $k_{H, BnH}$ notwendig machte. Aus dem gleichen Grund wurden die Parameter für Carbamoylphenylalanin und Phenylalanin in den Abschnitten 6 und 7 zur Verbesserung der Übereinstimmung zwischen Messwerten und Modellsimulationen einmalig nachjustiert.

	k_1	k_2	k_H
	[mmol/g]	[mmol/L]	[L/g]
Benzylhydantoin	-	-	$2,61 \cdot 10^{-3}$
Carbamoylphenylalanin	-	-	$1,89 \cdot 10^{-3}$
Phenylalanin	$13,7 \cdot 10^{-3}$	35,2	-

Tabelle 16: Parameter der Isothermengleichungen 77 bzw. 78 für die Adsorption von BnH, CPhe bzw. Phe an Q-Sepharose FF (37 °C, 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5).

5.7 Charakterisierung der Vermischung in den Reaktoren

5.7.1 Terminale Mischzeit im Membranreaktor

Voraussetzung für den im Abschnitt 3.2 gewählten Modellansatz eines idealen Rührkessels zur mathematischen Beschreibung des Membranreaktors (Abschnitt 2.2.1) ist eine im Vergleich mit Reaktion und Lösungsvorgängen schnelle Durchmischung. Als charakteristische Größe der Durchmischung wurde daher die terminale Mischzeit, die bis zum Erreichen einer bestimmten Mischgüte

verstreicht, mit Hilfe von Pulsexperimenten bestimmt. Nach pulsartiger Zugabe einer geringen Menge an inertem Spurstoff wurde mit einem geeigneten Sensor als Systemantwort der zeitliche Konzentrationsverlauf gemessen, welcher sich der mittleren Spurstoffkonzentration annäherte. Definiert ist die terminale Mischzeit t_m als Zeitspanne zwischen Spurstoffpuls und demjenige Zeitpunkt, ab dem der Konzentrationsverlauf ein Band von $\pm 5\%$ (oder $\pm 2,5\%$) um den Endwert nicht mehr verlässt. Die Breite dieses Bandes kennzeichnet die Homogenität im Reaktor und somit die Mischgüte. Ergebnisse von Mischzeitexperimente sind häufig nur eingeschränkt mit entsprechenden Literaturangaben vergleichbar, da das Antwortsignal für gegebene Versuchsbedingungen stark vom Puls- und Messort abhängt [76].

Dem mit 650 mL vollentsalztem Wasser gefüllten Membranreaktor wurde als Spurstoff jeweils 1,5 mL gesättigte NaCl-Lösung (Löslichkeit in Wasser bei 30 °C: 363 g/L [66]) mit einer Spritze pulsartig zugegeben. Aufgrund ihrer Abmessungen erforderte die verwendete Leitfähigkeitsmesssonde (LF 95, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim) vorab den Einbau längerer Glasschüsse in den Membranreaktor, um die Höhe des Reaktionsraums zu ver-

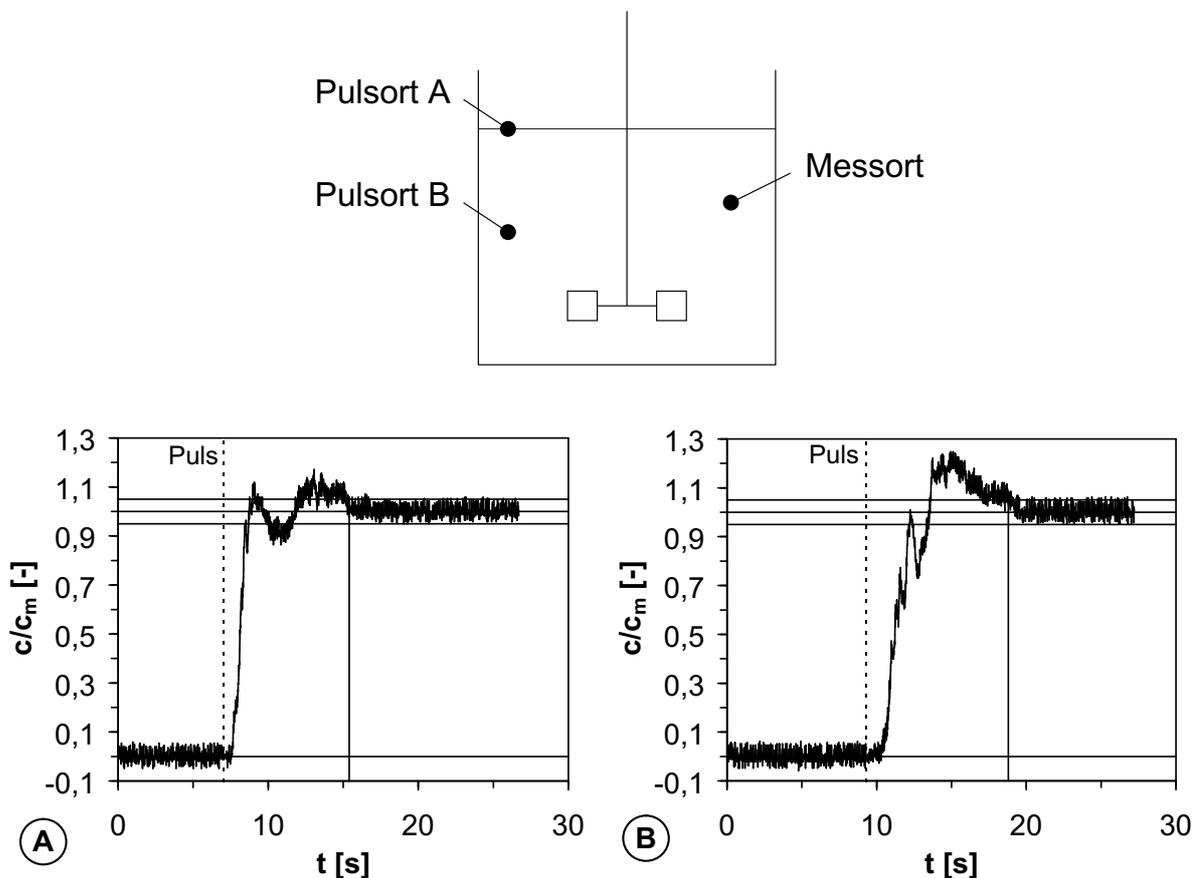


Abbildung 35: Normierte Systemantworten für einen Puls auf die Flüssigkeitsoberfläche (A) bzw. in den Kern der Strömung (B) des Membranreaktors aus Abschnitt 2.2.1 ($V_{RK} = 650$ mL, $n = 500$ 1/s).

größern. Das Signal der Sonde, deren Ansprechzeit weniger als 150 ms betrug, wurde mit dem Prozessleitsystem rho-Prozess Control Pro (rhothron, Bexbach-Frankenholz) online erfasst und abgespeichert. Bei einer Drehzahl von 500 1/s und einem Durchmesser des Scheibenrührers von 40 mm folgte die Rührer-Reynolds-Zahl

$$Re_R = \frac{n d_R^2}{\nu} \quad (79)$$

zu $Re_R = 1,3 \cdot 10^4$, womit die hydrodynamischen Verhältnisse gemäß Leistungscharakteristik für einen Rührkessel ohne Strombrecher [58, 62] im Übergangsbereich zwischen laminarer und turbulenter Strömung lagen.

Abb. 35 zeigt normierte Systemantworten für einen Puls auf die Flüssigkeitsoberfläche (A) bzw. in den Kern der Strömung (B). Dabei war der Messort diametral zum Pulsort angeordnet. Insbesondere Abb. 35 (A) verdeutlicht, dass die Spurstoffwolke von der Zirkulationsströmung in zunehmenden zeitlichen Abständen an der Messsonde vorbeigeführt wurde und sich nach zwei Umläufen gleichmäßig im Reaktor verteilt hatte. Ein Vergleich der terminalen Mischzeiten $t_{m,95} = 8,4$ s für (A) bzw. $t_{m,95} = 9,5$ s für (B) belegt den Einfluss des Pulsortes auf den Verlauf des Antwortsignals. Da die Versuche mit Stoffumsetzungen bei einer Drehzahl von $n = 300$ 1/s erfolgten, wurde die terminale Mischzeit gemäß der für turbulente Strömungsverhältnisse gültigen Beziehung $n t_m = const.$ [52] zu $t_{m,95} = 15,8$ s für den Fall (B) abgeschätzt, welche damit mehr als eine Größenordnung kleiner war als die charakteristischen Zeiten der Reaktionen und Lösungsvorgänge und den Modellansatz des idealen Rührkessels rechtfertigte.

5.7.2 Axiale Dispersion im Festbettreaktor

Abweichungen vom idealen Strömungsverhalten eines Festbettreaktors infolge turbulenter Vermischung bzw. Wirbelbildung können mit verschiedenen Modellansätzen berücksichtigt werden. Das Dispersionsmodell, welches der Bilanzgleichung für die Bulk-Phase des Festbettreaktors (Gl. 2, S. 33) im Abschnitt 3.3 zugrunde liegt, beschreibt die Rückvermischung in Analogie zur Diffusion und erfordert als Modellparameter den axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} . Neben einer theoretisch abgeleiteten Gleichung für laminare Strömung in Leerrohren (Taylor, Aris in [2]) bestehen zahlreiche empirische Beziehungen [72, 16] der Gestalt $Pe_P = f(Re_P, Sc, \epsilon_{Fb})$, die die Berechnung von D_{ax} mit Hilfe der auf den Partikeldurchmesser bezogenen Peclet-Zahl

$$Pe_P = \frac{u_0 d_K}{\epsilon_{Fb} D_{ax}} \quad (80)$$

ermöglichen. Generell gilt, dass die Partikel-Peclet-Zahl für Flüssigkeitsströmungen über weite Bereiche annähernd konstant ist [52, 2] und mit zunehmender Partikel-Reynolds-Zahl Re_P bzw. Festbettporosität ϵ_{Fb} gegen einen Grenzwert von $Pe_P = 2$ strebt.

Da die empirischen Beziehungen überwiegend für Füllkörper bzw. Festbettschüttungen, die in ihrer Struktur stark von dem verwendeten Ionenaustauscher Q-Sepharose FF abweichen, aufgestellt

wurden, erfolgte in dieser Arbeit eine Schätzung von Pe_P (bzw. D_{ax}) mit Hilfe experimenteller Daten.

Geeignet zur Charakterisierung der Rückvermischung sind Laborversuche, die das Antwortverhalten des Festbettreaktors auf eine definierte Anregung am Zulauf z.B. in Form einer Pulsfunktion (Dirac'sche δ -Funktion) oder Sprungfunktion ermitteln. Bei pulsartiger Zudosierung eines inerten Spurstoffes folgt die Verweilzeitverteilung $E(t)$ aus der augenblicklichen Spurstoffkonzentration $c(t)$ am Reaktorablauf:

$$E(t) = \frac{\dot{n}}{n_0} = \frac{\dot{V} c(t)}{\int_0^\infty \dot{V} c(t) dt} = \frac{c(t_i)}{\sum_0^\infty c(t_i) \Delta t_i} \quad (81)$$

Die Sprungfunktion wird durch sprungartige Erhöhung der Spurstoffkonzentration im Zulauf auf den konstanten Wert c_0 realisiert und liefert mit der normierten Systemantwort die Verweilzeitsumme $F(t)$:

$$F(t) = \frac{c(t)}{c_0} = \frac{c(t_i)}{c_0} \quad (82)$$

Mit der mittleren hydrodynamischen Verweilzeit $\tau = \epsilon_{Fb} L/u_0$ ergeben sich die folgenden dimensionslosen Beziehungen:

$$\theta = t/\tau \quad (83)$$

$$E(\theta) = \tau E(t) \quad (84)$$

$$F(\theta) = F(t) \quad (85)$$

Für die Experimente zur Identifizierung der Partikel-Peclet-Zahl Pe_P diente ein mit Q-Sepharose FF gepackter Festbettreaktor (XK16, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg), der einen Innendurchmesser von 1,6 cm und ca. 10 cm Betthöhe aufwies. Als inerter Spurstoff wurden am Kopf der Säule 1,1 mL 1%ige Acetonlösung pulsartig ($\Delta t \approx 1$ s) mit einer Spritze in einen kontinuierlich über das Festbett gepumpten Trägerstrom (0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5, 37 °C) injiziert. Zur photometrischen Detektion des Antwortsignals war der Ablauf des Festbettreaktors unmittelbar mit einer Durchflussmesszelle verbunden. Die angestrebte Verringerung des Spurstoffvolumens hätte aus messtechnischen Gründen eine Erhöhung der Acetonkonzentration erfordert, was im Hinblick auf die eingeschränkte Stabilität des Werkstoffs der Säule jedoch nicht möglich war.

Ergänzend zur inerten Acetonlösung wurde 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung als Spurstoff genutzt, so dass in diesem Fall Adsorptionsvorgänge die Verweilzeitverteilung überlagerten. Pulsversuche konnten nicht durchgeführt werden, da die Empfindlichkeit der photometrischen online-Analytik (Messwellenlänge $\lambda = 247$ nm) auch bei Verwendung von Spurstofflösungen mit maximaler Konzentration nicht zur Detektion der stark verschmierten Pulsantworten hinreichte. Alternativ wurden Sprungantworten und Antworten auf rechteckförmige Anregungen, die sich durch Hin- und Herschalten des Reaktorzulaufs zwischen Puffer- und Benzylhydantoinlösung ergaben ($V_{Spurstoff} = 5$ mL, $\Delta t \approx \tau$), bestimmt.

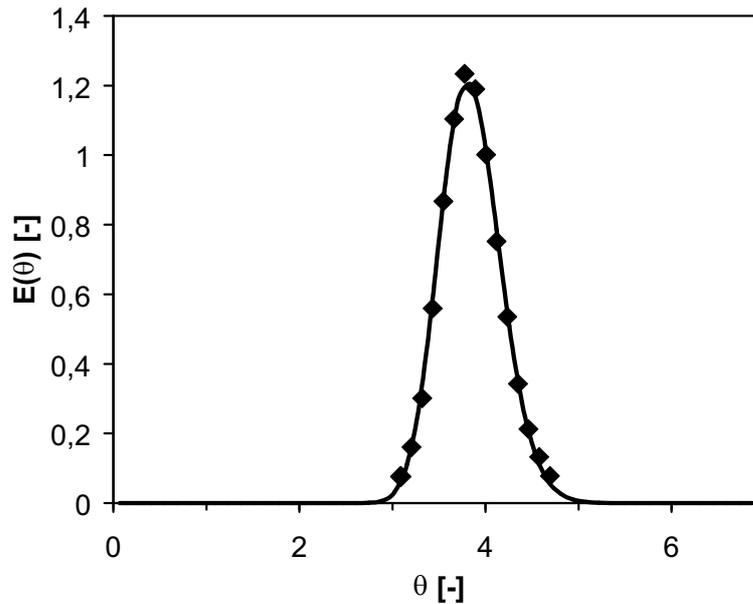


Abbildung 36: Verweilzeitverteilung für den Festbettreaktor nach einem inerten Acetonpuls, $\tau = 44$ s. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulation.

Jeweils eine Auswahl der kontinuierlichen Messwerte wurde gemäß den Gl. 81 und 84 bzw. 82 und 85 ausgewertet und zusammen mit simulierten Plus- bzw. Sprungantworten zur Berechnung eines Fehlerkriteriums genutzt, das durch Optimierung des Modellparameters Pe_P minimiert wurde. Alle weiteren Parameter für das detaillierte Modell des Festbettreaktors (Abschnitt 3.3) entsprachen den Angaben in den vorhergehenden Abschnitten. Eine Abweichung bestand beim experimentell ermittelten Hohlraumanteil, der mit $\epsilon_{Fb} = 0,24$ um 20 % über dem entsprechenden Wert in Tab. 15, S. 84, lag. Ursache dafür war die ungleiche Kompression der Festbett-Packungen in den verschiedenen Festbettreaktoren. Außerdem stellten sich im Zuge der Parameteroptimierung die Partikelporosität $\epsilon_K = 0,90$ (Tab. 15: $\epsilon_K = 0,91$) und der molekulare Diffusionskoeffizient des Benzylhydantoin $D_0 = 9,56 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($D_0 = 9,81 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ nach Wilke und Chang, S. 40) ein.

Die Verweilzeitverteilung des Festbettreaktors nach einem inerten Acetonpuls zeigt Abb. 36. Das Eingangssignal wurde im Festbettreaktor stark aufgeweitet und entsprechend in seiner Höhe reduziert. Auffällig ist die Abweichung der mittleren Verweilzeit t_m von der mittleren hydrodynamischen Verweilzeit τ (d.h. $\theta_m \approx 3,8 \neq 1$). Der Grund für die zeitliche Verzögerung der Pulsantwort besteht darin, dass sich das Aceton nicht nur in der Bulkphase bewegt, sondern diffusiv in die Körner transportiert wird, und somit ein größeres Volumen im Festbettreaktor erfüllt.

In Abb. 37 sind die Systemantworten auf verschiedene Anregungsfunktionen bei Verwendung von Benzylhydantoinlösung als Spurstoff dargestellt. Deutlichster Unterschied im Vergleich mit der Antwort beim Acetonpuls ist das weitere Anwachsen der mittleren Verweilzeit ($\theta_m \approx 13,3$), welches mit der Zurückhaltung des Benzylhydantoin in den Poren der Ionenaustauscher-Körner

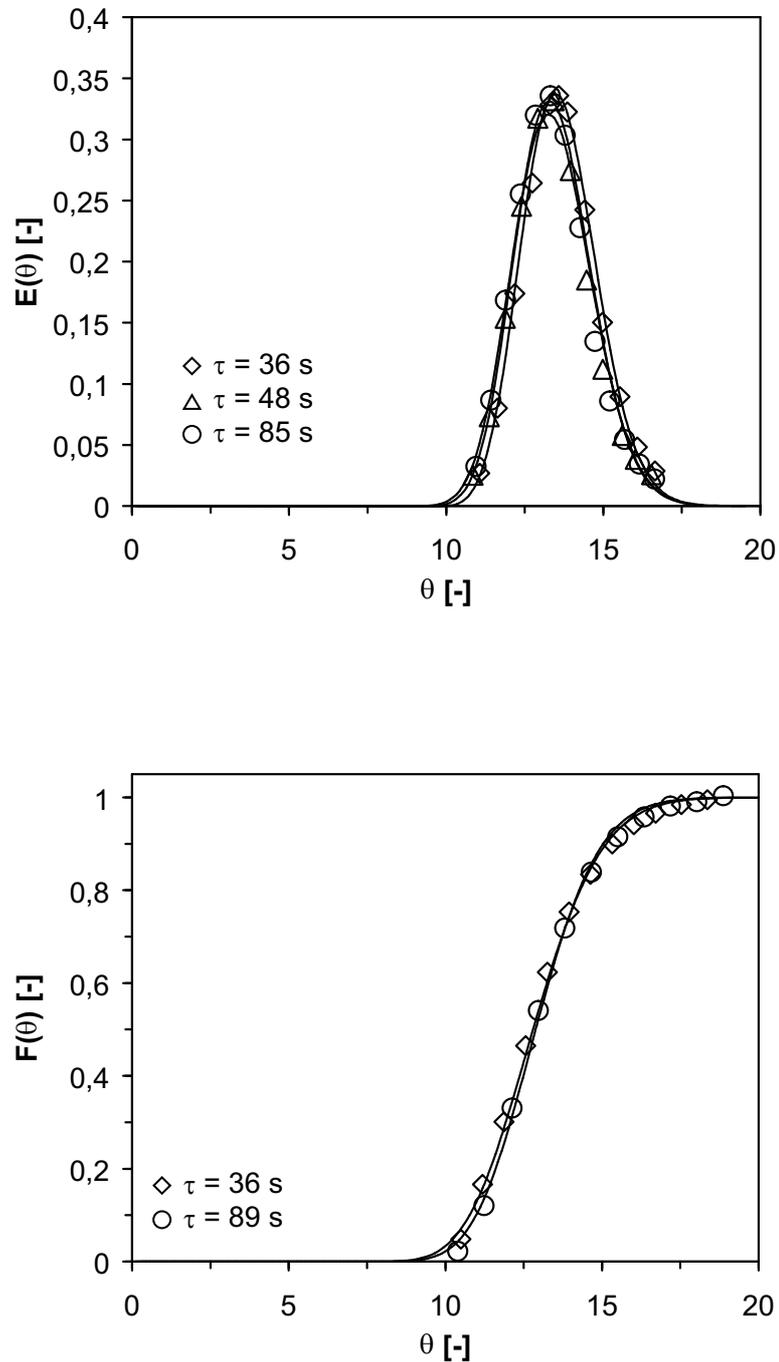


Abbildung 37: Systemantworten des Festbettreaktors auf rechteckförmige Eingangssignale (oben) bzw. sprungförmige Anregungen (unten) bei verschiedenen mittleren hydrodynamischen Verweilzeiten τ . Als Spurstoff wurde 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung verwendet. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

infolge Adsorption und Desorption zu erklären ist (Abschnitt 5.6.2). Da sich die Verläufe der Antwortsignale im untersuchten Bereich mit abnehmender Verweilzeit τ nicht veränderten, war die Diffusion auch bei der höchsten Leerrohrgeschwindigkeit scheller als der konvektive Transport und es erfolgte stets ein rascher Konzentrationsausgleich zwischen Porenvolumen und Bulk.

Tab. 17 fasst die Ergebnisse der Parameteridentifizierung für verschiedene Verweilzeiten τ zusammen. In Übereinstimmung mit theoretischen Erwägungen und den eingangs angeführten empiri-

τ	Re_P	Pe_P	Pe
[s]			
85	$4,1 \cdot 10^{-2}$	0,44	419,5
48	$7,1 \cdot 10^{-2}$	0,57	545,3
36	$9,6 \cdot 10^{-2}$	0,73	698,9

Tabelle 17: Partikel-Peclet-Zahlen Pe_P für verschiedene Verweilzeiten τ . Experimentelle Grundlage waren Verweilzeitverteilungen nach rechteckförmiger Anregung des Eingangs mit Benzylhydantoin. Die auf die Reaktorlänge bezogenen Peclet-Zahlen Pe wurden aus Pe_P berechnet.

schen Korrelationen wuchs die Partikel-Peclet-Zahl Pe_P mit abnehmender Verweilzeit (linear) an. Ferner bestätigt die von Ruthven [72] für Strömungen durch poröse Partikel angegebene Beziehung

$$\frac{1}{Pe_P} = 0,5 \epsilon_{Fb} + \frac{20}{Re_P Sc} \quad (86)$$

den im untersuchten Bereich (mit $0,5 \epsilon_{Fb} \ll 20 (Re_P Sc)^{-1}$) näherungsweise linearen Zusammenhang zwischen der Partikel-Peclet Zahl Pe_P und dem Produkt aus Reynolds- und Schmidt-Zahl $Re_P Sc$. Jedoch resultiert aus Gl. 86 im Vergleich mit den experimentellen Daten eine ca. 4-fach größere Steigung, was eventuell auf die bereits erwähnte Struktur des Fast Flow Materials zurückzuführen ist, bei dem ein Großteil der Poren nicht im Partikel endet sondern durch das Partikel hindurchführt. Der Einfluss des Hohlraumanteils ϵ_{Fb} auf Pe_P wurde nicht systematisch untersucht, doch zeigten sich in Abhängigkeit von der Kompression der Festbett-Packungen Schwankungen der experimentell ermittelten Peclet-Zahlen von bis zu 15 %.

Zur Bewertung der Rückvermischung sind in Tab. 17 die auf die Reaktorlänge L bezogenen Peclet-Zahlen

$$Pe = \frac{u_0 L}{\epsilon_{Fb} D_{ax}} = Pe_P \frac{L}{d_K} \quad (87)$$

angegeben. Die gefundenen Werte zeigen, dass das Verhalten des Festbettreaktors näherungsweise dem eines idealen Rohrreaktors mit Pfropfenströmung entsprach, was für Peclet-Zahlen $Pe \geq 100$ gilt [2].

Aus reaktionstechnischer Sicht bestätigte diese Charakteristik die Durchführung der im Abschnitt 5.4 beschriebenen Racemisierungsreaktion pseudo 1. Ordnung in einem Festbettreaktor.

Die geringe Rückvermischung veranschaulicht auch das Zellenmodell, das einen realen Rohrreaktor alternativ zum Dispersionsmodell als Kaskade von N hintereinander geschaltetet Rührkesseln abbildet. Mit $Pe \geq 50$ läßt sich die Kesselzahl gemäß $N \approx Pe/2$ zu mindestens 210 abschätzen, wobei bereits ab $N = 6$ Kesseln die Eigenschaften eines Strömungsrohres gegeben sind.

6 Vergleich von Modellsimulationen mit experimentellen Beobachtungen des Verhaltens der Gesamtanlage

6.1 Validierung des dynamischen Anlagenmodells

Die anhand von Laborexperimenten parametrisierten Teilmodelle des Abschnitts 5 werden im folgenden auf den größeren Maßstab der Versuchsanlage (Abschnitt 2.2) übertragen und Simulationsergebnisse mit entsprechenden Versuchsdaten verglichen. Im Unterschied zu den Laborexperimenten kamen bei der Untersuchung der zentralen Reaktionen – Hydantoinase- bzw. Carbamoylase-katalysierte Stoffumsetzung und Racemisierung des Substrats – Festbettreaktoren zum Einsatz (Abschnitt 6.1.1). Schrittweise wurden die Einzelapparate sowohl in der Versuchsanlage als auch im mathematischen Modell bis hin zum Gesamtprozess zusammengeschaltet.

6.1.1 Einzelapparate

6.1.1.1 Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase im Festbettreaktor. Einfluss der Verweilzeit Der experimentelle Aufbau zur Untersuchung Hydantoinase-katalysierter Stoffumsetzungen im differentiellen Festbettreaktor bestand aus der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Versuchsanlage, jedoch ohne den mit Ionenaustauscher gepackten Festbettreaktor FB2 und die Einrichtung zur Titration mit NaOH (Abb. 2, S. 26). In einem geschlossenen Kreislauf wurde die Reaktionslösung vom Membranreaktor MR durch den Festbettreaktor FB1 gepumpt und wieder zurückgeführt. Eine ähnliche Anordnung nutzten Clapés et al. [17] im Fall der Synthese eines Dipeptids mit α -Chymotrypsin zur Identifizierung kinetischer Parameter auf der Grundlage von Zeit-Umsatz-Kurven.

Der Selbstbau-Festbettreaktor enthielt ca. 25 g immobilisierte Hydantoinase, woraus ungefähr 2 cm Betthöhe resultierten. Zu Versuchsbeginn wurden im Membranreaktor 250 mL einer 8 mM D,L-Benzylhydantoin-Lösung (Abschnitt 4.3) vorgelegt. Wie bei den Experimenten mit gelöster Hydantoinase herrschten die Standard-Reaktionsbedingungen (37 °C, 0,2 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,5). Zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts dienten die online-Signale des Polarimeters und des Photometers. Am Probenahmeventil V entnommene Proben erlaubten die offline-Analyse der Konzentrationen aller in der Reaktionslösung enthaltenen Komponenten mittels chiraler HPLC (Abschnitt 4.5.1).

Die dynamische Simulation der Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin beruhte auf der in Abb. 5(2), S. 31 dargestellten Verschaltung des Membranreaktors mit dem Festbettreaktor zu einem geschlossenen Kreislauf. Für das kinetische Modell der Hydantoinase wurden die im Abschnitt 5.1 bestimmten Michaelis-Menten und Inhibierungskonstanten des gelösten Enzyms (Tab. 10, S. 62) verwendet. Nur die in Tab. 4, S. 43 zusammengefassten Maximalraten des immobilisierten Enzyms wurden neu geschätzt. Alle weiteren Parameter, die das Reaktormodell (Abschnitt 3.3)

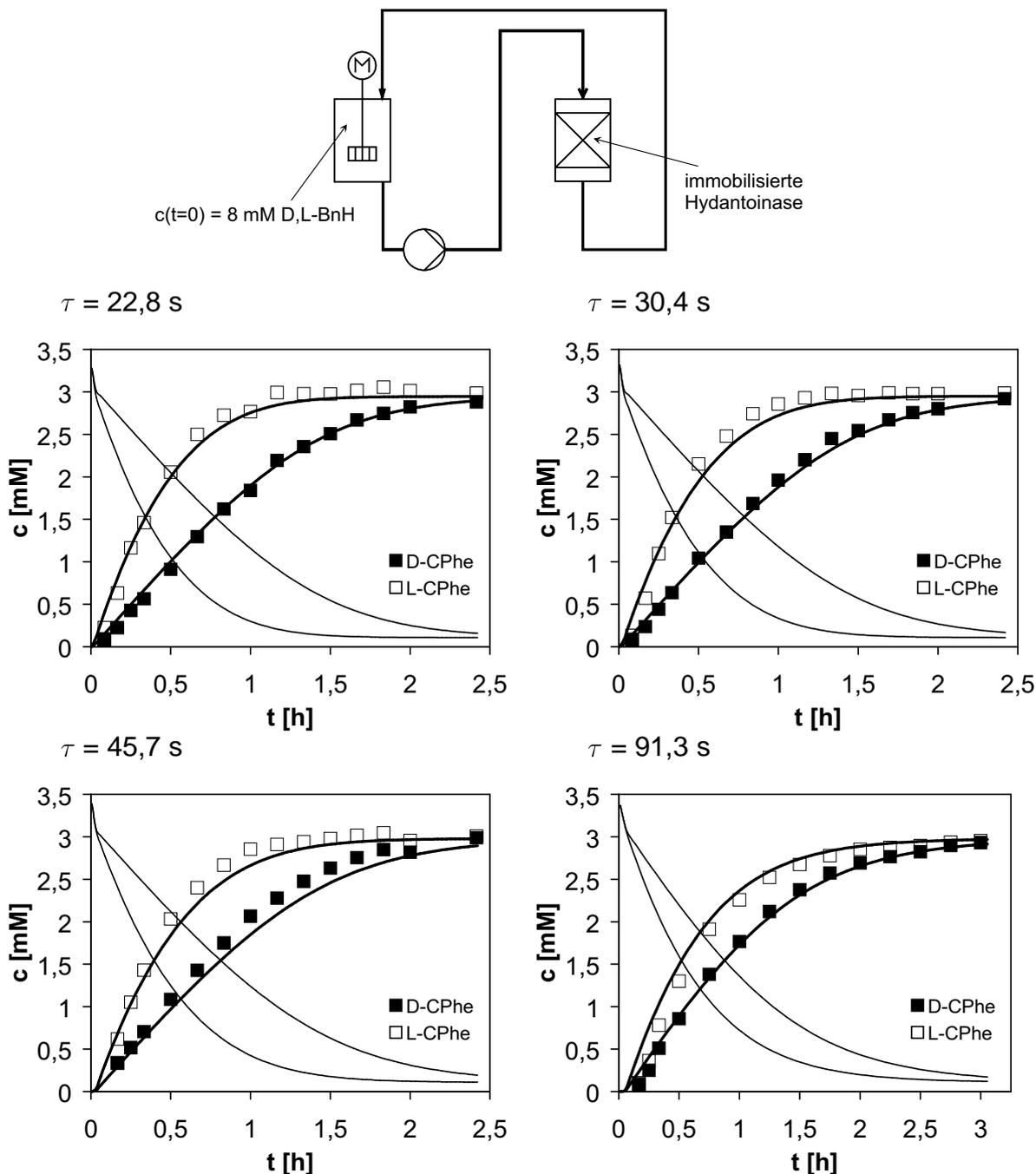


Abbildung 38: Einfluss der Verweilzeit im Festbettreaktor auf die zeitlichen Konzentrationsverläufe im Membranreaktor bei der absatzweisen Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

betreffen, wie z.B. die Porositäten ϵ_{Fb} bzw. ϵ_K der Eupergit C 250L Schüttung, entsprechen den Angaben in den vorhergehenden Abschnitten. Durch Verdünnung mit ca. 40 mL Tris-HCL-Puffer in den Pumpen und Schläuchen der Anlage verringerte sich die Gesamtkonzentration von 8 mM auf 6,85 mM.

Mit diesem einen Parametersatz gelang die Simulation der in Abb. 38 dargestellten zeitlichen Konzentrationsverläufe, die gut mit den experimentellen Daten für vier verschiedene Volumenströme ($Q = 0,5 \parallel 1 \parallel 1,5 \parallel 2 \text{ L/h}$) übereinstimmen. Die deckungsgleichen Verläufe im Fall der beiden kürzesten Verweilzeiten ließen auf Abwesenheit äußerer Stofftransportlimitierungen schließen, so dass hier allein die Kombination aus internem Stofftransport mit der Kinetik der gelösten Hydantoinase zur kinetischen Beschreibung des immobilisierten Enzyms ausreichte. Strukturelle Veränderungen des Enzyms durch kovalente Bindung an einen Träger, die unter anderem mit Verschiebungen der kinetischen Parameter einhergehen [8], waren daher für die Hydantoinase nicht zu erwarten. Zum anderen bestätigt die durch Transporteffekte beeinflusste Umsetzung mit der längsten Verweilzeit die Gültigkeit des Reaktormodells, da hier die Auswirkungen der Kombination von Reaktion und Stofftransport richtig prognostiziert wurden.

Die Angleichung der Konzentrationsverläufe von D- und L-Benzylhydantoin mit zunehmender Verweilzeit verdeutlicht Abb. 39 durch die von Chen et al. [12] zur Bewertung kinetischer Racematspaltungen propagierte Darstellung des Enantiomerenüberschusses ee_S gegenüber dem Umsatz U (Gl. 51, S. 53). Ursache für dieses Verhalten war das Anwachsen des externen Transportwiderstandes bei geringer werdender Leerrohrgeschwindigkeit bzw. die damit verbundene Verkleinerung der Biot-Zahl. Wie in Abschnitt 5.3.2 gezeigt, fällt der Effektivitätsfaktor η der Umsetzung von L-Benzylhydantoin mit abnehmender Biot-Zahl Bi stärker ab als derjenige des D-Substrats (Abb. 27, S. 73). Daher verschiebt sich das Verhältnis der effektiven Reaktionsraten zu Gunsten der Umset-

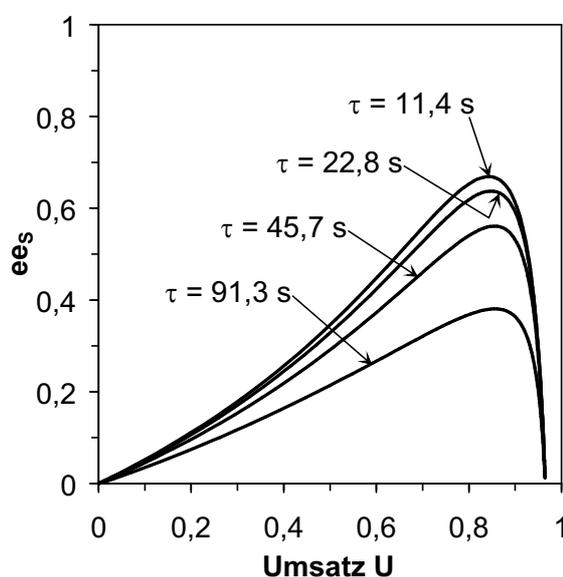


Abbildung 39: Einfluss der Verweilzeit auf den maximal erreichbaren Enantiomerenüberschuss bei der absatzweisen Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase im differentiellen Festbettreaktor. Für die Modellsimulationen wurde der Volumenstrom durch den Festbettreaktor variiert.

zung von D-Benzylhydantoin, und der maximal erreichbare Enantiomerenüberschuss nimmt ab.

Der für Verweilzeiten $\tau \geq 11,4$ s unveränderliche ‚Grenzverlauf‘ entspricht den Ergebnissen mit der gelösten Hydantoinase und ist daher allein durch die biochemischen Eigenschaften des Enzyms ohne Transportlimitierungen festgelegt.

Alle weiteren Untersuchungen wurden mit dem Volumenstrom $Q = 2$ L/h (das entspricht $\tau = 22,8$ s) durchgeführt, so dass im Sinne einer kinetischen Racematspaltung optimale Bedingungen hinsichtlich des maximal erreichbaren Enantiomerenüberschusses vorlagen.

6.1.1.2 Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase im Festbettreaktor. Einfluss der Menge an L-Carbamoylase Zur Untersuchung der zweistufigen Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin diente die im vorhergehenden Abschnitt 6.1.1.1 beschriebene Versuchsanordnung. In einem geschlossenen Kreislauf wurde die Reaktionslösung mit dem konstanten Volumenstrom $Q = 2$ L/h vom Membranreaktor durch den Festbettreaktor gepumpt und wieder zurückgeführt. Die beiden immobilisierten Enzyme Hydantoinase (ca. 25 g) und L-Carbamoylase (ca. 8 bzw. 18 g) wurden in verschiedenen Mengenverhältnissen gründlich miteinander vermischt und anschließend in den Selbstbau-Festbettreaktor gepackt. Es ergaben sich Bett Höhen zwischen 2 und 3 cm.

Diese Anordnung bewirkte, dass das im ersten Schritt mit Hilfe der Hydantoinase gebildete Zwischenprodukt L-Carbamoylphenylalanin der Rückreaktion zum Substrat durch Bildung von L-Phenylalanin im Carbamoylase-katalysierten zweiten Schritt größtenteils entzogen wurde. Voraussetzungen für die Nutzung eines Mischbetts waren die hinsichtlich pH- und Temperaturoptimum sowie Inaktivierung ähnlichen Eigenschaften der immobilisierten Enzyme [69, 23] und die schwachen (inhibitorischen) Wechselwirkungen der beiden katalysierten Reaktionen (Abschnitte 5.1.3.4 und 5.2.1) untereinander.

Die dynamische Simulation aus Abschnitt 6.1.1.1 wurden um das kinetische Modell der L-Carbamoylase zusammen mit den im Abschnitt 5.2 bestimmten Michaelis-Menten und Inhibierungskonstanten des gelösten Enzyms (Tab. 11, S. 68) sowie der neu geschätzten Maximalrate des immobilisierten Enzyms aus Tab. 4, S. 43 ergänzt.

Abb. 40 zeigt für zwei verschiedene Mengenverhältnisse der Enzymimmobilisate eine gute Übereinstimmung zwischen Messdaten und simulierten Konzentrationen im Membranreaktor. Die Umsetzung mit 8 g L-Carbamoylase wies bezüglich der L-Spezies die charakteristischen Konzentrationsverläufe einer Folgereaktion auf, deren zweite Reaktion langsamer als die erste abläuft. Daraus resultierte eine Akkumulation des Zwischenprodukts L-Carbamoylphenylalanin, die erst bei deutlich fortgeschrittener Umsetzung des Substrats L-Benzylhydantoin durch Reaktion zum Produkt L-Penylalanin abgebaut wurde. Hinsichtlich der Reaktion der D-Spezies war kein signifikanter Einfluss durch das L-Penylalanin festzustellen. Wird die langsame Racemisierungsreaktion des Benzylhydantoin vernachlässigt, so entspricht die Konzentration an L-Phenylalanin im stationären Zustand der Ausgangskonzentration des L-Substrats, und das Verhältnis von D-

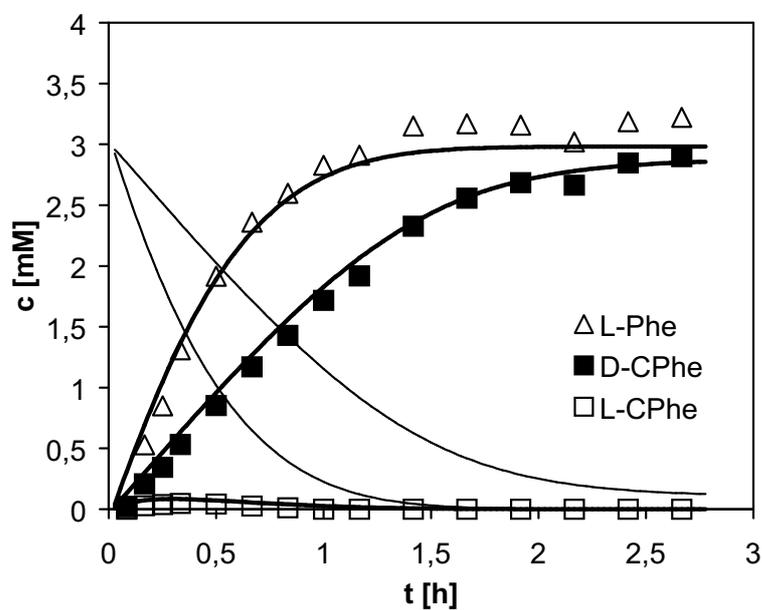
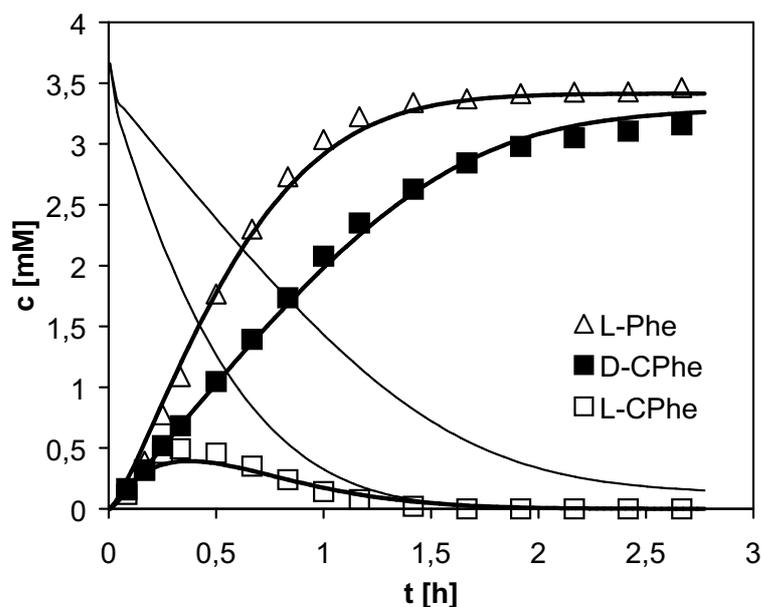
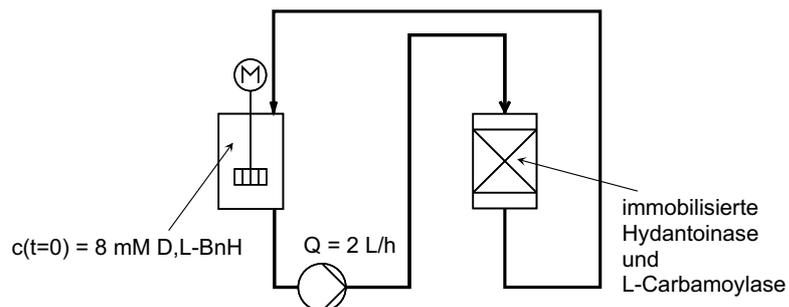


Abbildung 40: Zeitliche Konzentrationsverläufe im Membranreaktor bei der absatzweisen Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und verschiedenen Mengen an L-Carbamoylase (oben: 8 g und unten: 18 g immobilisierte L-Carbamoylase). Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

Benzylhydantoin zu D-Carbamoylphenylalanin wird durch die Gleichgewichtskonstante K_{eq} bestimmt. Unter Berücksichtigung von Verdünnungseffekten bestätigen die experimentellen Ergebnisse in Abb. 40 diese Näherung.

Durch Verwendung von mehr als der doppelten Menge an immobilisierter L-Carbamoylase (18 g, unteres Bild in Abb. 40) ließ sich die Bildung des Zwischenprodukts L-Carbamoylphenylalanin weitestgehend unterdrücken und die Zeitspanne bis zum Erreichen der maximalen Produktkonzentration um etwa 30 min auf ca. 1,5 h verkürzen.

6.1.1.3 Stabilität der immobilisierten Enzyme bei mehrfacher Verwendung Bei der Arbeit mit den immobilisierten Enzymen zeigte sich, dass die Inaktivierung während einer Umsetzung vernachlässigbar war. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von K. Ragnitz [69], wonach die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Enzymimmobilisate 14000 h für Hydantoinase bzw. 1000 h für L-Carbamoylase betragen (Abschnitt 5.3.1). Die mehrfache Verwendung der immobilisierten Enzyme führte jedoch zu teilweise deutlichen Aktivitätsverlusten, insbesondere bei der sauerstoffempfindlichen L-Carbamoylase, die sich trotz Stickstoffbegasung der Reaktionslösung auch in diesem Fall als das weniger stabile Enzym erwies. Zusätzliche Verfahrensschritte, die die beobachteten Stabilitätseinbußen jedoch nicht sicher zu erklären vermögen, waren das Spülen des Festbettreaktors mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 nach Beendigung einer Umsetzung, die Lagerung bei 4 °C und die Äquilibration auf die Reaktionstemperatur von 37 °C vor jeder neuen Verwendung.

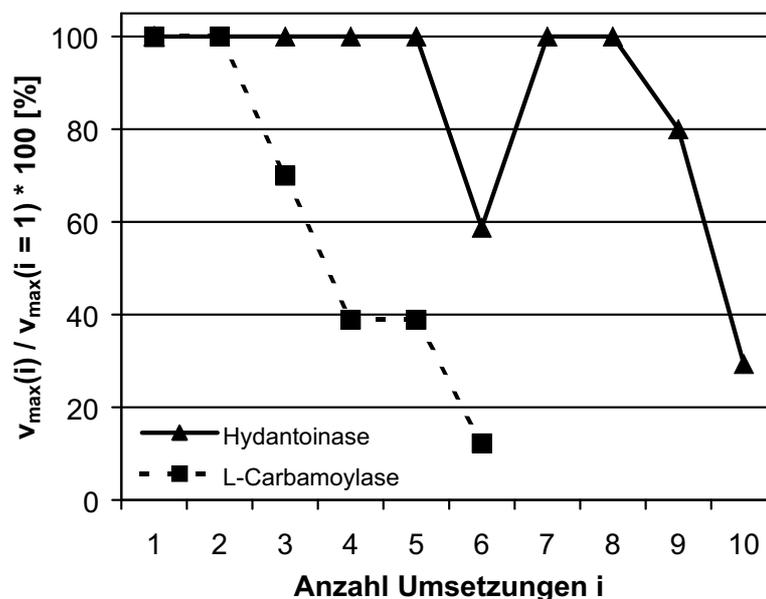


Abbildung 41: Inaktivierung der immobilisierten Enzyme bei mehrfacher Verwendung im Festbettreaktor der Versuchsanlage.

Bei den Modellsimulationen wurde die Inaktivierung durch Anpassung der Maximalraten, wie in Abb. 41 dargestellt, berücksichtigt. Während die Hydantoinase erst nach acht Zyklen einen massiven Einbruch der Aktivität aufwies, war für die L-Carbamoylase bereits vom ersten Zyklus an eine fortschreitende Inaktivierung zu verzeichnen. Im praktischen Einsatz bedeutet dies, dass die verbrauchte L-Carbamoylase häufiger ersetzt werden muss und sich zukünftig eine räumliche Trennung der beiden Enzymimmobilisate in zwei Festbettreaktoren empfiehlt.

6.1.1.4 Racemisierung von Benzylhydantoin im Festbettreaktor Eine Variante der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Versuchsanlage (Abb. 2, S. 26) – ohne den mit immobilisierten Enzymen gepackten Festbettreaktor FB1 – diente zur Untersuchung der Racemisierung von Benzylhydantoin im Festbettreaktor. Die Titration mit NaOH war aufgrund der Verwendung gepufferter Reaktionslösungen (0,2 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,5, 37 °C) nicht erforderlich. Zu Beginn enthielt der Membranreaktor 250 mL einer 6 mM D-Benzylhydantoin-Lösung (Abschnitt 4.3), die in einem geschlossenen Kreislauf vom Membranreaktor MR durch den mit ca. 325 g Q-Sepharose FF gefüllten Selbstbau-Festbettreaktor FB2 (Betthöhe ca. 22 cm) gepumpt ($Q = 2$ L/h) und wieder zurückgeführt wurde. Die Bestimmung der Gesamtkonzentration erfolgte photometrisch, und das Verhältnis von D- zu L-Benzylhydantoin resultierte aus den Messwerten des Polarimeters.

Dynamische Simulationen der Racemisierung im Festbettreaktor basierten auf dem Apparatemodell Nr. 2 in Abb. 5, S. 31, nämlich der Verschaltung des Membran- sowie Festbettreaktors zu einem geschlossenen Kreislauf. Die Parameter für das Modell des Festbettreaktors (Abschnitt 3.3), wie z.B. Dispersionskoeffizient D_{ax} und Hohlraumanteil ϵ_K der Q-Sepharose FF-Partikel, wurden aus den Untersuchungen der zugehörigen Teilsysteme übernommen. Lediglich die Bettporosität der Q-Sepharose FF im großen Festbettreaktor rührte nicht aus Abschnitt 5.6.1 her, denn aufgrund geringerer Kompression lag sie mit $\epsilon_{Fb} = 0,28$ um 40 % höher als der Wert in Tab. 15, S. 84.

Zunächst wurde die im Abschnitt 5.4 vorgestellte detaillierte Kinetik verwendet, bestehend aus Dissoziation des Benzylhydantoin, Adsorption an den Ionenaustauscher, Austausch gegen Chloridionen und spontaner sowie Ionenaustauscher-katalysierter Racemisierung. Mit dieser Konfiguration traten jedoch zwei schwerwiegende Probleme auf.

Zum einen wuchs der Zeitbedarf einer Simulationsrechnung auf mehrere Stunden an, und für einige Arbeitspunkte war das Modell nicht mehr numerisch lösbar. Zum anderen wiesen die Simulationsergebnisse gravierende Abweichungen von den experimentellen Daten auf. So adsorbierte die Q-Sepharose FF deutlich weniger Benzylhydantoin als bei den vorangegangenen Versuchen der Abschnitte 5.4 und 5.6.2 zur Ermittlung der Adsorptionsisotherme. Daraus folgte unmittelbar eine unzulässige Extrapolation des detaillierten kinetischen Modells, da dieses für eine andere Verteilung von Benzylhydantoin zwischen flüssiger und fester Phase parametrisiert worden war. Insgesamt ergaben die Modellsimulationen eine im Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen um den Faktor sechs größere effektive Racemisierungsgeschwindigkeit.

Ursache des veränderten Adsorptionsverhaltens war die aus Kostengründen notwendige Wieder-

verwendung der Q-Sepharose FF, so dass die Schüttung nicht wie bei den kleinvolumigen Festbettreaktoren des Abschnitts 5.6.2 vor jedem Versuch durch frisches Material ersetzt wurde. Statt dessen erfolgte im Anschluß an einen Versuch die Regeneration und Äquilibrierung des Festbetts mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5. Diese Regenerationen blieben vermutlich aufgrund der geringen Löslichkeit des Benzylhydantoin im Elutionsmittel unvollständig und führten zur beobachteten Einschränkung des Adsorptionsvermögens infolge irreversibel belegter Adsorptionsplätze. Nach zweimaliger Nutzung stellte sich jedoch ein neues und reproduzierbares Adsorptionsgleichgewicht für Benzylhydantoin ein.

Die Behebung der numerischen Probleme erforderte eine Reduktion der Anzahl an Gleichgewichtsbedingungen, die als algebraische Gleichungen die ‚Performance‘ eines Integrators stark einschränken. Erreicht wurde dies, indem die Dissoziation des Benzylhydantoin und der Ionenaustausch nunmehr unberücksichtigt blieben. Allein die Adsorption bestimmte im vereinfachten Modell die Wechselwirkung zwischen Ionenaustauscher und Benzylhydantoin, unabhängig von seiner elektrischen Ladung. Auswirkungen auf das kinetische Modell der Racemisierung werden im folgenden beschrieben.

Ersatzmodell der Racemisierung

Das Ersatzmodell vereinigte sowohl die Racemisierung der undissoziierten und der dissoziierten Form des Benzylhydantoin als auch die Racemisierung in der Lösung sowie am Ionenaustauscher zu einem Schritt, der formal einer reversiblen Reaktion mit Teilreaktionen jeweils erster Ordnung entsprach. Das heißt, dass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Gl. 67 und 68 (S. 75, 78) zusammengezogen und auf die Gesamtkonzentration an Benzylhydantoin in der Flüssigphase bezogen wurden. Diese Vereinfachung bedeutete eine Einschränkung der Gültigkeit des Modells und erforderte bezüglich pH-Wert sowie Pufferkonzentration eine Festlegung standardisierter Reaktionsbedingungen.

Der in Gl. 65 bzw. 66 für ein *homogenes* Reaktionssystem definierte Modellparameter k_{Rac} wurde bei der Auswertung experimenteller und simulierter Daten, die mit dem verschalteten Festbett- und Membranreaktor gewonnen wurden (Aufbau s. Abb. 43), durch eine effektive Racemisierungskonstante k_{Rac}^{eff} ersetzt.

Auswirkungen der Modellreduktion auf die numerische Integration

Für die numerische Integration bedeutete das einfache Modell eine deutliche Reduktion der Anzahl an Komponenten. Anstelle der fünf Spezies $L-BnH$, $L-BnH^-$, $D-BnH$, $D-BnH^-$ und Cl^- wurden die beiden neutralen Substratenantiomere bilanziert. Gleichermäßen verringerte sich so in jedem finiten Volumenelement der Kornphase die Anzahl der algebraischen Gleichungen, die Adsorption und Ionenaustausch beschrieben. Zusätzlich entfielen die Bilanz der geladenen Komponenten auf der Ionenaustauscheroberfläche und die algebraischen Gleichungen zur Beschreibung der Dissoziation des Benzylhydantoin. Praktische Auswirkung war eine bis zu achtfache Beschleunigung der Rechenzeit, was wesentlich durch die Verringerung der Anzahl an algebrai-

schen Gleichungen verursacht wurde. Außerdem traten keine Simulationsabbrüche infolge numerischer Probleme auf.

Identifizierung der Konstante $k_{H, BnH}$ mit regenerierter Q-Sepharose FF

Die im Abschnitt 5.6.2 beschriebene Linearität der Adsorptionsisotherme erlaubte bei bekanntem axialen Dispersionskoeffizienten (Abschnitt 5.7.2) eine vereinfachte Identifizierung der Konstante $k_{H, BnH}$ anhand von experimentell ermittelten Systemantworten auf die sprunghörmige Anregung des Festbettreaktors mit 8 mM Benzylhydantoinlösung. Für einen Volumenstrom von 2 L/h zeigt Abb. 42 den simulierten Konzentrationsverlauf, der durch Variation der Konstante $k_{H, BnH}$ an das Messergebnis angeglichen wurde.

Der geschätzte Parameter betrug mit $k_{H, BnH} = 0,69 \cdot 10^{-3}$ L/g lediglich 26 % des Wertes, welcher sich aus den Experimenten ohne Wiederverwendung der Q-Sepharose FF ergab (Tab. 16, S. 87). Als Folge der geringeren adsorptiven Bindung nahm die Rückhaltung von Benzylhydantoin im Festbettreaktor und damit die dimensionslose mittlere Verweilzeit von $\theta_m \approx 13,3$ bei einmaliger Verwendung des Ionenaustauschers (Abschnitt 5.7.2) auf $\theta_m \approx 5,3$ (Abb. 42) ab.

Identifizierung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{Rac}

Die Experimente zur Racemisierung im geschlossenen System aus Membranreaktor und Festbettreaktor wiesen eine ausgeprägte instationäre Phase auf (oberes Diagramm in Abb. 43), die durch das Einschwingen der Gesamtkonzentration an Benzylhydantoin auf einen von Adsorption und

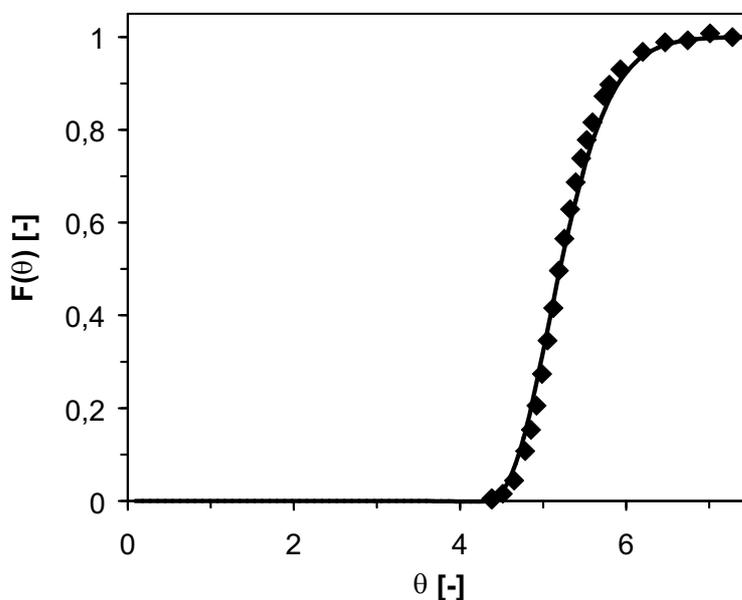


Abbildung 42: Verweilzeitverteilung für den Selbstbau-Festbettreaktor nach einer sprunghörmigen Anregung mit 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung, $\tau = 3,7$ min. Die experimentellen Daten dienen zur Identifizierung der Konstante $k_{H, BnH}$.

Verdünnung bestimmten Endwert gekennzeichnet war. Das erste Teilergebnis der Modellsimulation, nämlich die gute Übereinstimmung der gemessenen Gesamtkonzentration mit dem berechneten Konzentrationsverlauf im Membranreaktor, bestätigte die im vorhergehenden Abschnitt identifizierte Konstante $k_{H, BnH}$.

Wie die zeitliche Entwicklung des simulierten örtlichen Konzentrationsprofils in der Bulk-Phase verdeutlicht (unteres Diagramm in Abb. 43), entsteht im Zulaufbereich des Festbettreaktors anfangs eine Konzentrationsfront, die auf ihrem weiteren Weg abflacht, da die Benzylhydantoinkonzentration der aus dem Membranreaktor nachgeführten Reaktionslösung deutlich verringert ist infolge Adsorption an den Ionenaustauscher bei der vorhergehenden Passage durch das Festbett. Dieses Wechselspiel von Adsorption und Desorption bis zur Einstellung eines stationären Zustandes verursachte die gedämpfte Schwingung der Gesamtkonzentration an Benzylhydantoin im Membranreaktor.

Im zweiten Schritt dienten die hinsichtlich des Verhältnisses von D- zu L-Benzylhydantoin ausgewerteten polarimetrischen Daten der Identifizierung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k'_{Rac} in Gl. 64, S. 75. Diese wurde in mehreren Zyklen optimiert, bis die aus simulierten Konzentrations-Zeit-Verläufen nach Gl. 65 berechneten *effektiven* Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{Rac}^{eff} mit den experimentell gemäß Gl. 66 ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten übereinstimmten. Abb. 44 stellt das Ergebnis einer solchen Optimierung für den Volumenstrom $Q = 2$ L/h, 37 °C, $0,2$ M Tris-HCL-Puffer, pH 8,5 dar. Wie bei einer Reaktion erster Ordnung wurde jeweils die linke Seite der Gl. 65 und 66 gegenüber der Zeit aufgetragen.

Trotz prinzipieller Eignung des Ersatzmodells musste bei seiner Anwendung jedoch beachtet werden, dass der identifizierte Parameter $k_{Rac} = 2 k'_{Rac} = 1,4 \cdot 10^{-4}$ cm³/(g s) (hier als spezifische Größe angegeben) aufgrund der Modellvereinfachungen nur für die untersuchten Reaktionsbedingungen gültig war und deshalb keine Extrapolation erlaubte.

Simulationen mit variierten Verweilzeiten belegten die vollständige Nutzung des katalytischen Festbetts über seine gesamte Länge auch beim kleinsten im Experiment verwendeten Volumen-

Q [L/h]	τ [min]	k_{Rac}^{eff} [1/s]	
		Simulation	Experiment
2	11,9	$5,372 \cdot 10^{-5}$	$5,37 \cdot 10^{-5}$
1,5	15,9	$5,369 \cdot 10^{-5}$	$5,76 \cdot 10^{-5}$
1	23,8	$5,363 \cdot 10^{-5}$	$5,32 \cdot 10^{-5}$
0,5	47,7	$5,304 \cdot 10^{-5}$	$6,15 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 18: Abhängigkeit der effektiven Racemisierungskonstante von der Verweilzeit für die Ionenaustauscher-katalysierten Racemisierung von 6 mM D-Benzylhydantoin im Selbstbau-Festbettreaktor. Die Werte der Simulation wurden mit $k_{Rac} = 1,4 \cdot 10^{-4}$ cm³/(g s) ermittelt. Versuchsaufbau wie in Abb. 43, Reaktionsbedingungen: 37 °C, $0,2$ M Tris-HCL-Puffer, pH 8,5.

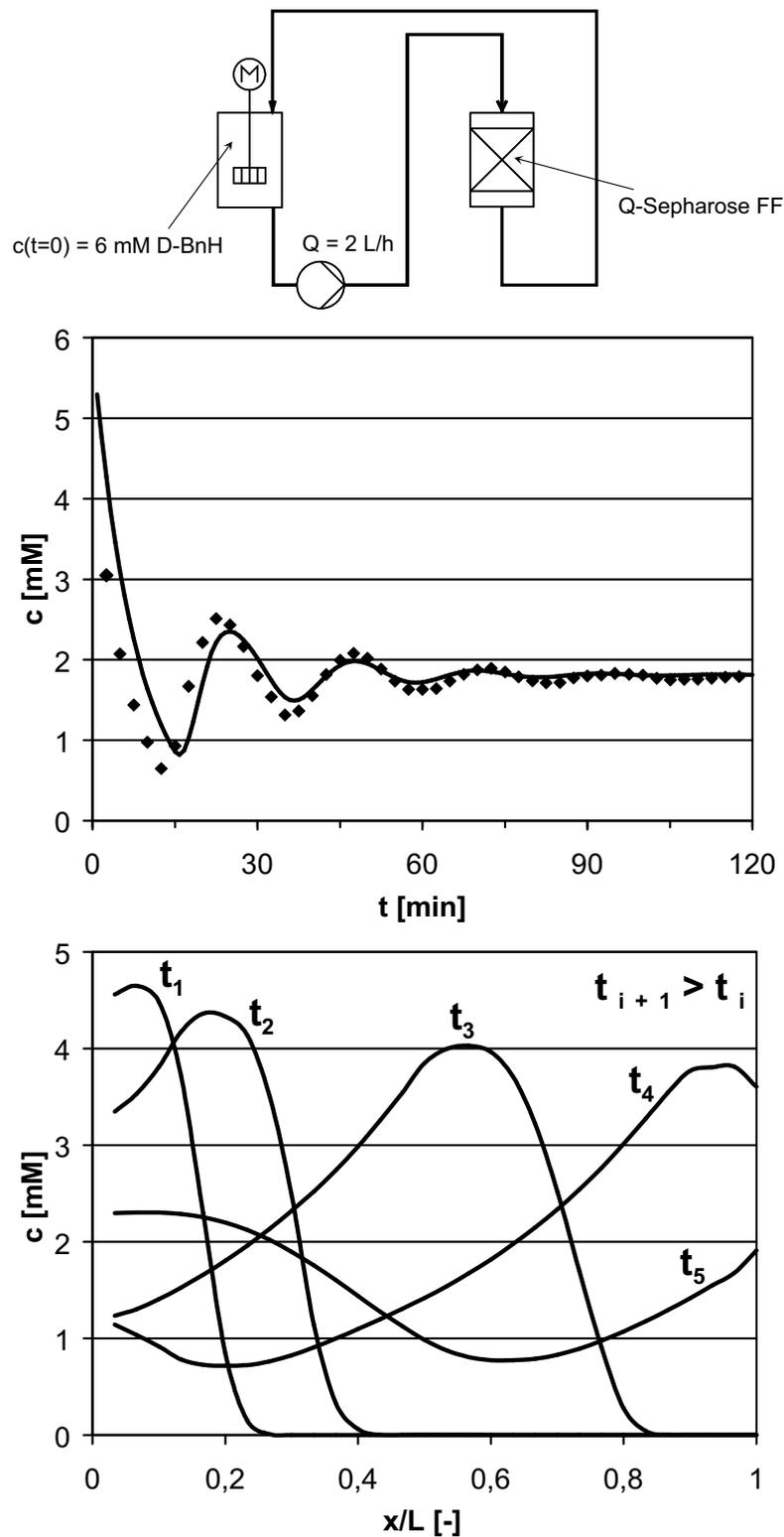


Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Gesamtkonzentration im Membranreaktor (oben) und Entwicklung des örtlichen Konzentrationsprofils in der Bulk-Phase des Selbstbau-Festbettreaktors für die ersten 30 min (unten) bei der Ionenaustauscher-katalysierten Racemisierung von 6 mM D-Benzylhydantoin, $\tau = 3,7$ min. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

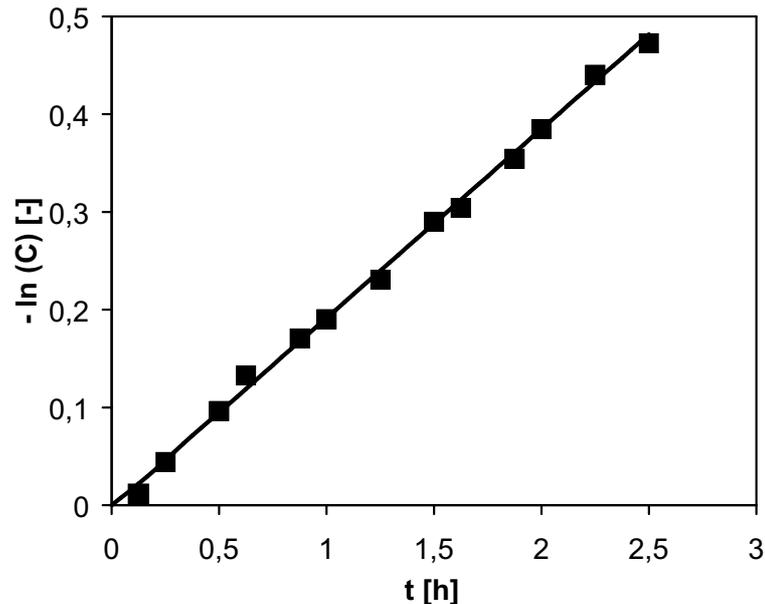


Abbildung 44: Auftragung des negativen Logarithmus der normierten Konzentrationen $C = \frac{\alpha_{obs}}{\alpha_{obs}^0}$ (Gl. 66 mit experimentellen Daten) und $C = \frac{c_{L-BnH} - c_{L-BnH}^{eq}}{c_{L-BnH}^0 - c_{L-BnH}^{eq}}$ (Gl. 65 mit simulierten Daten) gegenüber der Zeit für die Ionenaustauscher-katalysierte Racemisierung von 6 mM D-Benzylhydantoin im Selbstbau-Festbettreaktor. Die experimentellen Daten dienen zur Identifizierung der Racemisierungskonstante k'_{Rac} . Versuchsaufbau wie in Abb. 43, Reaktionsbedingungen: $Q = 2$ L/h, 37 °C, $0,2$ M Tris-HCL-Puffer, pH 8,5.

strom. Die simulierten effektiven Reaktionsraten waren dabei nahezu konstant (Tab. 18), wiesen aber erwartungsgemäß einen Trend hin zu beschleunigter Racemisierung für abnehmende Verweilzeiten auf. Experimentell konnten diese geringfügigen Änderungen, die maximal 1,3 % betragen, nicht bestätigt werden, da die Messwerte zu stark streuten.

Trotz identischer Apparate war im folgenden Abschnitt 6.1.2 für alle Simulationen der verschalteten Systeme eine Anhebung der Racemisierungskonstante k_{Rac} von $1,4 \cdot 10^{-4}$ auf $2,6 \cdot 10^{-4}$ $\text{cm}^3/(\text{g s})$ erforderlich, um die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu verbessern.

6.1.2 Verschaltete Apparate

6.1.2.1 Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher

Basierend auf der vorangehend beschriebenen Maßstabsvergrößerung wurden sämtliche Apparatemodule der Versuchsanlage zum Gesamtprozess verschaltet sowie die mathematischen Teilmodelle miteinander gekoppelt. Der experimentelle Aufbau umfasste wie in Abschnitt 2.2 dargestellt

- den Festbettreaktor FB1 mit ca. 25 g bzw. 18 g immobilisierter Hydantoinase und Carbamoylase (Betthöhe $L = 2 \dots 3$ cm),

- den Festbettreaktor FB2 mit ca. 325 g Q-Sepharose FF (Betthöhe $L = 22$ cm)
- und den als Vorlagebehälter für Substrat genutzten Membranreaktor MR mit 250 bzw. 300 ml Reaktionsvolumen.

In einem geschlossenen Kreislauf zirkulierte die Reaktionslösung mit konstantem Volumenstrom ($Q = 2$ L/h) unter Standard-Reaktionsbedingungen (37 °C, $0,2$ M Tris-HCL-Puffer, pH 8,5) durch die hintereinander geschalteten Festbettreaktoren und den Membranreaktor. Online aufgezeichnet wurden die Signale der pH-Sonden, des Thermometers, des Durchflussmeßgerätes und von Polarimeter sowie Photometer zur Bestimmung des Reaktionsfortschritts. Die Analyse der Reaktionslösung bezüglich ihrer Zusammensetzung erfolgte offline mittels chiral-HPLC.

Eine grundsätzliche Unterscheidung der Betriebsweisen bestand hinsichtlich der Substratzugabe. Zunächst wurde gelöstes Benzylhydantoin im Membranreaktor vorgelegt. Alternativ hierzu behandelt Abschnitt 6.1.2.2 den für die verfahrenstechnische Praxis interessanteren Einsatz von festem Benzylhydantoin, das sich während der Reaktion kontinuierlich nachlöst.

Als für die Dynamik der Umsetzung entscheidend stellte sich die Konditionierung der Q-Sepharose FF im Festbettreaktor FB2 heraus. Wurde diese vor Versuchsbeginn mit Puffer äquilibriert, so beeinflussten die im Abschnitt 6.1.1.4 beschriebenen Adsorptions- und Desorptionsvorgänge die Reaktion deutlich (Abb. 45, oberes Bild). Insbesondere beim Benzylhydantoin ist die Überlagerung des Konzentrationsverlaufs, wie er aus der Reaktionskinetik resultiert, mit einer gedämpften Schwingung gut zu erkennen. Ursache ist die im Vergleich mit der im gesamten System befindlichen Stoffmenge große Speicherfähigkeit der Q-Sepharose FF für Benzylhydantoin. Die auf Adsorption beruhende Wirkung der Q-Sepharose FF als Speicherelement im dynamischen Geschehen des Reaktionssystems wird ferner durch die geringe Gesamtkonzentration aller gelösten Reaktanten im stationären Zustand verdeutlicht, welche unter Berücksichtigung von Verdünnungseffekten mit $2,4$ mM lediglich 74 % der Anfangskonzentration erreichte (die Anfangskonzentration von 8 mM D,L-Benzylhydantoin im Membranreaktor verdünnte sich unter inerten Bedingungen mit der Pufferlösung in den Festbettreaktoren auf $3,2$ mM).

Im Gegensatz dazu traten nach Konditionierung der Q-Sepharose FF mit Benzylhydantoinlösung (Abb. 45, unteres Bild) so gut wie keine Schwingungen in den Konzentrationsverläufen auf, da sich in diesem Fall vor dem Start der Reaktion beinahe das gesamte System bezüglich der Adsorption im thermodynamischen Gleichgewicht befand. Geringfügige Schwingungen während der ersten halben Stunde wurden durch Einstellung eines neuen Adsorptionsgleichgewichts am Ionenaustauscher verursacht.

Infolge der Äquilibrierung mit Benzylhydantoinlösung war die gesamte Stoffmenge im System erhöht, und die notwendige Reaktionszeit bis zum Erreichen des Vollumsatzes verdoppelte sich auf zirka sechs Stunden. Ein Blick auf die maximale Konzentration an synthetisiertem L-Phenylalanin erlaubte eine erste Bewertung des technischen Nutzens der Racemisierung: Während in einem System ohne Racemisierung bei Vorlage von $7,5$ mM D,L-Benzylhydantoinlösung (das entspricht

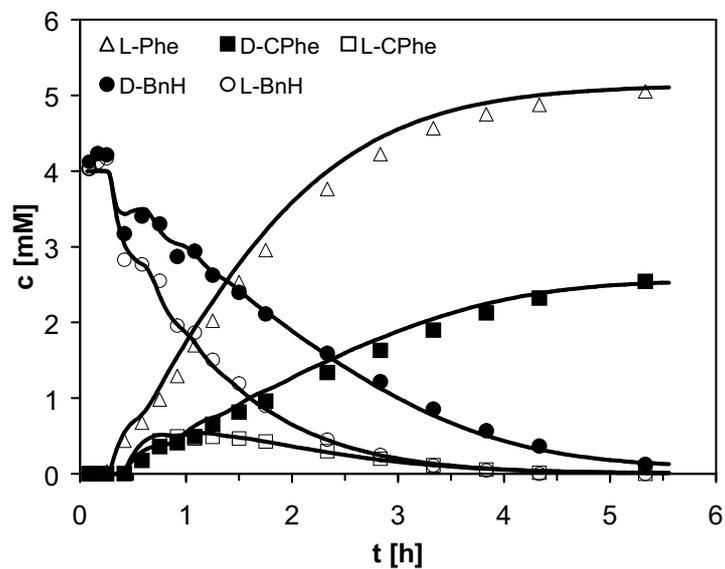
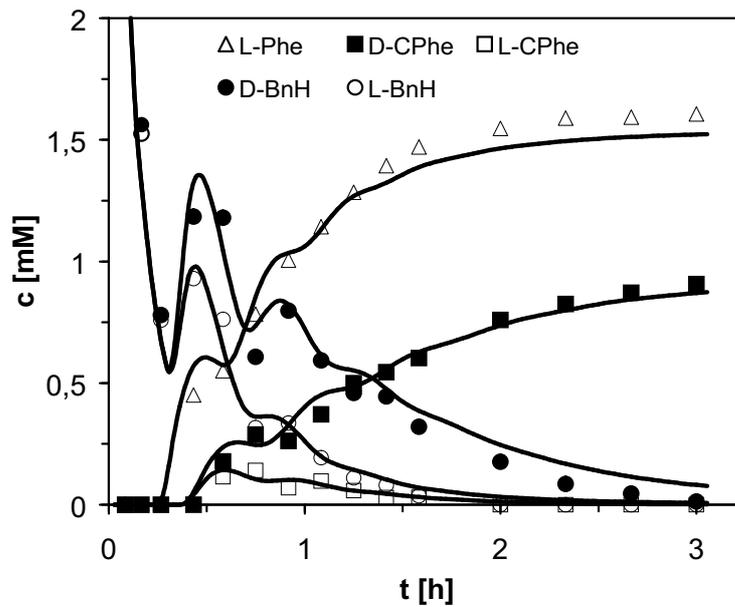
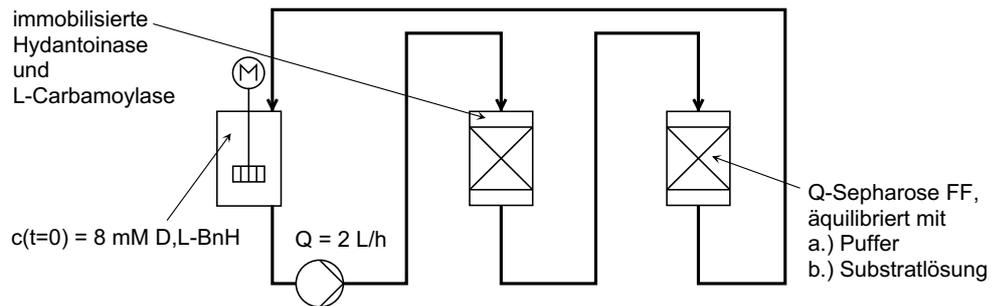


Abbildung 45: Zeitliche Konzentrationsverläufe im Membranreaktor bei der absatzweisen Umsetzung von 8 mM D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher. Der Ionenaustauscher wurde vor Versuchsbeginn jeweils mit Tris-HCl-Puffer (obere Abb.) bzw. Substratlösung (untere Abb.) äquilibriert. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

einer Anfangskonzentration von 8 mM im Membranreaktor einschließlich Verdünnung durch Reaktionspuffer in den Schläuchen und Pumpen der Versuchsanlage sowie Einstellung eines neuen Adsorptionsgleichgewichts am Ionenaustauscher) höchstens 3,75 mM L-Phenylalanin als Produkt zu erwarten waren, konnte diese Grenze durch die Umleitung von D-Benzylhydantoin in die L-Phenylalanin Synthese um 35 % überschritten werden. Dieser Zuwachs hing direkt von der Racemisierungsgeschwindigkeit beziehungsweise von der Masse an Q-Sepharose FF ab. Mit einem kleineren Festbettreaktor FB2, der 6 % des eingangs genannten Bettvolumens aufwies und daher ca. 20 g Q-Sepharose FF beinhaltete, lag die L-Phenylalaninkonzentration aber immer noch 13 % über dem Maximalwert für eine System ohne Racemisierung. Damit wird deutlich, dass die Steigerung der Ausbeute eine überproportionale Erhöhung der Ionenaustauschermasse erfordert. Weiteres zu diesem Befund einschließlich Simulationsstudien findet sich im Abschnitt 7.1.

Der Versuchsanlage entsprechend wurden für das mathematische Prozessmodell die nachfolgend angeführten Teilsysteme sowie die in den zugeordneten Abschnitten identifizierten Modellparameter zusammengeführt.

- Enzymkinetik: 5.1.3.3, 5.2.2.1, 4.4, 6.1.1.3
- Racemisierungskinetik: 6.1.1.4
- Adsorption: 5.6.2, 6.1.1.4
- Dispersion im Festbettreaktor: 5.7.2
- Parameter der Festbett-Schüttungen: 5.6.1

Die Simulationsergebnisse auf Grundlage dieses erweiterten Prozessmodells sind ebenfalls in Abb. 45 dargestellt und stimmen gut mit den experimentellen Daten überein. Beide Simulationen beruhen auf identischen Modellparametern, unterschieden sich einzig in der Maximalrate v_{max}^{Ca} , um der Inaktivierung der L-Carbamoylase gemäß Abschnitt 6.1.1.3 Rechnung zu tragen. Mit Ausnahme der im Abschnitt 6.1.1.4 erläuterten Einschränkungen hinsichtlich der Gültigkeit des kinetischen Modells der Racemisierung erwies sich der schrittweise Aufbau des Gesamtmodells aus einzelnen Teilmodellen als praktikable Methode.

6.1.2.2 Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher und Nachlösung des Substrats

Der im Abschnitt 6.1.2.1 beschriebene Versuchsaufbau blieb für den letzten Schritt zur Validierung des dynamischen Anlagenmodells bezüglich Anzahl, Art und Verschaltung der Apparate unverändert, jedoch wurde nunmehr das Substrat in fester Form eingesetzt. Diese vereinfachte Verfahrensvariante war von praktischem Interesse, da die separate Auflösung des Benzylhydantoin vor der Umsetzung entfiel und durch kontinuierliche Substratnachlösung während der Reaktion ersetzt wurde.

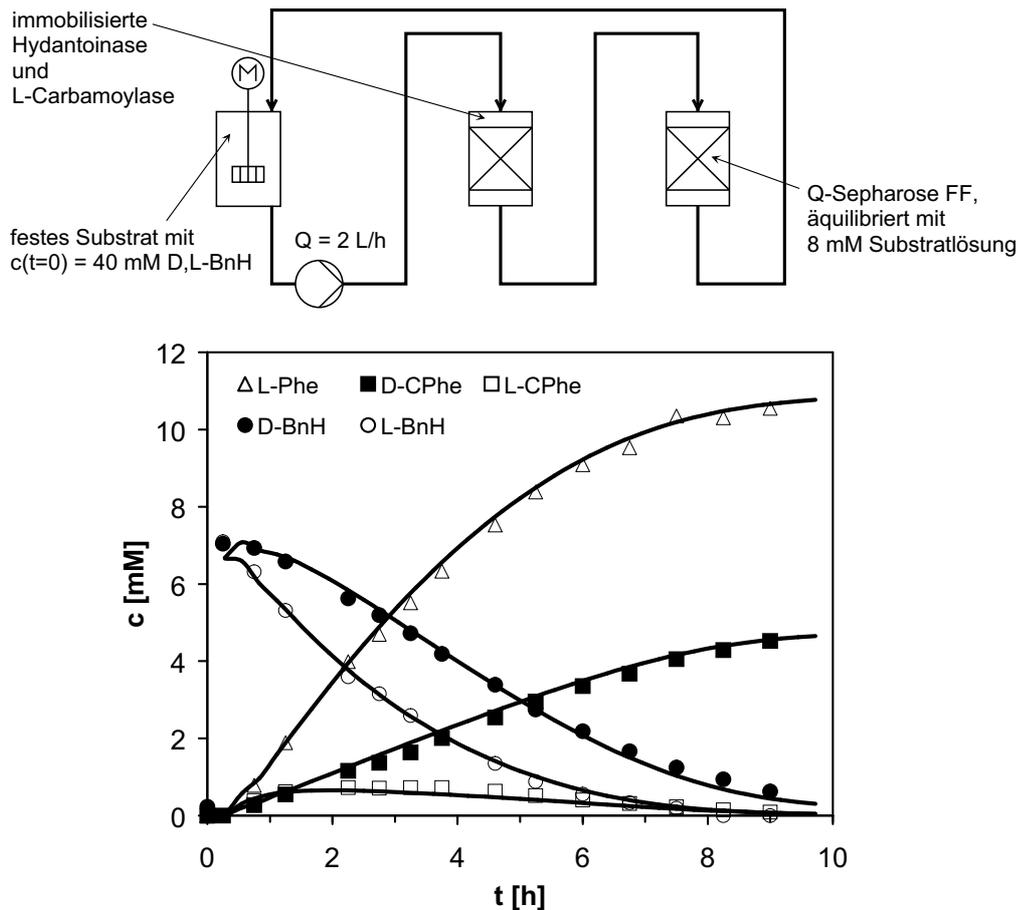


Abbildung 46: Zeitliche Konzentrationsverläufe im Membranreaktor bei der absatzweisen Umsetzung von ungelöstem D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher. Der Ionenaustauscher wurde vor Versuchsbeginn mit 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung äquilibriert. Vergleich von experimentellen Daten und Modellsimulationen.

Das Verfahren startete mit dem Einbringen von ca. 1,9 g festem D,L Benzylhydantoin in den Membranreaktor MR (Abb. 2, S. 26), was bezogen auf 250 mL Reaktionsvolumen einer Konzentration von 40 mM und somit etwa der fünffachen Löslichkeit (Tab. 8, S. 49) entspricht. Vor Versuchsbeginn wurde die Q-Sepharose FF im Festbettreaktor FB2 zur Vermeidung schwingender Konzentrationsverläufe (Abschnitt 6.1.2.1) mit 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung äquilibriert.

Abb. 46 zeigt als wichtigstes Ergebnis, dass die Verzögerungszeit bis zum Ansteigen der Produktkonzentration mit ca. 30 min nicht größer war als bei Verwendung von gelöstem Substrat (Abb. 45). Somit erwies sich die Nachlösung als schnell im Vergleich zur Reaktion und stellte keine Limitierung des Gesamtprozesses dar. Bestätigt wurde dieser experimentelle Befund durch das mathematische Modell, denn bei der Simulation erreichte die Gesamtkonzentration aller gelösten Spezies bereits innerhalb der ersten halben Stunde 93 % des Endwertes.

Der experimentell erreichte Endwert betrug 15,8 mM und war um 3,2 mM geringer als die einzig unter Berücksichtigung von Verdünnungseffekten berechnete Gesamtkonzentration (Verdünnung mit 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung aus FB2), da sich im Verlauf der Reaktion infolge der höheren Substratkonzentration ein neues Adsorptionsgleichgewicht an der mit 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung äquilibrierten Q-Sepharose FF einstellte. Wie schon beim Einsatz des gelösten Substrats ermöglichte die Racemisierung eine verstärkte Produktbildung, so dass die maximale Konzentration an L-Phenylalanin mit 10,8 mM den Vergleichswert für eine Prozessführung ohne Racemisierung um 36 % übertraf. Ein signifikanter Einfluß der Art der Substratzugabe – gelöstes oder festes Benzylhydantoin – auf die Produktausbeute war erwartungsgemäß nicht festzustellen.

Zur Simulation der kontinuierlichen Nachlösung festen Substrats im Membranreaktor war eine Erweiterung des mathematischen Prozessmodells um den im Abschnitt 5.5 vorgestellten kinetischen Ansatz erforderlich, der die Auflösung von festem Benzylhydantoin beschreibt. Jedoch wurde die Löslichkeit c^* des L- bzw. D-Benzylhydantoin auf 8 mM angehoben, was dem von T. Waniek (Abschnitt 4.6, S. 49) gefundenen Wert für übersättigte Lösungen entsprach. Diese Korrektur resultierte aus den praktischen Erfahrungen mit der Versuchsanlage, denn unvermutet konnten übersättigte Benzylhydantoinlösungen im gerührten Membranreaktor einfacher angesetzt werden, als es bei Verwendung eines im Labor üblichen Ultraschallbades [93] möglich war.

Alle weiteren Modellkomponenten stimmten mit denen des Abschnitts 6.1.2.1 überein.

6.2 Prozessmodifikation: ungepuffertes System einschließlich Produktaufarbeitung

Die nachgeschaltete Aufreinigung des Produkts L-Phenylalanin erfolgte durch Elektrodialyse und wurde in Kooperation mit dem Institut für Chemische Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart von F. Sarfert [73, 74] entwickelt.

Das Grundprinzip der elektrodialytischen Aufreinigung beruhte auf der Abtrennung des bei pH 6 negativ geladenen Carbamoylphenylalanins von den ungeladenen Spezies Phenylalanin und Benzylhydantoin im elektrischen Feld. Voraussetzung für eine effektive Aufreinigung war dabei die möglichst vollständige Abwesenheit anderer ionischer Verbindungen. Für die enzymatische Synthese des L-Phenylalanins bedeutete dies den Verzicht auf Pufferung des pH-Wertes mittels Tris-HCl-Puffer. Statt dessen wurde im Reaktionssystem durch Titration mit 2 M NaOH-Lösung ein konstanter pH-Wert eingestellt. Da die Nutzung der Elektrodialyse zur Produktaufarbeitung hauptsächlich den Nachweis erforderte, dass die Produktsynthese auch in einem pufferfreien System erfolgen kann, wurden die Versuche des folgenden Abschnitts nicht durch Simulationen ergänzt, um den hohen Aufwand der Modellanpassung einzusparen. Bezüglich der Modellierung der Elektrodialyse sei auf die Arbeit von F. Sarfert [74] verwiesen.

6.2.1 Erster Schritt: Reaktion

Die Synthese und anschließende Aufreinigung von L-Phenylalanin erfolgten in zwei getrennten Schritten. Zuerst wurden mit der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Versuchsanlage 5,7 g festes D,L-Benzylhydantoin umgesetzt. Die Betriebsparameter stimmten mit denen des Abschnitts 6.1.2.1 (S. 106) überein. Jedoch erfolgte die Kontrolle des pH-Werts der pufferfreien Reaktionslösung durch Titration mit 2 M NaOH-Lösung, deren Verbrauch mittels Wägung erfaßt wurde.

Nach Beendigung der Umsetzung wurde das Produkt L-Phenylalanin aus der Reaktionslösung abgetrennt, wozu ein eigenständiger Versuchsaufbau mit Elektrodialysemodul diente (Abschnitt 6.2.2).

Abweichend von den bisher untersuchten Prozessvarianten war es beim Einsatz der ungepufferten Reaktionslösung nicht möglich, den Ionenaustauscher vorab zu äquilibrieren, da mit wässriger Benzylhydantoinlösung der pH-Wert im Ablauf des Festbettreaktors nicht fixiert werden konnte. Deshalb wurde vor Versuchsbeginn die Q-Sepharose FF im Festbettreaktor lediglich gespült und das Äquilibrieren erfolgte während der Umsetzung.

Wie Abb. 47 zeigt, bildete sich in den ersten 1,8 h nach Zugabe von 1,9 g festem D,L-Benzylhydantoin lediglich eine geringe Menge des Produkts L-Phenylalanin, wohingegen die Substratkonzentration infolge der Ausgleichvorgänge am Ionenaustauscher rapide abnahm. Gleichzeitig stieg der pH-Wert rasch an und vollzog nach ca. 45 min schnelle Schwingungen mit $\pm 0,25$ pH-Einheiten um den Mittelwert pH 8,4 (Abb. 48). Zur Korrektur der pH-Messung bei 37 °C war dem Regler ein Sollwert von pH 8,25 vorgegeben, welcher pH 8,5 bei Raumtemperatur entsprach. In dieser Phase der Herausbildung eines Gleichgewichts am Ionenaustauscher registrierte die Waage der Laugenvorlage einen kontinuierlichen Verbrauch von insgesamt ca. 4,5 g an 2 M NaOH-Lösung.

Nach 1,8 h Reaktionszeit wurde die Substratkonzentration durch erneute Zugabe von 1,9 g festem D,L-Benzylhydantoin aufgestockt. Für weitere 30 min löste der Regler die Zudosierung von ca. 2,5 g NaOH-Lösung aus, was die mit der Auflösung von D,L-Benzylhydantoin verbundene Erhöhung des pH-Wertes zusätzlich verstärkte. Infolge dieses Reglerverhaltens stellte sich nach insgesamt 3,4 h ein Überschwinger mit einem Maximum von pH 8,7 ein, welcher im Verlauf der Reaktion ohne weitere Eingriffe des Reglers ausgeglichen wurde. Ab der fünften Stunde betrug der Mittelwert pH 8,35 und lag damit bei einer Schwingungsbreite von $\pm 0,15$ pH-Einheiten lediglich um 0,1 pH-Einheiten über dem Sollwert. Dieses für die praktische Anwendung im technischen Maßstab wichtige Ergebnis verdeutlicht, dass eine unproblematische Handhabung des Systems auch bei Verwendung ungepufferter Reaktionslösungen möglich ist.

Die im Membranreaktor sowie im Ablauf des Festbettreaktors FB1 gemessenen pH-Werte stimmten gut miteinander überein (Abb. 48), da die differentielle Betriebsweise des Enzymfestbettreaktors zu geringem Substratumsatz und damit auch zu geringen Änderungen des pH-Werts bei einmaliger Passage der Reaktionslösung durch die Festbettschüttung führte. Ferner ist in Abb. 48 zu erkennen, dass die mittlere Temperatur bei Schwankungen von $\pm 1,7$ °C um 1 °C unter ihrem

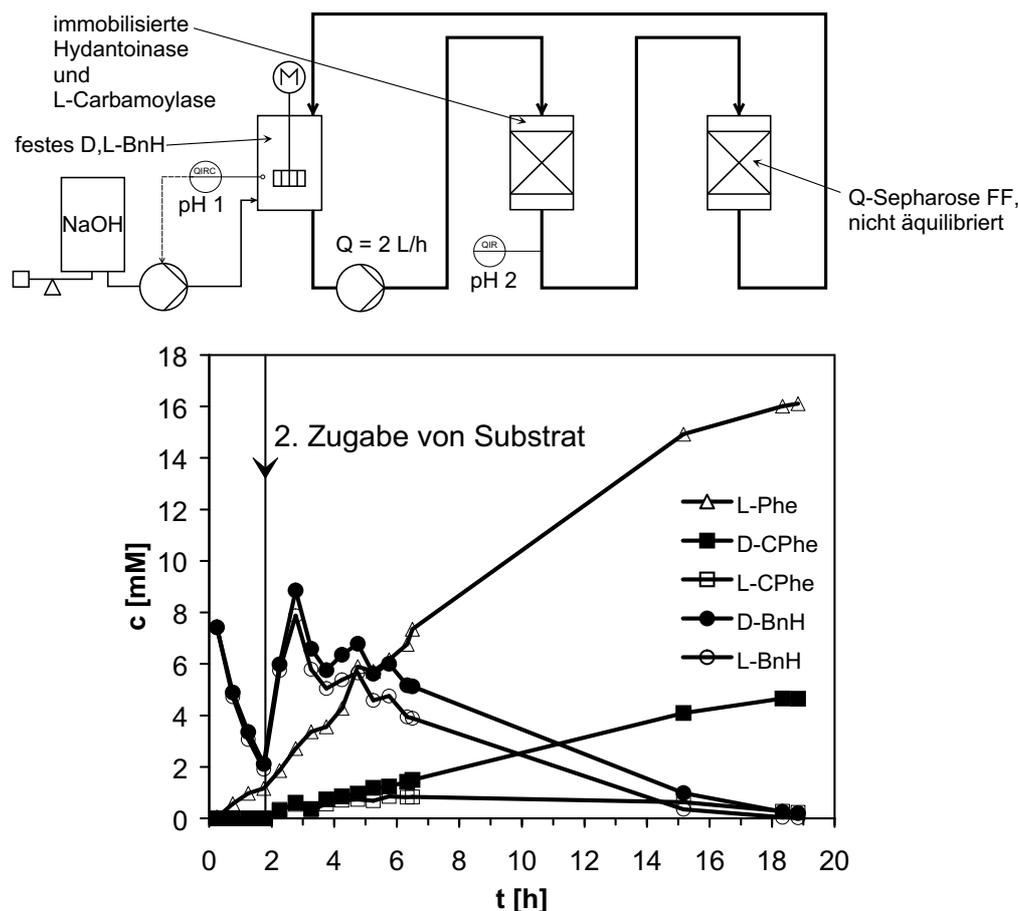


Abbildung 47: Zeitliche Konzentrationsverläufe im Membranreaktor bei der absatzweisen Umsetzung von ungelöstem D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher. Das Reaktionssystem war pufferfrei und wurde durch Titration mit NaOH auf einen konstanten pH-Wert eingestellt (vgl. Abb. 48). Der Ionenaustauscher wurde vor Versuchsbeginn nicht äquilibriert. Dargestellt sind experimentelle Daten.

Sollwert von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ blieb und der mittlere Volumenstrom mit $Q = 1,92 \text{ L/h}$ etwa 96 % des vorgegebenen Wertes erreichte.

Bis zur vollständigen Umsetzung des Substrats, dessen Konzentrationsverlauf stärker gedämpfte Schwingungen als bei den vorherigen Versuchen aufwies, vergingen nach der zweiten Zugabe etwa 16 h, und die Produktkonzentration lag am Ende der Reaktion mit 16 mM um 50 % über dem ohne Racemisierung maximal erreichbaren Wert. Hierbei begünstigte das pufferfreie System die Racemisierung des nicht umgesetzten Substratenantiomers, was mit einer größeren Anzahl freier Bindungsstellen am Ionenaustauscher erklärt werden kann (Abschnitt 5.4.2).

Abschließend wurde die eingesetzte Substratmenge nach 20 h Reaktionszeit zum zweiten Mal um 1,9 g D,L-Benzylhydantoin auf nunmehr insgesamt 5,7 g erhöht. Es resultierte ein unterpropor-

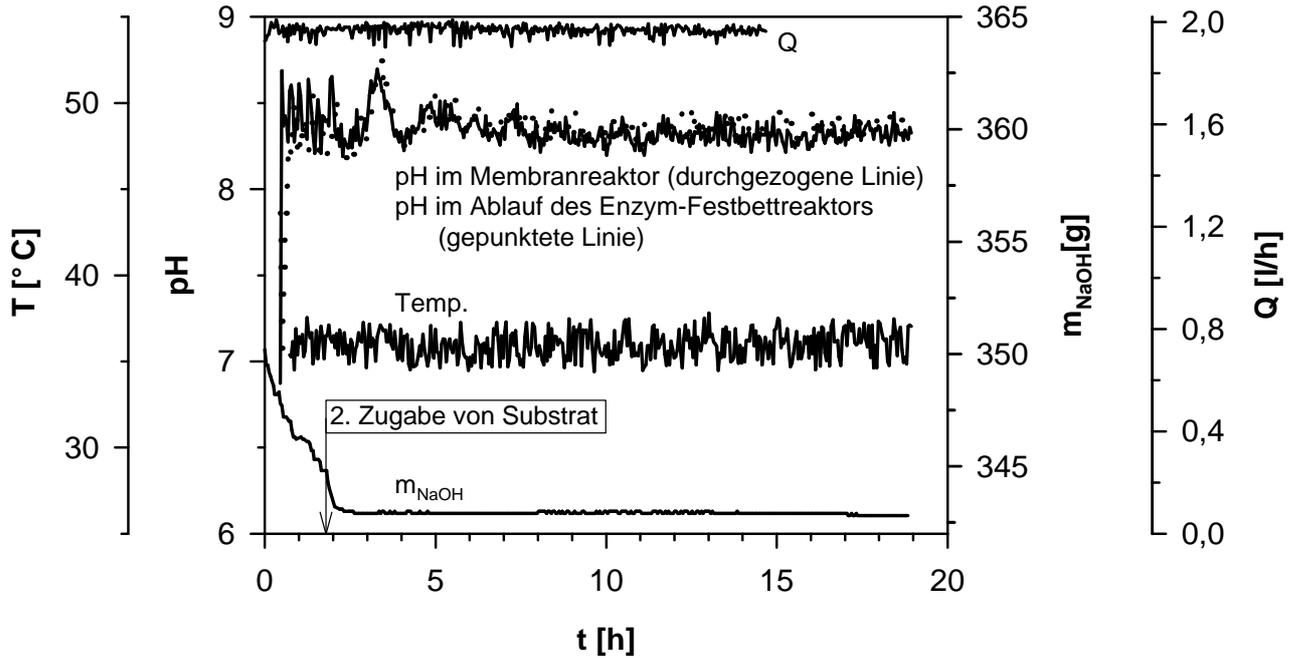


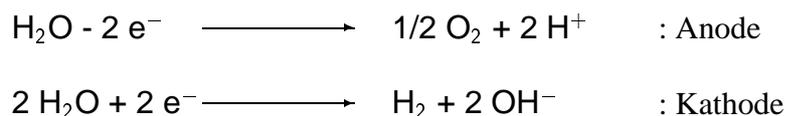
Abbildung 48: Online Messwerte bei der absatzweisen Umsetzung von ungelöstem D,L-Benzylhydantoin (vgl. Abb. 47). Dargestellt sind die pH-Werte im Membranreaktor (pH 1) und im Ablauf des Enzym-Festbettreaktors (pH 2) sowie die Masse m_{NaOH} des NaOH-Vorlagebehälters, die Temperatur T im Temperierbad und der Volumenstrom Q durch die Festbettreaktoren.

tionaler Anstieg der Phenylalanin-Endkonzentration auf 22 mM, die jedoch ebenfalls die ohne Racemisierung erreichbare Maximalkonzentration um 50 % übertraf.

Bis zur Aufarbeitung mittels Elektrodialyse wurde die aus dem Membranreaktor abgepumpt Reaktionslösung, deren Leitfähigkeit $\kappa = 4,46 \text{ mS/cm}$ betrug (Referenztemperatur: $20 \text{ }^\circ\text{C}$), einige Tage bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlraum gelagert.

6.2.2 Zweiter Schritt: Produktabtrennung mittels Elektrodialyse

Die Elektrodialyse ist ein Trennverfahren, bei dem mit Hilfe ionensektiver Membranen geladene Teilchen durch Wanderung im elektrischen Feld aus einer Lösung entfernt werden. Abwechselnd zwischen zwei Elektroden angeordnete Ionenaustauschermembranen mit selektiver Durchlässigkeit für negativ geladene Teilchen (Anionen) bzw. positiv geladene Teilchen (Kationen) unterteilen ein Elektrodialysemodul in mehrere Kammern, so dass jede Kammer in Transportrichtung von einer Anionenaustauschermembran und einer Kationenaustauschermembran begrenzt ist. Im absatzweisen Betrieb werden die aufzureinigende Lösung (Diluat), welche geladene und ungeladene Komponenten enthält, sowie eine Auffanglösung (Konzentrat) kontinuierlich durch die Kammern gepumpt und zurückgeführt. Aufgrund paralleler Verteilung der beiden Lösungen im Zulauf des

**Abbildung 49:** Elektrodenreaktionen

Elektrodialysemoduls sind je zwei benachbarte Kammern mit dem Diluat- bzw. Konzentratkreislauf verbunden. Die Anionen und Kationen wandern infolge des elektrischen Potentialgefälles aus dem Diluat durch die begrenzenden Membranen in Richtung Anode bzw. Kathode und erreichen so die unmittelbar benachbarten Kammern mit Konzentrat, in denen sie von den nun folgenden Kationen- bzw. Anionenaustauschermembranen zurückgehalten werden und daher nicht erneut in eine Kammer mit Diluat gelangen. Aus der Ionenverarmung bzw. Ionenanreicherung in den abwechselnden Kammern resultieren schließlich das deionisierte Diluat sowie die mit Ionen aufkonzentrierte Auffanglösung [89]. Abb. 50 illustriert das Prinzip der Elektrodialyse für die durchgeführte Trennung von neutralem Phenylalanin und negativ geladenem Carbamoylphenylalanin.

Um Einflüsse der elektrochemischen Zerlegung des Lösungsmittels Wasser an den Elektroden (Abb. 49) auf die eigentliche Trennung abzufangen, verfügt ein Elektrodialysemodul über einen dritten Kreislauf, die sogenannte Elektrodenspülung. Die Elektrodenreaktionen führen zu einem pH-Abfall in der Anodenkammer und einem pH-Anstieg in der Kathodenkammer. Weil jedoch beide Kammern durch die Elektrodenspülung miteinander verbunden sind, ergibt sich insgesamt eine Neutralisation.

Da nun das Grundprinzip der Elektrodialyse auf der Wanderung geladener Spezies im elektrischen Feld beruht, erfordert die Aufreinigung eines Gemisches zweier schwacher Elektrolyte einen pH-Wert, bei dem die eine Spezies neutral, die andere jedoch *vollständig* dissoziiert und somit geladen vorliegt.

Die Reaktionslösung aus Abschnitt 6.2.1 beinhaltet das Zielprodukt L-Phenylalanin sowie das unerwünschte Nebenprodukt D-Carbamoylphenylalanin, welche schwache Elektrolyte sind und wie in Abb. 51 dargestellt, pH-abhängig dissoziieren. Prinzipiell geeignete pH-Werte zur Trennung der beiden Komponenten sind offensichtlich pH 0 mit positiv geladenem Phenylalanin und neutralem Carbamoylphenylalanin, sowie pH 6 mit neutralem Phenylalanin und negativ geladenem Carbamoylphenylalanin. In dieser Arbeit wurde die Elektrodialyse bei pH 6 durchgeführt, um den mit einer Verschiebung auf pH 0 verbundenen Eintrag größerer Mengen an Salz zu vermeiden, welches aufgrund seiner ionischen Eigenschaften den Trennaufwand zusätzlich erhöht hätte. Für den Fall einer unvollständig abgelaufenen Reaktion bedeutete der gewählte pH-Wert, dass nicht umgesetzte Reste des bei pH 6 ebenfalls ungeladenen Substrats Benzylhydantoin (Abb. 51) als Verunreinigung in der Phenylalanin-Fraktion verblieben würden.

Der zur Aufreinigung der Phe/CPhe-Produktlösung von F. Sarfert [73] am Institut für Chemi-

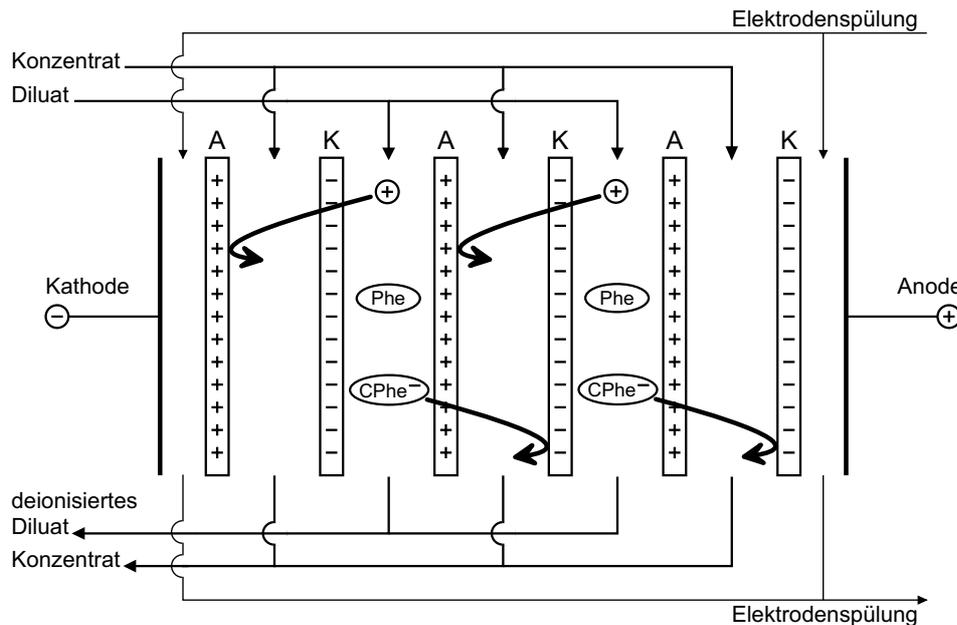


Abbildung 50: Prinzipielle Darstellung der Abtrennung von Carbamoylphenylalanin-Anionen und begleitenden Kationen mittels Elektrodialyse (A: Anionenaustauschermembran, K: Kationenaustauschermembran, Erklärung: s. Text).

sche Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart konzipierte experimentelle Aufbau ist in Abb. 52 skizziert. Das Elektrodialysemodul der Firma Berghof (Eningen) mit fünf Zellpaaren und jeweils 37 cm^2 Membranfläche wurde spannungskonstant betrieben und verfügte über drei geschlossene Kreisläufe, durch die eine Schlauchpumpe (505 U/RL, Watson-Marlow, Falmouth, England) Diluat, Konzentrat bzw. Elektroden-spüllösung mit einem Volumenstrom von jeweils 20 L/h förderte. Als Ionenaustauschermembranen kamen die Typen Neosepta AHA-2 (Anionenaustausch) und CMB (Kationenaustausch) der Tokuyama Corporation (Japan) zum Einsatz.

Zu Versuchsbeginn lagen 1 L Elektroden-spüllösung ($125 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$), 1 L Konzentrat (5 mM NaCl) und $0,3 \text{ L}$ Diluat vor, welches aus der mit Kochsalz ergänzten und auf $\text{pH } 6$ eingestellten Produktlösung des Abschnitts 6.2.1 hervorging (exemplarische Zusammensetzung: $23,4 \text{ mM}$ Phenylalanin; $6,3 \text{ mM}$ Carbamoylphenylalanin; 5 mM NaCl). Während der Elektrodialyse aufgetretene Abweichungen vom Sollwert $\text{pH } 6$ des Diluats korrigierte ein Regler durch Titration mit 100 mM NaOH -Lösung. Die am Netzteil des Elektrodialysemoduls eingestellte konstante Spannung betrug $U = 18 \text{ V}$ und korrespondierte mit einem anfänglichen Strom von $I = 100 \text{ mA}$.

Abb. 53 zeigt die Ergebnisse der mittels HPLC-Analytik ausgewerteten Proben aus Diluat- und Konzentratvorlage sowie den zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme gemessenen veränderlichen Strom I . Da die Volumina der verschiedenen Lösungen nicht identisch waren, sind keine Konzentrationen sondern Stoffmengen dargestellt.

Betrachtet man die geladene Komponente Carbamoylphenylalanin, so fällt auf, dass sich der aktive Transport nach ca. einstündiger Verzögerungszeit, in der ungefähr 10% der ursprünglich im Diluat

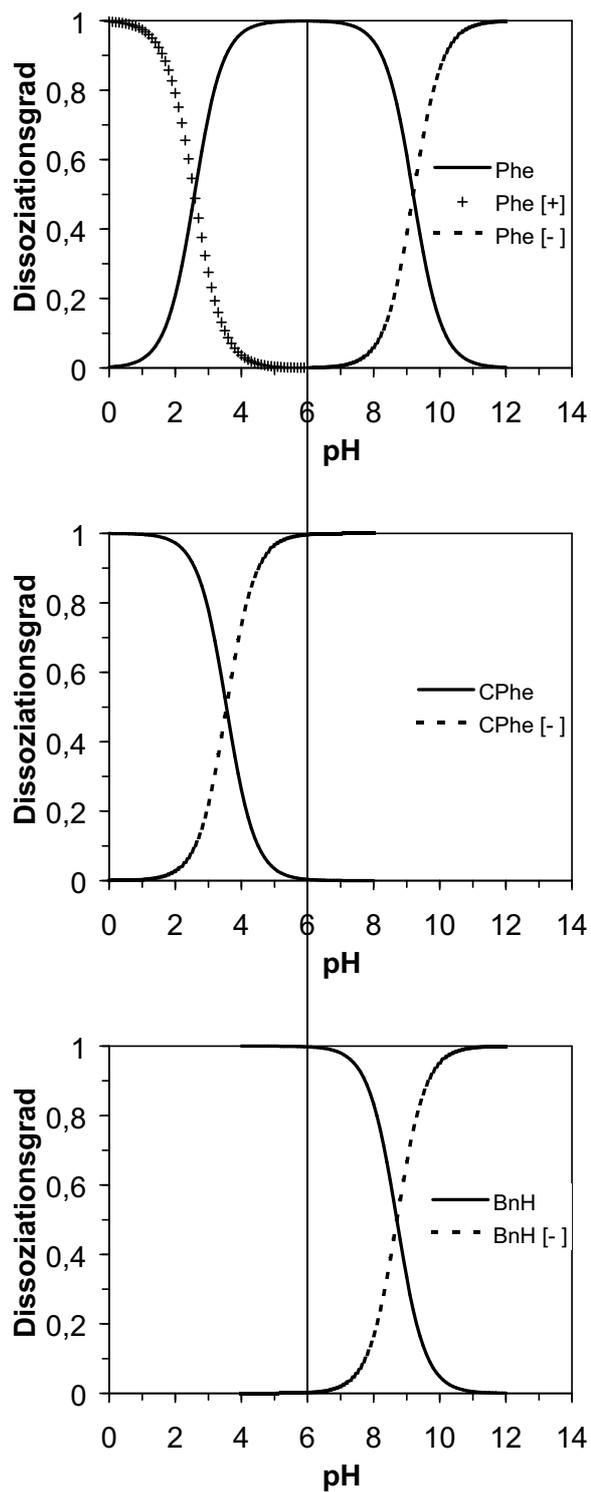


Abbildung 51: Dissoziationsgleichgewichte für Phenylalanin ($pK_{S1} = 2,6$; $pK_{S2} = 9,2$; $pI = 5,9$), Carbamoylphenylalanin ($pK_S = 3,6$) und Benzylhydantoin ($pK_S = 8,7$). pK_S -Werte gemäß F. Sarfert [73].

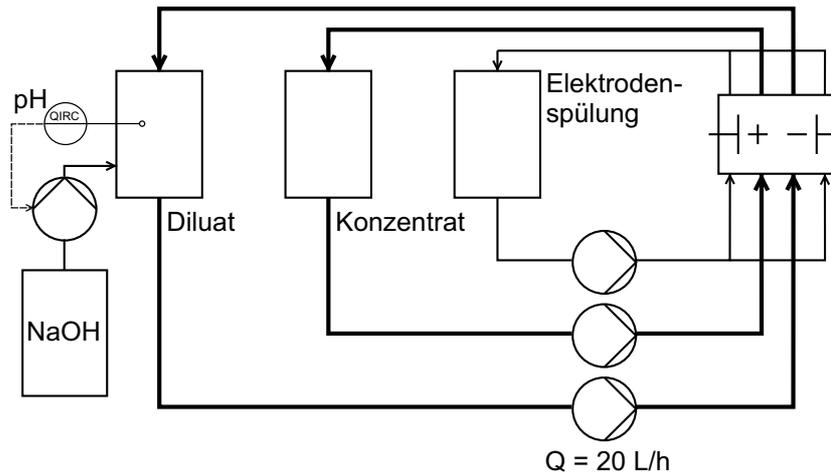


Abbildung 52: Versuchsanlage zur elektrodialytischen Aufreinigung der Phe/CPhe-Produktlösung im Diluat-Vorlagebehälter durch Abtrennung von CPhe-Ionen ($U = const. = 18 \text{ V}$).

vorhandenen Stoffmenge ins Konzentrat ausgeschleust wurde, stark beschleunigte, und infolgedessen bereits nach insgesamt vier Stunden nur noch Carbamoylphenylalanin-Spuren im Diluat nachweisbar waren. Entsprechend gegenläufig stellen sich in Abb. 53 die S-Kurven der beiden Carbamoylphenylalanin-Verläufe dar. Das ungeladene Phenylalanin verblieb größtenteils im Diluat, wobei allerdings während der vierstündigen Elektrodialyse ein stetiger Diffusionsstrom vom

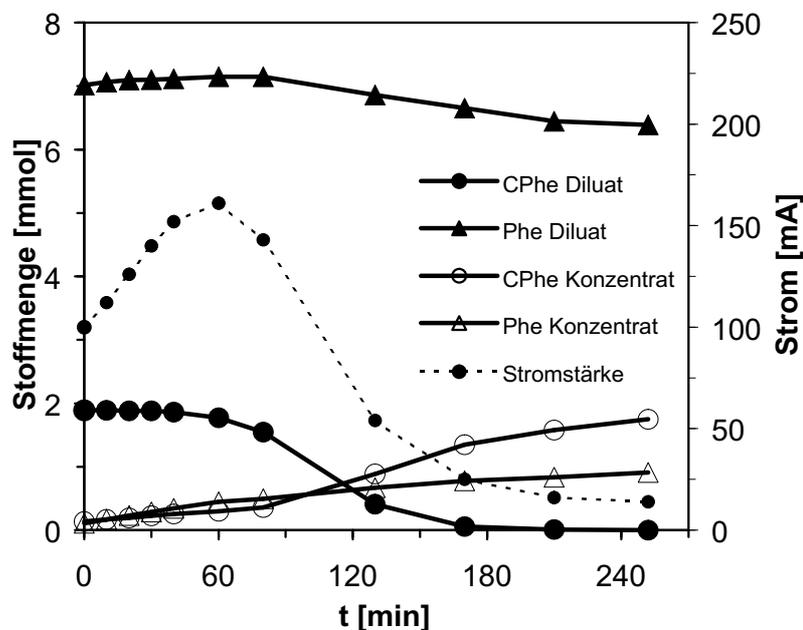


Abbildung 53: Stoffmengen im Diluat bzw. Konzentrat bei der Elektrodialyse der Phe/CPhe-Produktlösung. Zusätzlich ist der Verlauf der Stromstärke dargestellt ($U = const. = 18 \text{ V}$).

Diluat durch die Ionenaustauschermembranen zum Konzentrat für einen unerwünschten Verlust von ca. 13 % der eingesetzten Stoffmenge sorgte.

Die Fläche unter der Kurve der bei konstanter Spannung gemessenen Stromstärke I entspricht der transportierten Ladungsmenge. Somit wurden während der ersten Stunde in erheblichem Umfang Ionen transportiert, obwohl die Stoffmenge des negativ geladenen Carbamoylphenylalanins im Diluat nahezu unverändert blieb. Diesen Ladungstransport verursachte das NaCl, welches dem Diluat zur Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit zugesetzt worden war. Im weiteren Verlauf stimmte die Entwicklung der Stromstärke erwartungsgemäß mit der Abnahme der Stoffmenge an Carbamoylphenylalanin im Diluat qualitativ überein.

Optimierungsmöglichkeiten ohne Änderungen des Versuchsaufbaus bietet die am Elektrodialysem modul eingestellte Spannung. Wie von Tichy [89] für die Abtrennung von Methionin beschrieben, kann der Ladungstransport bei gleichzeitiger Verschlechterung des Wirkungsgrads durch Erhöhung der Spannung beschleunigt werden.

7 Simulationsstudien und Diskussion

Die im Abschnitt 6.1.2 vorgestellten mathematischen Modellen zur Beschreibung mehrerer Varianten der Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin in der Versuchsanlage wurden im weiteren für Simulationsstudien genutzt, um die optimale Racemisierungsgeschwindigkeit sowie den Einfluss der Anfangskonzentration an ungelöstem D,L-Benzylhydantoin zu bestimmen.

Außerdem erhielt das Teilmodell des Membranreaktors einen Substratzulauf und einen Ablauf, so dass eine neue Prozessvariante mit kontinuierlicher Betriebsweise untersucht werden konnte.

7.1 Optimierung der Racemisierungsgeschwindigkeit

Wird wie in dieser Arbeit eine lediglich L-selektive Hydantoinase eingesetzt, so geht beim Einsatz racemischen Substrats von der Racemisierungsgeschwindigkeit ein entscheidender Einfluss auf Umsatz U , Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P aus.

Anders sähe es im Idealfall einer L-spezifischen Hydantoinase aus, denn diese würde nur das Substrat L-Benzylhydantoin über das Zwischenprodukt L-Carbamoylphenylalanin zu L-Phenylalanin umsetzen. Da durch die Racemisierung auch D-Benzylhydantoin als Substrat für die L-Hydantoinase zugänglich würde, bestimmte die (langsame) Racemisierungsgeschwindigkeit somit die notwendige Reaktionszeit zur Umsetzung von sowohl L- als auch D-Benzylhydantoin, bliebe jedoch ohne Auswirkung auf U , Y und ee_P am Ende der Umsetzung nach Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts.

Ziel einer optimierten Reaktionsführung war die möglichst geringe Bildung des Nebenprodukts D-Carbamoylphenylalanin, was auch hinsichtlich der Produktaufreinigung mittels Elektrodialyse (Abschnitt 6.2.2) Vorteile bietet. Zwei Wege führen zu diesem Ziel. Der eine bedeutet eine Veränderung der reaktionskinetischen Konstanten durch Manipulation der Hydantoinase hin zu einem L-spezifischen Enzym (z. B. mit den Methoden der ‚directed evolution‘, die von O. May et al. [56] zur Invertierung der Enantioselektivität einer Hydantoinase angewendet wurden). Und der andere besteht in einer Absenkung der Konzentration des Substrats D-Benzylhydantoin durch beschleunigte Racemisierung. Infolge des Racemisierungsgleichgewichts mit $K_{eq}^{Rac} = 1$ begrenzt die Äquivalenz $c_{D-BnH}(t) = c_{L-BnH}(t)$ die minimal erreichbare D-Benzylhydantoinkonzentration.

Zur Untersuchung der beschleunigten Racemisierung erfolgten Simulationen mit verschiedenen Racemisierungskonstanten k_{Rac} (Definition von k_{Rac} gemäß Abschnitt 6.1.1.4). Grundlage für die Simulationen waren das Modell und die Parameter der im Abschnitt 6.1.2.1 behandelten Umsetzung von 8 mM D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher. Als Ausgangssituation zeigen die Konzentrationsverläufe in Abb. 45 (S. 108) aufgrund der L-Spezifität der Hydantoinase eine im Vergleich mit D-Benzylhydantoin raschere Umsetzung von L-Benzylhydantoin.

Durch schrittweise Steigerung von k_{Rac} um die Faktoren 3, 10 und 55 (Abb. 54) wurde das Ziel

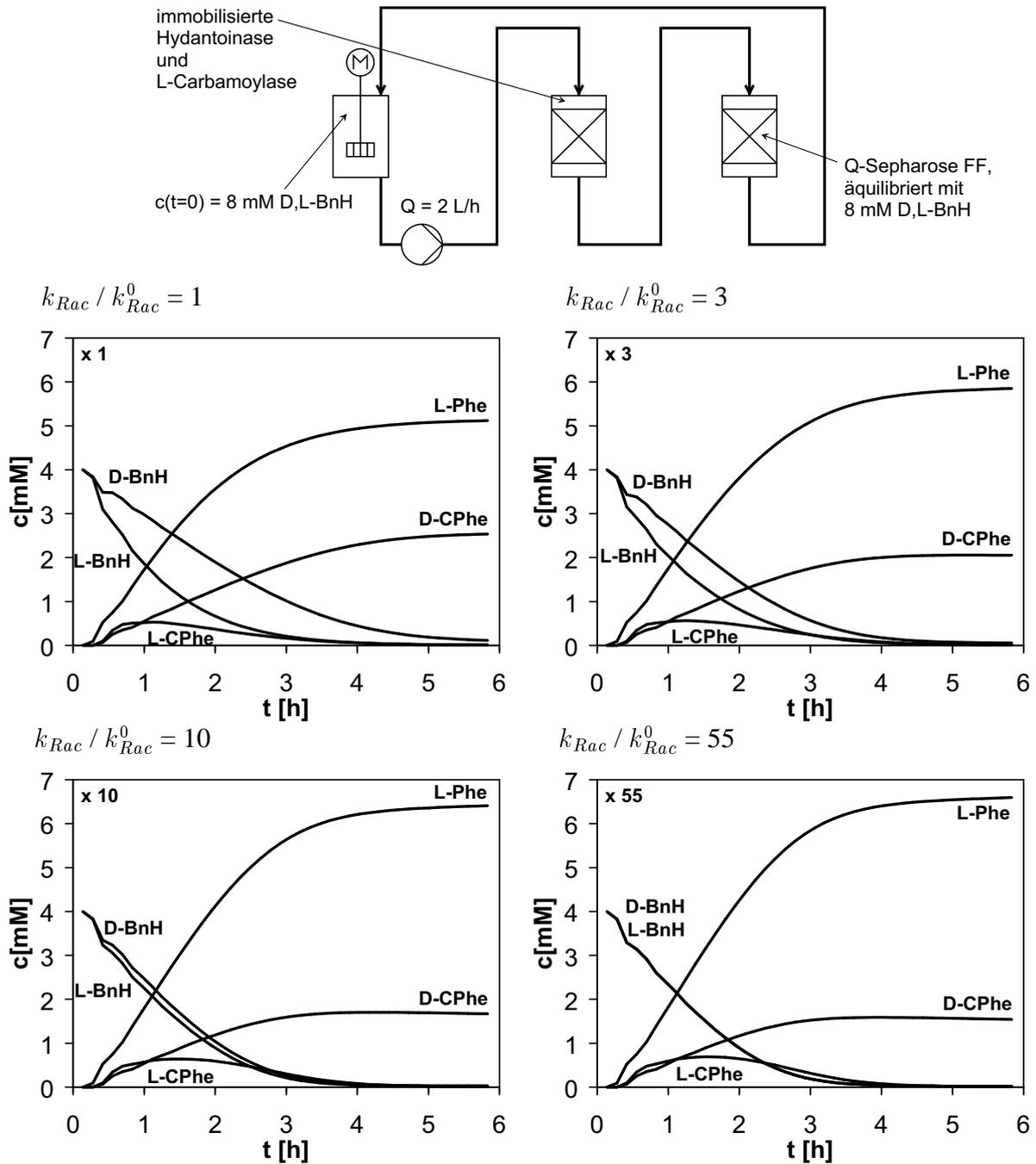


Abbildung 54: Simulation der absatzweisen Umsetzung von 8 mM D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher für verschiedene Racemisierungskonstanten k_{Rac} . Dargestellt sind die zeitlichen Konzentrationsverläufe im Membranreaktor.

erreicht, die Konzentrationsverläufe der beiden Enantiomere des Benzylhydantoin einander anzunähern und schließlich in Deckung zu bringen. Wie Abb. 54 verdeutlicht, hängt beim Einsatz L-selektiver Hydantoinase die Zusammensetzung der Reaktionslösung zum Zeitpunkt des nähe-

rungsweisen Stillstands der Umsetzung deutlich von der Racemisierungsgeschwindigkeit ab. Der Begriff ‚näherungsweise Stillstand‘ soll andeuten, dass sich die Gesamtreaktion noch nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, welches theoretisch nach vollständiger Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin zu L-Phenylalanin erreicht wäre. Jedoch liegen die Gleichgewichte der Hydantoinase-katalysierten Teilreaktionen so weit auf der jeweiligen Produktseite, dass in Experiment und Simulation quasi ein vorzeitiger Stillstand der Gesamtreaktion beobachtet wurde, dessen Zustand nicht mit dem thermodynamischen Gleichgewicht übereinstimmt.

Mit der angestrebten Reduzierung der D-Carbamoylphenylalaninkonzentration einher gingen eine Anhebung der Produktkonzentration und somit die Steigerung der Zielgrößen Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P , die zusammen mit dem Umsatz U gemäß Gl. 89, 90 bzw. 88 definiert sind.

$$U = \left(1 - \frac{c_{D-BnH} + c_{L-BnH}}{\sum c_{gelöst}^0} \right) 100 \% \quad (88)$$

$$Y = \frac{c_{L-Phe}}{\sum c_{gelöst}^0} 100 \% \quad (89)$$

$$ee_P = \frac{c_{L-Phe} - c_{D-CPhe}}{c_{L-Phe} + c_{D-CPhe}} 100 \% \quad (90)$$

Zu beachten ist, dass nur die für eine technische Anwendung interessanten gelösten Reaktanten berücksichtigt wurden, da z. B. das während der Reaktion am Ionenaustauscher adsorbierte Produkt nicht ohne aufwendige Verfahrensschritte wie eine nachgeschaltete Elution der Säule zugänglich war. Abweichend von der üblichen Definition flossen in die Berechnung des Enantio-

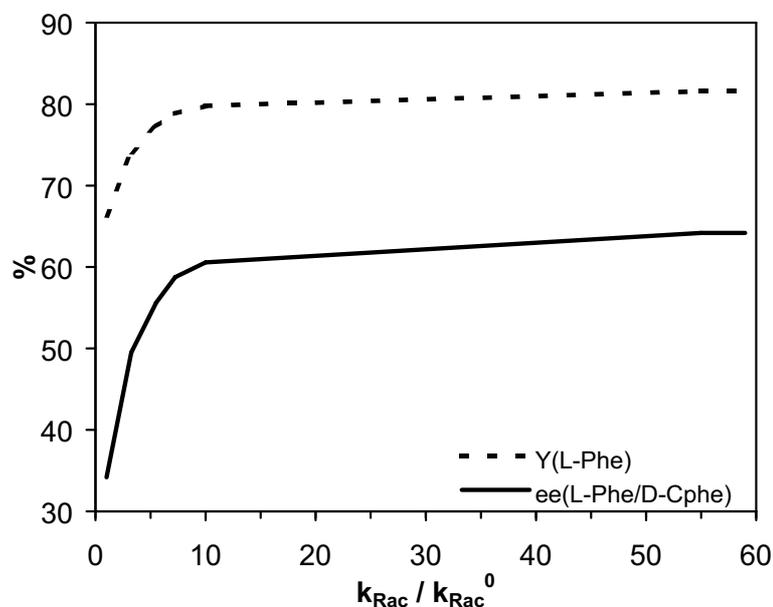


Abbildung 55: Einfluss der Racemisierungsgeschwindigkeit auf Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P bei einem Umsatz von $U \geq 98,9$ % (nach 8 h Reaktionszeit).

merenüberschusses ee_P die Konzentrationen zweier Spezies ein, da D-Carbamoylphenylalanin das unerwünschte ‚Gegenenantiomer‘ zum Produkt L-Phenylalanin darstellte.

Abb. 55 zeigt zusammenfassend den Einfluss der Racemisierungsgeschwindigkeit auf Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P . Ausgewertet wurden dazu die Simulationsergebnisse nach 8 h Reaktionszeit, so dass immer ein Umsatz von $U \geq 98,9\%$ vorlag. Für Racemisierungskonstanten $k_{Rac} / k_{Rac}^0 \geq 55$ war die Anforderung $c_{D-BnH}(t) = c_{L-BnH}(t)$ erfüllt, und der maximale Enantiomerenüberschuss betrug $ee_P = 64\%$. Der theoretische Wert von $ee_P = 100\%$ im thermodynamischen Gleichgewicht war aus den oben genannten Gründen praktisch nicht realisierbar.

Da bereits bei $k_{Rac} / k_{Rac}^0 = 10$ mehr als 94 % der maximalen Ausbeute bzw. des maximalen Enantiomerenüberschusses erreichbar sind, empfiehlt sich für die Praxis eine 10-fache Anhebung der Racemisierungsgeschwindigkeit als ausreichend.

7.2 Optimierung der Substratanfangskonzentration

Eine einfache Möglichkeit, die ins Reaktionssystem eingebrachte Stoffmenge an Substrat zu vergrößern, bestand in der Verwendung ungelösten D,L-Benzylhydantoin. So konnte bereits umgesetztes Substrat durch kontinuierliche Nachlösung während der Reaktion ersetzt und damit eine höhere Endkonzentration des besser löslichen Produkts L-Phenylalanin erzielt werden.

Zur Beantwortung der Frage nach dem Einfluss der Substratnachlösung auf den Reaktionsverlauf wurde das im Abschnitt 6.1.2.2 erläuterte Modell der Umsetzung von ungelöstem D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher für Simulationen mit sechs unterschiedlichen Anfangskonzentrationen $c_{BnH, solid}^0 = 10 \dots 60$ mM genutzt. Alle weiteren Modellparameter blieben wiederum unverändert. In Abb. 56 sind die zeitlichen Verläufe der gemäß Gl. 89 berechneten Ausbeuten Y dargestellt. Auffällig ist, dass die maximalen Ausbeuten bei steigender Anfangskonzentration von 64 % auf 71 % zunahm. Da wie im Abschnitt zuvor das thermodynamische Gleichgewicht der Gesamtreaktion praktisch nicht erreichbar war, und die maximale Ausbeute statt dessen im ‚näherungsweise Stillstand‘ (s. S. 122) ermittelt wurde, war ein kinetischer Effekt für die beobachtete Zunahme verantwortlich. Denn mit der Substratanfangskonzentration wuchs die maximale Bildungsrate für L-Phenylalanin um 36 % an, die für D-Carbamoylphenylalanin jedoch nur um 10 %, weshalb weniger Substrat in die ‚Einbahnstraße‘ zum Nebenprodukt gelangte und die Ausbeute anstieg. Mit der Anfangskonzentration stiegen ebenfalls die maximal erreichbare Produktkonzentration von 5,1 auf 15,7 mM und die integrale Produktivität von 0,67 auf 1,24 mmol/(L h) an. Die Produktivität profitierte dabei von der konzentrationsabhängig anwachsenden Reaktionsgeschwindigkeit.

Wie im unteren Teil der Abb. 57 zu erkennen ist, hing die Gesamtkonzentration aller gelösten Reaktanten c_{ges} linear mit einer positiven Steigung < 1 von der Anfangskonzentration an festem Benzylhydantoin $c_{BnH, solid}^0$ ab. Verglichen werden Simulationsergebnisse mit und ohne Racemisierung des Substrats. Die Linearität resultierte aus einer Überlagerung des für alle Simulationen

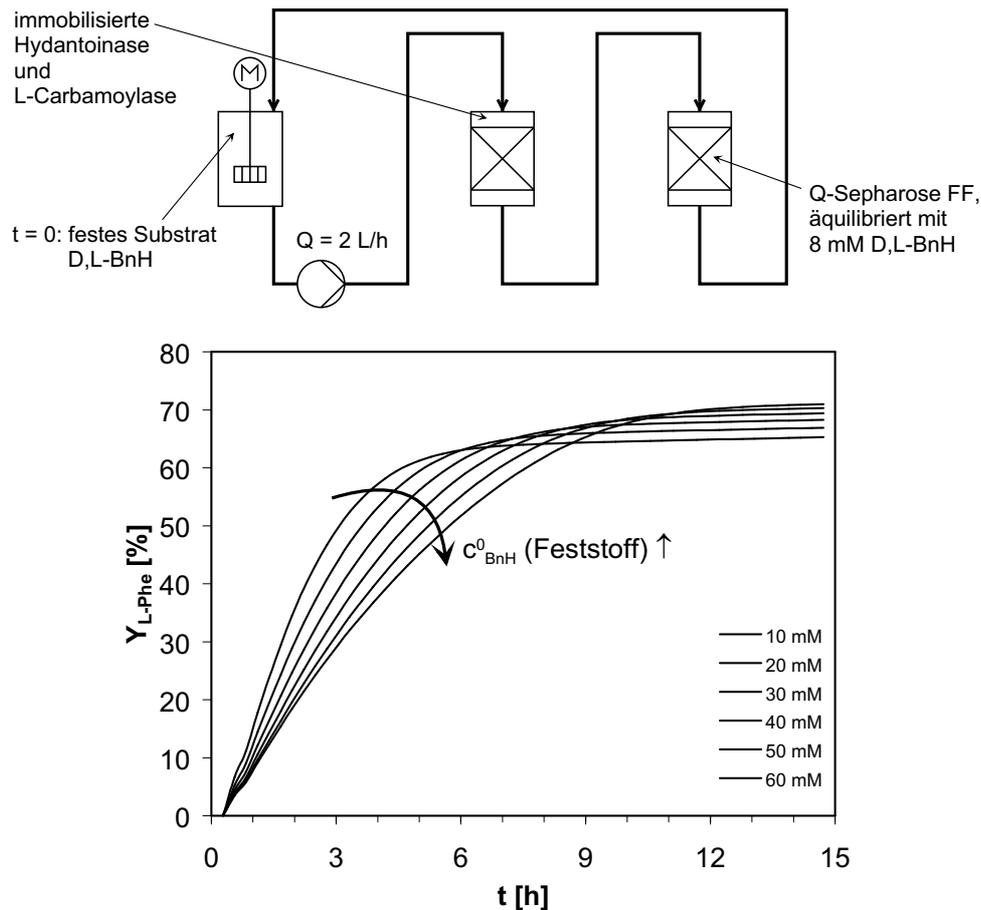


Abbildung 56: Simulation der absatzweisen Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher für verschiedene Anfangskonzentrationen $c_{BnH, solid}^0$ an ungelöstem Substrat. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Ausbeute Y .

konstanten (linearen) Verdünnungseffekts mit der Einstellung neuer Adsorptionsgleichgewichte am Ionenaustauscher. Hierbei erfolgte die Adsorption der am Reaktionsende hauptsächlich vorliegenden Komponenten nach linearen (D-Carbamoylphenylalanin) bzw. näherungsweise linearen (L-Phenylalanin) Gesetzmäßigkeiten. Da im Fall mit Racemisierung der Anteil von L-Phenylalanin an der Gesamtzusammensetzung erhöht war und diese Spezies am schlechtesten vom Ionenaustauscher gebunden wurde, ergab sich auch eine geringfügig größere Gesamtkonzentration aller gelösten Reaktanten. Für $c_{BnH, solid}^0 = 0 \text{ mM}$ resultierte aus den Simulationsergebnissen eine Konzentration von $c_{ges} = 4,7 \text{ mM}$, da der Ionenaustauscher im Modell vor einer Umsetzung jeweils mit 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung äquilibriert worden war.

Abb. 57 zeigt im oberen Teil den Einfluss der Substratanfangskonzentration auf Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P bei einem Umsatz von $U \geq 98 \%$. Der für die Ausbeute erläuterte kinetische Effekt verursachte ebenso einen Anstieg des Enantiomerenüberschusses von 30% auf 44% . Diese Werte bestätigten die Nützlichkeit des Ionenaustauschers, war doch in einem Reak-

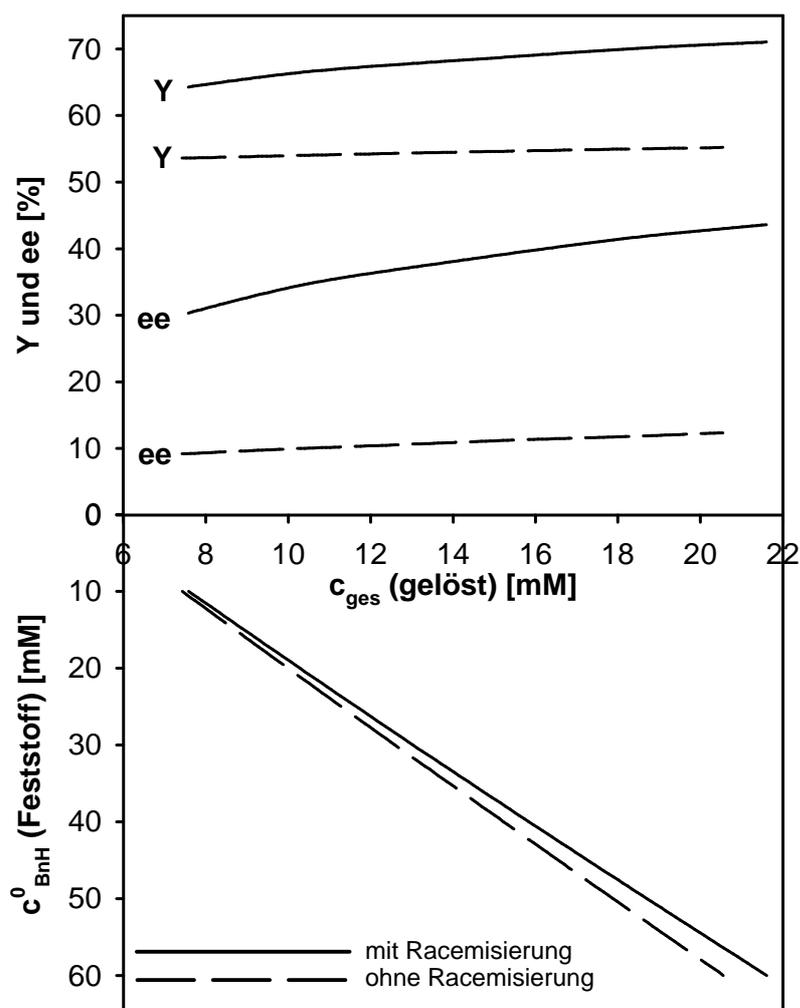


Abbildung 57: Einfluss der Anfangskonzentration $c_{BnH, solid}^0$ an ungelöstem D,L-Benzylhydantoin auf Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P bei einem Umsatz von $U \geq 98$ %. Mit $c_{BnH, solid}^0$ korrespondiert c_{ges} , die Gesamtkonzentration aller gelösten Reaktanten. Dargestellt sind Simulationsergebnisse mit bzw. ohne Racemisierung des Substrats.

tionssystem ohne Racemisierung allein aufgrund der Gleichgewichtsreaktion zum D-Carbamoylphenylalanin nur ein geringer Überschuss an L-Phenylalanin und damit $ee_P = 1/(1 + 2K_{eq}^{Hy}) \cong 1,8$ % (mit der Definition von ee_P gemäß Gl. 90) zu erwarten. Die Simulationen mit Ionenaustauscher und der Racemisierungskonstante $k_{Rac} = 0$ ergaben jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich eine Anreicherung von $ee_P \approx const. \approx 10$ %, die auf die im Vergleich mit L-Phenylalanin stärkere Adsorption von D-Carbamoylphenylalanin an den Ionenaustauscher zurückzuführen war. Aus gleichem Grund lag die Ausbeute mit $Y \approx 54$ % etwas über dem erwarteten Wert von 50 %. Signifikante Auswirkungen der Auflösungskinetik auf die Reaktion wurden bei den Simulationen nicht beobachtet, weil sich das Substrat stets ausreichend schnell nachlöste.

7.3 Kontinuierliche Prozessführung im Feed-and-Bleed Verfahren

Häufig wird in Produktionsprozessen ein kontinuierlicher Betrieb angestrebt, der neben Vorteilen wie vereinfachter Automatisierung vor allem konstante Produktqualität mit sich bringt. Zur Simulation eines kontinuierlichen Feed-and-Bleed Verfahrens wurde dem Membranreaktor im bestehenden Prozessmodell ein Zu- und Ablauf hinzugefügt (Abb. 58, oben). Vom Zulauf gelangte 8 mM D,L-Benzylhydantoinlösung mit dem Volumenstrom Q_{ext} in das Reaktionssystem, und am Ablauf wurde zum Ausgleich ein Volumenstrom gleicher Größe abgezogen.

Als Basis der Erweiterung dienten wie im vorangehenden Abschnitt 7.1 das Modell und die Parameter für die Umsetzung von 8 mM D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher (Abschnitt 6.1.2.1). Mit dem neuen Zu- und Ablauf erhielt die auf Seite 32 erläuterte Bilanzgleichung 1 des Membranreaktors neben dem Term, welcher aus dem intern durch die Festbettreaktoren zirkulierenden Volumenstrom Q_{int} resultiert, einen weiteren Term für den externen Volumenstrom Q_{ext} .

$$\frac{\partial c_j}{\partial t} = \frac{Q_{int}}{V_{RK}} (c_j^{zu} - c_j) + \frac{Q_{ext}}{V_{RK}} (c_j^{Zulauf} - c_j) \quad (91)$$

In Gl. 91 bezeichnet c_j^{zu} die Konzentration der Komponente j im internen Zulauf und c_j^{Zulauf} die externe Zulaufkonzentration, welche für $j = D-BnH$ und $j = L-BnH$ jeweils 4 mM betrug.

Für die Simulationen wurde der von den Festbettreaktoren zum Membranreaktor zurückgeführte Volumenstrom auf $Q_{int} = 2000$ mL/h fixiert und der Volumenstrom Q_{ext} des Zu- und Ablaufs zwischen 1 mL/h und 100 mL/h variiert. In Abb. 58 sind abhängig vom Verhältnis der Volumenströme Q_{ext} / Q_{int} der Umsatz U (Gl. 88), die Ausbeute Y (Gl. 89), der Enantiomerenüberschuss ee_P (Gl. 90) und die auf die Masse des feuchten Enzymimmobilisats bezogene Produktivität P aufgetragen, welche wie folgt berechnet wurde:

$$P = \frac{c_{L-Phe}^{Ablauf} Q_{ext}}{m_{T,f}} \quad (92)$$

Aufgrund idealer Durchmischung entsprach die Ablaufkonzentration c_{L-Phe}^{Ablauf} der Konzentration c_{L-Phe} im Membranreaktor. Sämtliche Größen wurden ermittelt, nachdem das gesamte Reaktionssystem ein Fließgleichgewicht erreicht hatte, welches sich bei allen Simulationen spätestens nach 8 h Reaktionszeit einstellte.

Erwartungsgemäß nahmen U , Y und ee_P mit ansteigendem Volumenstromverhältnis Q_{ext} / Q_{int} ab (Abb. 58), weil die Reaktionsgeschwindigkeiten nicht im gleichen Maße anwuchsen wie die Rate der Substratzufuhr. Jedoch zeigten die Simulationen, dass diese annähernd lineare Abnahme moderat verlief. So wiesen die drei genannten Kenngrößen eine ähnliche Steigung auf von etwa -0,1 Prozentpunkten bei Anhebung des externen Volumenstroms um 1 mL/h.

Diese moderate Abnahme wirkte sich günstig auf die Produktivität des kontinuierlichen Verfahrens aus. So waren zwar beim niedrigsten externen Volumenstrom optimale Werte für die Kenngrößen ($U = 99$ %, $Y = 66$ %, $ee_P = 34$ %) zu erzielen, die denen der absatzweisen Umsetzung in Abschnitt

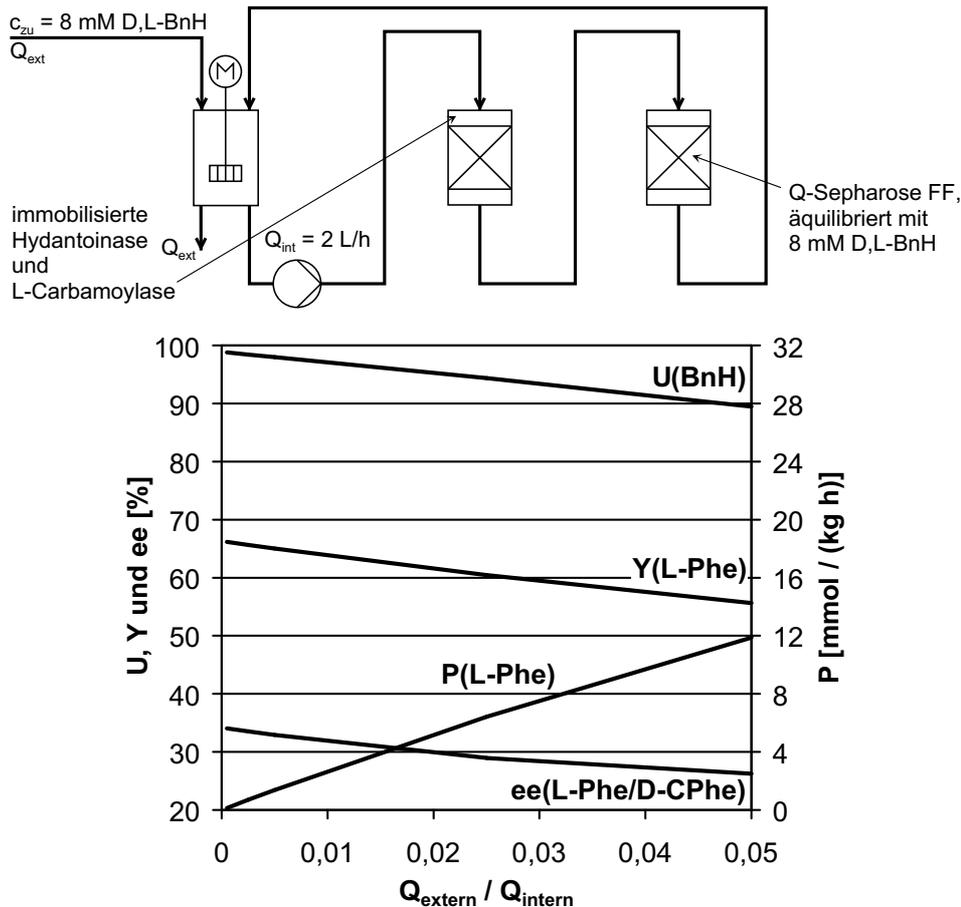


Abbildung 58: Simulation der kontinuierlichen Umsetzung von 8 mM D,L-Benzylhydantoin mit immobilisierter Hydantoinase und L-Carbamoylase einschließlich Racemisierung am Ionenaustauscher für verschiedene Verhältnisse Q_{ext} / Q_{int} von externem zu internem Volumenstrom. Dargestellt sind Umsatz U , Ausbeute Y , Enantiomerenüberschuss ee_P und Produktivität P .

7.1 (für $k_{Rac}/k_{Rac}^0 = 1$) glichen, aber durch den geringen Multiplikator $Q_{ext} = 1 \text{ mL/h}$ betrug die Produktivität P lediglich $0,14 \text{ mmol}/(\text{kg h})$. Andererseits sanken die Kenngrößen beim 100-fachen externen Volumenstrom Q_{ext} nur zwischen 10 % und 20 %, wohingegen die Produktivität um den Faktor 85 auf $P = 11,9 \text{ mmol}/(\text{kg h})$ anstieg.

Neben der Zusammensetzung des abgeführten Produktvolumenstroms ist bei einem kontinuierlichen Verfahren die Dauer der instationären Anfahrphase von Interesse. Je länger diese dauert, desto gravierender ist der Verlust an Substratlösung, die nur teilweise umgesetzt am Ablauf verworfen wird. Wesentliche Betriebsparameter mit Einfluss auf die Anfahrphase waren die Bettvolumina des Enzym- und Ionenaustauscherreaktors sowie der intern zirkulierende Volumenstrom Q_{int} und der externe Zu- bzw. Ablauf Q_{ext} . Bezogen auf die Verhältnisse der zuvor beschriebenen Simulation mit $Q_{int} = 2000 \text{ mL/h}$ und $Q_{ext} = 100 \text{ mL/h}$ wurden die Bettvolumina um die Faktoren 5 bzw. 8 (in Abb. 59 gekennzeichnet durch 5xE, 5xIAT, 8xIAT), der interne Volumenstrom um die Faktoren

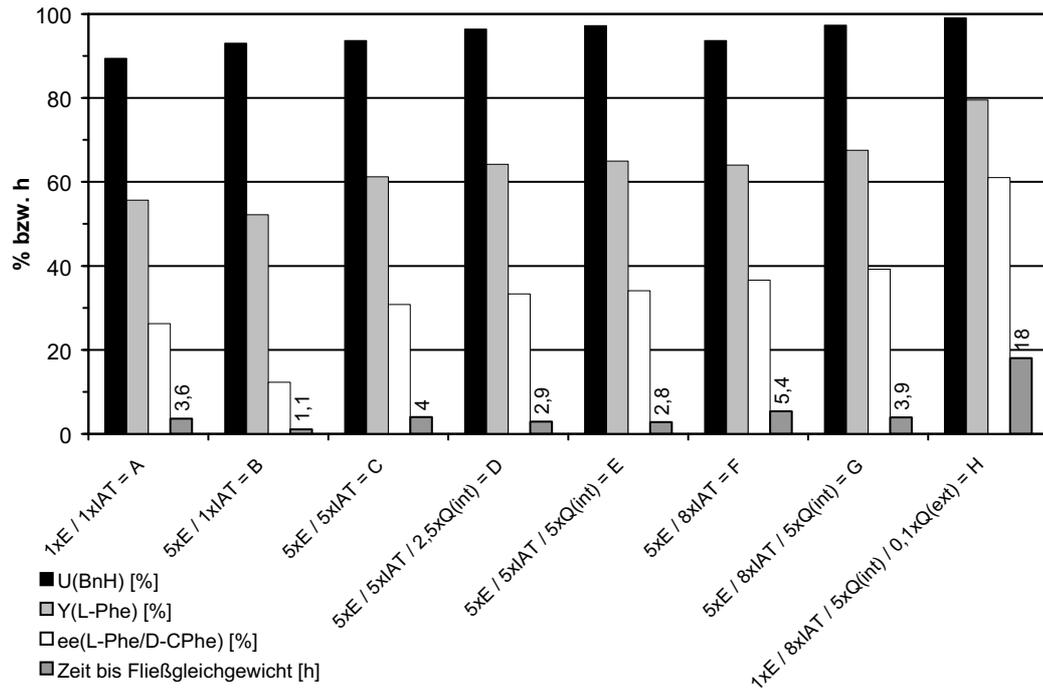


Abbildung 59: Simulationsstudie mit größerem Enzym- und/oder Ionenaustauschervolumen (E bzw. IAT) in den Festbettreaktoren. Die Bettvolumina wurden um die Faktoren 5 bzw. 8 vergrößert, $Q_{int} = 2$ L/h (Ausnahmen: Simulationen D, E, G und H), $Q_{ext} = 0,1$ L/h (Ausnahme: Simulation H). Dargestellt sind Umsatz U , Ausbeute Y und Enantiomerenüberschuss ee_P im Zustand des Fließgleichgewichts sowie die Dauer der instationären Phase.

2,5 bzw. 5 ($2,5xQ(int)$, $5xQ(int)$) und der externe Volumenstrom um den Faktor 0,1 ($0,1xQ(ext)$) variiert.

Wie der Rubrik A in Abb. 59 zu entnehmen ist, ergab sich für die Ausgangssituation eine instationäre Phase von 3,6 Stunden Dauer. Eine Beschleunigung der Reaktion durch 5-faches Bettvolumen im Enzymreaktor senkte die Dauer der instationären Phase auf 1,1 Stunden (Simulation B). Gleichzeitig brach aber der Enantiomerenüberschuss ee_P von 26 % auf 12 % ein, da die Substratracemisierung aufgrund des unausgewogenen Volumenverhältnisses von Enzym zu Ionenaustauscher zu langsam ablief und deshalb die Bildung des Nebenprodukts D-Carbamoylphenylalanin begünstigt war. Im nächsten Schritt wurden daher beide Festbetten um den Faktor 5 vergrößert (Simulation C), was dem Volumenverhältnis der Ausgangssituation entsprach. Anstatt dass das Fließgleichgewicht nun schneller erreicht wurde, verlängerte sich die Verzögerungszeit geringfügig von 3,6 auf 4,0 Stunden bei leicht verbesserten Kennzahlen U , Y und ee_P . Ursache hierfür war der auf Ad- und Desorption beruhende verzögernde Einfluss des als Stoffspeicher wirkenden Ionenaustauschers. Weil bei der gegebenen Systemdynamik ein Vervielfachen der Katalysatormengen alleine nicht ausreichte, um die instationäre Phase abzukürzen, wurde für die Simulationen D und E zusätzlich der intern zirkulierende Volumstrom Q_{int} um die Faktoren 2,5 bzw. 5 angeho-

ben. Wiederum stiegen die Kennzahlen leicht an, und die Verzögerungszeit sank von 4,0 auf 2,9 bzw. 2,8 Stunden. Deutlich erkennbar reduzierte die geringere Verweilzeit im Ionenaustauscher die verzögernde Wirkung des Stoffspeichers und führte eine Verkürzung der Anfahrphase herbei. Begrenzt war der Effekt dieser Maßnahme durch einen maximalen Volumenstrom Q_{int}^{max} , bei dessen Überschreitung die Auswirkungen auf den Reaktionsverlauf rapide abnahmen. So verkürzte sich im Vergleich der Simulationen D und E die instationäre Phase bei doppeltem Q_{int} lediglich um 6 min. Simulation F berücksichtigte das Resultat aus Abschnitt 7.1, dass die Zusammensetzung der Produktlösung stark von der Racemisierungsgeschwindigkeit abhängt, indem das Bettvolumen des Ionenaustauschers um den Faktor 8 vergrößert wurde. Stellt man die Ergebnisse denen der Simulation C gegenüber, bestätigt sich auch für den kontinuierlichen Betrieb die tendenzielle Verbesserung des Enantiomerenüberschusses mit zunehmender Racemisierungsgeschwindigkeit (C: $ee_P = 31\%$, F: $ee_P = 37\%$). Die aufgrund der größeren Menge an Ionenaustauscher von 4,0 auf 5,4 Stunden angewachsene Dauer der Anfahrphase ließ sich wie bereits zuvor (Simulationen C und E) durch Erhöhung des intern zirkulierenden Volumstroms Q_{int} um den Faktor 5 auf 3,9 Stunden (Simulation G) verkürzen. Ein optimiertes Ergebnis mit $U = 99\%$, $Y = 79\%$ und $ee_P = 61\%$ zeigt Simulation H. Bei fast vollständigem Umsatz stimmte der Enantiomerenüberschuss beinahe mit dem Maximalwert $ee_P = 64\%$ (s. S. 123) überein. Ermöglicht hatte dies die Kombination eines einfachen Bettvolumens im Enzymreaktor mit 8-fachem Bettvolumen an Ionenaustauscher. Nachteilig wirkte sich die große Ionenaustauschermasse auf die Dauer der instationären Phase aus, die mit 18 Stunden alle anderen Simulationen bei weitem übertraf, obwohl Q_{int} zur Beschleunigung bereits um den Faktor 5 erhöht war. Auch hinsichtlich der Produktivität wurde der Vorteil optimierter Kenngrößen durch die notwendige Reduktion des Volumenstroms Q_{ext} im Zu- und Ablauf von 100 mL/h auf 10 mL/h relativiert, so dass Simulation G als Vorlage für eine zukünftige größere Versuchsanlage die interessanteste Variante darstellt.

Literatur

- [1] M. Abendschein. Experimentelle Untersuchung der chemischen Racemisierung von Hydantoinen. Diplomarbeit, IBVT, Universität Stuttgart, 1998.
- [2] M. Baerns, H. Hofmann und A. Renken. *Chemische Reaktionstechnik*. Thieme, Stuttgart, New York, 3. Auflage, 1999.
- [3] J.E. Bailey und F. Ollis. *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill, New York, 2. Auflage, 1986.
- [4] R.B. Bird, W.E. Stewart und E.N. Lightfoot. *Transport Phenomena*. Wiley, New York, 1960.
- [5] A.S. Bommarius, M. Schwarm und K. Drauz. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals – examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 5:1–11, 1998.
- [6] J. Boutelje, M. Hjalmarsson, K. Hult, M. Lindbäck und T. Norin. Control of the stereoselectivity of pig-liver esterase by different reaction conditions in the hydrolysis of cis-N-benzyl-2,5-bismethoxycarbonylpyrrolidine and structurally related diesters. *Bioorg. Chem.*, 16:364–375, 1988.
- [7] M. Bovarnik und H.T. Clarke. Racemisation of tripeptides and hydantoins. *J. Am. Chem. Soc.*, 60:2426–2430, 1938.
- [8] K. Buchholz. Immobilisierte Enzyme - Kinetik, Wirkungsgrad und Anwendung. *Chem.-Ing.-Tech.*, 61(8):611–620, 1989.
- [9] K. Buchholz und V. Kasche. *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. VCH, Weinheim, 1997.
- [10] T.K. Buschulte und F. Heimann. Verfahrensentwicklung durch Kombination von Prozeßsimulation und Miniplant-Technik. *Chem.-Ing.-Tech.*, 67(6):718–723, 1995.
- [11] H.A. Chase, B. Machielse und D. Naveh. Characteristics of the adsorption of immunoglobulin M onto Q-Sepharose Fast Flow ion-exchangers. *Bioseparation*, 7(1):47–55, 1997.
- [12] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas und C.J. Sih. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:7294–7299, 1982.
- [13] C.-S. Chen, S.H. Wu, G. Girdaukas und C.J. Sih. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. 2. enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 109:2812–2817, 1987.

- [14] K.-C. Chen, C.-C. Chang, C.-F. Chiu und A.C. Ling. Mathematical simulation of pseudo-crystallofermentation of hydrocortisone by *Arthrobacter simplex*. *Biotechnol. Bioeng.*, 27(3):253–259, 1985.
- [15] K.-C. Chen und H.-C. Wey. Dissolution-enzyme kinetics of 11 β -hydroxylation of cortexolone by *Curvularia lunata*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12(8):616–621, 1990.
- [16] S.F. Chung und C.Y. Wen. Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds. *AIChE J.*, 14:857–866, 1968.
- [17] P. Clapés, J. Mata-Alvarez, J.M. García-Antón, F. Reig und G. Valencia. Application of a recycle reactor to obtain kinetic data from progress curves in immobilized-enzyme-catalyzed reactions. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 11(5):483–491, 1989.
- [18] R. Dagys, S. Žvirblis, V. Lukša und A. Pauliukonis. Kinetics of deactivation of L-lysylamidase, L-aminoacylase and D-hydantoinase. *J. Biotechnol.*, 23(3):241–256, 1992.
- [19] H.D. Dakin. The catalytic racemisation of optically active hydantoin derivatives and of related substances as the result of tautomeric change. *Am. Chem. J.*, 44:48–60, 1910.
- [20] H.D. Dakin und H.W. Dudley. The resolution of inactive uramido acids and hydantoins into active components, and their conversion to amino acids: I. β -phenyl- α -uramidopropionic acid, benzylhydantoin and phenylalanine. *J. Biol. Chem.*, 17:29–36, 1914.
- [21] P.V. Danckwerts. Continuous flow systems. Distribution of residence times. *Chem. Eng. Sci.*, 2(1):1–13, 1953.
- [22] P. Deufelhard, E. Hairer und J. Zugck. One-step and extrapolation methods for differential-algebraic systems. *Num. Math.*, 51:501–516, 1987.
- [23] G. Dombach. *Isolierung und Charakterisierung einer Hydantoinase aus Arthrobacter spec. DSM 3747*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1989.
- [24] N.R. Draper und H. Smith. *Applied regression analysis*. Wiley, New York, 2. Auflage, 1981.
- [25] K.H. Dudley und D.L. Bius. Buffer catalysis of the racemization reaction of some 5-phenylhydantoins and its relation to the in vivo metabolism of ethotoin. *Drug Metabol. Dispos.*, 4(4):340–348, 1976.
- [26] R.G. Duggleby und R.B. Clarke. Experimental designs for estimating the parameters of the michaelis-menten equation from progress curves of enzyme-catalyzed reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1080(3):231–236, 1991.
- [27] J. Flügge. *Grundlagen der Polarimetrie: Gerätekunde und Messtechnik*. DeGruyter, Berlin, 1970.

- [28] D. Grandjean, P. Pale und J. Chucho. Synthesis of optically pure cis-epoxyalcohols via an enzymatic route; an alternative to the sharpless asymmetric epoxidation. *Tetrahedron Lett.*, 32(26):3043–3046, 1991.
- [29] D. Greß, H. Hartmann, G. Kaibel und B. Seid. Einsatz von mathematischer Simulation und Miniplant-Technik in der Verfahrensentwicklung. *Chem.-Ing.-Tech.*, 51(6):601–611, 1979.
- [30] W.I. Higuchi und E.N. Heistand. *J. Pharm. Sci.*, 52:62–71, 1963.
- [31] W.I. Higuchi, E.L. Rowe und E.N. Heistand. *J. Pharm. Sci.*, 52:162–164, 1963.
- [32] E. Holmberg und K. Hult. Temperature as an enantioselective parameter in enzymatic resolutions of racemic mixtures. *Biotechnol. Lett.*, 13(5):323–326, 1991.
- [33] M. Indlekofer. *Modellgestützte Entwicklung kontinuierlicher Prozesse zur lipasekatalysierten Racematspaltung in organischen Lösungsmitteln*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1996.
- [34] M. Indlekofer, M. Funke, W. Claassen und M. Reuss. Continuous enantioselective transesterification in organic solvents. Use of suspended lipase preparations in a microfiltration membrane reactor. *Biotechnol. Prog.*, 11:436–442, 1995.
- [35] T. Ishikawa, K. Watabe, Y. Mukohara und H. Nakamura. Mechanism of stereospecific conversion of D,L-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by *pseudomonas* sp. strain NS671. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(1):185–187, 1997.
- [36] M.L. Jansen, A.J.J. Straathof, L.A.M. Vanderwielen, K.C.A.M. Luyben und W.J.J. Vandentweel. Rigorous model for ion exchange equilibria of strong and weak electrolytes. *AIChE J.*, 42(7):1911–1924, 1996.
- [37] W.P. Jencks. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. McGraw-Hill, New York, 1969.
- [38] K.J. Johnson. *Numerical methods in chemistry*. Marcel Dekker, New York, 1980.
- [39] W. Kast. *Adsorption aus der Gasphase*. VCH, Weinheim, 1988.
- [40] T. Kießler. *Modellierung und Entwicklung eines Fest-Flüssig-Wirbelschichtreaktors für die enzymkatalysierte Isomerisierung von Glucose*. Fortschritt-Berichte VDI Reihe 3, Nr. 174, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1989.
- [41] G.-J. Kim und H.-S. Kim. Optimal reaction conditions for the enzymatic-synthesis of optically-active D-p-hydroxyphenylglycine from 5-substituted hydantoin using D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 750:185–189, 1995.

- [42] G.-J. Kim und H.-S. Kim. Optimization of the enzymatic-synthesis of D-p-hydroxyphenylglycine from DL-5-substituted hydantoin using D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Enzyme Microb. Technol.*, 17(1):63–67, 1995.
- [43] R. Kümmel und E. Worch. *Adsorption aus wässrigen Lösungen*. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1. Auflage, 1990.
- [44] L.K.P. Lam, R.A.H.F. Hui und J.B. Jones. Enzymes in organic synthesis, 35. stereoselective pig-liver esterase catalyzed hydrolysis of 3-substituted glutamate diesters - optimization of enantiomeric excess via reaction condition control. *J. Org. Chem.*, 51:2047–2050, 1986.
- [45] R.A. Lazarus. Chemical racemization of 5-benzylhydantoin. *J. Org. Chem.*, 55:4755–4757, 1990.
- [46] C.-K. Lee und C.-H. Fan. Enzymatic synthesis and subsequent racemization rates determination of optically active D-5-phenylhydantoin and D-5-hydroxyphenylhydantoin. *Enzyme Microb. Technol.*, 24(10):659–666, 1999.
- [47] C.-K. Lee, C.-H. Fan und P.-F. Yang. Modeling and simulation of a pressure-swing reactor for the conversion of poorly soluble substrate by immobilized enzyme: the case of D-hydantoinase reaction. *Biochem. Eng. J.*, 7(3):233–239, 2001.
- [48] C.-K. Lee, Z.-S. Lee und P.-F. Yang. Effect of cell membrane of agrobacterium radiobacter on enhancing D-amino acids production from racemic hydantoins. *Enzyme Microb. Technol.*, 28(9–10):806–814, 2001.
- [49] C.-K. Lee und K.-C. Lin. N-carbamoyl-D-p-hydroxyphenylglycine production using immobilized D-hydantoinase from recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.*, 19(8):623–627, 1996.
- [50] D.-C. Lee, J.-H. Park, G.-J. Kim und H.-S. Kim. Modeling, simulation, and kinetic analysis of a heterogeneous reaction system for the enzymatic conversion of poorly soluble substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 64(3):272–283, 1999.
- [51] W. Leuchtenberger. Amino acids – technical production and use. In H.J. Rehm und G. Reed (Hrsg.), *Biotechnology*, Band 6. VCH-Verlag, Weinheim, 1996.
- [52] O. Levenspiel. *Chemical reaction engineering*. Wiley, New York, 2. Auflage, 1972.
- [53] R.J. LeVeque. *Numerical methods for conservation laws*. Birkhäuser, Basel, 1990.
- [54] W.D. Maxon, J.W. Chen und F.R. Hanson. Simulation of a steroid bioconversion with a mathematical model. *Ind. Eng. Chem. Process Design Develop.*, 5(3):285–289, 1966.

- [55] O. May. *The Hydantoinase from Arthrobacter aurescens DSM 3745 and its Relation to other Hydantoinases*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1998.
- [56] O. May, P.T. Nguyen und F.H. Arnold. Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.*, 18:317–320, 2000.
- [57] O. May, M. Siemann, M. Pietzsch, M. Kiess, R. Mattes und C. Syldatk. Substrate dependent enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745: Purification and characterization as a new member of cyclic amidases. *J. Biotechnol.*, 61:1–13, 1998.
- [58] S. Nagata. *Mixing: principles and applications*. Kodansha, Tokyo, 1975.
- [59] K. Nakanishi. *Circular dichroism: principles and applications*. VCH, New York, Weinheim, 1994.
- [60] B. Noll. *Numerische Strömungsmechanik: Grundlagen*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1993.
- [61] H. Noritomi, Ö. Almarsson, G.L. Barletta und A.M. Klibanov. The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotechnol. Bioeng.*, 51:95–99, 1996.
- [62] J.Y. Oldshue. *Fluid mixing technology*. McGraw-Hill, New York, 1983.
- [63] R. Olivieri, E. Fascetti, L. Angelini und L. Degen. Microbial transformation of racemic hydantoins to D-amino acids. *Biotechnol. Bioeng.*, 23:2173–2183, 1981.
- [64] J.-H. Park, K.-H. Oh, D.-C. Lee und H.-S. Kim. Modeling and kinetic analysis of the reaction system using whole cells with separately and co-expressed D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 78(7):779–793, 2002.
- [65] S.V. Patankar. *Numerical heat transfer and fluid flow*. Hemisphere Publ. Corp., New York, 1980.
- [66] R.H. Perry und Green D.W. (Hrsg.). *Perry's chemical engineers' handbook*. McGraw-Hill, New York, 7. Auflage, 1997.
- [67] M. Pietzsch, H. Oberreuter, B. Petrovska, K. Ragnitz und C. Syldatk. Immobilization of a L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 - effect of the coupling method on the stability of the biocatalyst. In *Stability and Stabilization of Biocatalysts*. Elsevier Science, 1998.
- [68] W.H. Press. *Numerical recipes in FORTRAN*. Cambridge University Press, Cambridge, 2. Auflage, 1992.

- [69] K. Ragnitz. *Immobilisierung und Stabilisierung der Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus Arthrobacter aurescens DSM 3747*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2000.
- [70] M. Reist, P.-A. Carrupt, B. Testa, S. Lehmann und J.J. Hansen. Kinetics and mechanisms of racemization: 5-substituted hydantoins (=imidazolidine-2,4-diones) as models of chiral drugs. *Helv. Chim. Acta*, 79(3):767–778, 1996.
- [71] P.L. Roe. Some contributions to the modelling of discontinuous flow. *Lect. Notes Appl. Math.*, 22:163–193, 1985.
- [72] D.M. Ruthven. *Principles of adsorption and adsorption processes*. Wiley, New York, 1984.
- [73] F. Sarfert. Elektrodialyse zur Gewinnung von Aminosäuren. ZSP-Workshop Enzymkaskade am IBVT, Universität Stuttgart, 1999.
- [74] F. Sarfert. *Ion exchange membranes in aqueous, methanolic and ethanolic electrolyte solutions*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2005.
- [75] D. Schaich. Enzymatische Produktion enantiomerenreiner Aminosäuren durch stereoselektive Hydantoinspaltung. Studienarbeit, IBVT, Universität Stuttgart, 1995.
- [76] S. Schmalzriedt. *CFD-Simulationen von Mischvorgängen und biotechnischen Stoffumsetzungen in begasten Rührkesselreaktoren*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2001.
- [77] A. Schulz-Walz. Meß- und Dosiertechnik beim Betrieb von Miniplants. *Chem.-Ing.-Tech.*, 62(6):453–457, 1990.
- [78] M. Schwickart. Bestimmung der Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in Abhängigkeit von der Temperatur, dem pH-Wert, der Natriumchloridkonzentration und dem Substrat. Studienarbeit, IBVT, Universität Stuttgart, 1999.
- [79] I. H. Segel. *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme system*. Wiley, New York, 1975.
- [80] D. Seguin, A. Montillet, D. Brunjail und J. Comiti. Liquid-solid mass transfer in packed beds of variously shaped particles at low Reynolds numbers: experiments and model. *Chem. Eng. J.*, 63:1–9, 1995.
- [81] R. Sheldon. Industrial synthesis of optically active compounds. *Chem. Ind.*, 7(4):212–219, 1990.
- [82] R.-A. Sheldon. Biocatalytic vs. chemical synthesis of enantiomerically pure compounds. *Chimia*, 50(9):418–419, 1996.

- [83] A. Sokolichin, G. Eigenberger, A. Lapin und A. Lübbert. Dynamic numerical simulation of gas-liquid two-phase flows Euler/Euler versus Euler/Lagrange. *Chem. Eng. Sci.*, 52(4):611–626, 1997.
- [84] H. Steude, L. Deibele und J. Schröter. Miniplant-Technik – Ausgewählte Aspekte der apparativen Gestaltung. *Chem.-Ing.-Tech.*, 69(5):623–631, 1997.
- [85] A.J.J. Straathof, J.L.L. Rakels und J.J. Heijnen. Kinetics of the enzymatic resolution of racemic compounds in Bi-Bi reactions. *Biocatalysis*, 7:13–27, 1992.
- [86] C. Syldatk, O. May, J. Altenbuchner, R. Mattes und M. Siemann. Microbial hydantoinases – industrial enzymes from the origin of life? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:293–309, 1999.
- [87] B. Testa und W.-F. Trager. Racemates versus enantiomers in drug development - dogmatism or pragmatism. *Chirality*, 2(3):129–133, 1990.
- [88] H. Teves, T. Waniek, M. Pietzsch, C. Syldatk und M. Reuss. Application of different polarimetric methods for the analysis of enzyme-catalyzed enantioselective reactions. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363(8):738–743, 1999.
- [89] H. S. Tichy. *Zur Elektrodialyse als integriertes Trennverfahren in der Enzymtechnologie – dargestellt am Beispiel der L-Methionin-Herstellung mittels eines Multi-Enzym-Systems*. Dissertation, Technische Universität München, 1988.
- [90] L. Tranchino und F. Melle. Modeling and control of the biocatalytic conversion of hydantoins to D-amino acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 589(May):553–568, 1990.
- [91] D. Völkel und F. Wagner. Reaction-mechanism for the conversion of 5-monosubstituted hydantoins to enantiomerically pure L-amino-acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 750:1–9, 1995.
- [92] C. Wandrey, A. Liese und D. Kihumbu. Industrial biocatalysis: Past, present und future. *Org. Process Res. Dev.*, 4(4):286–290, 2000.
- [93] T. Waniek. *Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselectivität mikrobieller Hydantoinasen*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2000.
- [94] W. Warmuth, E. Wenzig und A. Mersmann. Selection of a support for immobilization of a microbial lipase for the hydrolysis of triglycerides. *Bioprocess Eng.*, 12:87–93, 1995.
- [95] K. Watabe, T. Ishikawa, Y. Mukohara und H. Nakamura. Purification and characterization of the hydantoin racemase of *Pseudomonas* sp. strain NS671 expressed in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 174:7989–7995, 1992.
- [96] R.D. Whitley, R. Wachter, F. Liu und N.-H.L. Wang. Ion-exchange equilibria of lysozyme, myoglobin and bovine serum albumin; effective valence and exchanger capacity. *J. Chromatogr.*, 465:137–156, 1989.

- [97] A. Wiese, M. Pietzsch, C. Syldatk, R. Mattes und J. Altenbuchner. Hydantoin racemase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747: heterologous expression, purification and characterization. *J. Biotechnol.*, 80(3):217–230, 2000.
- [98] J.E. Williamson, K.E. Bazaire und C.J. Geankoplis. Liquid-phase mass transfer at low Reynolds numbers. *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 2(2):126–129, 1963.
- [99] B. Wilms. *Bioconversion of hydantoins to amino acids: - Expression of a L-N-carbamoylase gene from Arthrobacter aurescens in Escherichia coli and development of a high cell density fermentation process. - Design of an Escherichia coli whole cell catalyst by coexpression of a hydantoinase, a carbamoylase and a racemase gene.* Dissertation, Universität Stuttgart, 2000.
- [100] B. Wilms, A. Wiese, C. Syldatk, R. Mattes, J. Altenbuchner und M. Pietzsch. Cloning, nucleotide sequence and expression of a new L-N-carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 in *E. coli*. *J. Biotechnol.*, 68:101–113, 1999.
- [101] E.J. Wilson und C.J. Geankoplis. Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds. *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 5(1):9–14, 1966.
- [102] A. Wolff, L. Zhu, V. Kielland, A.J.J. Straathof, J.A. Jongejan und J.J. Heijnen. Simple dissolution-reaction model for enzymatic conversion of suspension of solid substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):433–440, 1997.
- [103] O. Wörz. Process development via a miniplant. *Chem. Eng. Process.*, 34(3):261–268, 1995.
- [104] M. Yagasaki und A. Ozaki. Industrial biotransformations for the production of D-amino acids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 4:1–11, 1998.
- [105] A. Yamashiro, K. Kubota und K. Yokozeki. Mechanism of stereospecific production of L-amino acids from the corresponding 5-substituted hydantoins by *Bacillus brevis*. *Agric. Biol. Chem.*, 52(11):2857–2863, 1988.
- [106] K. Yokozeki und K. Kubota. Mechanism of asymmetric production of D-amino acids from the corresponding hydantoins by *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3):721–728, 1987.
- [107] K. Yokozeki, H. Yoshiteru und K. Kubota. Mechanism of asymmetric production of L-aromatic amino acids from the corresponding hydantoins by *Flavobacterium* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3):737–746, 1987.