
Optimierung der *Lb*ADH-katalysierten oxidativen Lactonisierung zur Synthese von δ -Valerolacton

Technische Universität Dortmund
Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
Lehrstuhl Bioprozesstechnik



Chair for Bioprocess Engineering

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (M.Sc.)

Jonas Gerfen

Matrikelnummer: 212855

Dortmund, 30.05.2025

Erstprüfer:	Prof. Dr. Stephan Lütz
Zweitprüfer:	Prof. Dr. Markus Nett
Betreuer:	M.Sc. Julian Handke

Zusammenfassung

Bioabbaubare Kunststoffe aus nachwachsenden Rohstoffen sind eine umweltfreundliche Alternative zu konventionellen Kunststoffen. Einer dieser Kunststoffe ist Polyvalerolacton, ein Polyester, der über die Ringöffnungspolymerisation von δ -Valerolacton hergestellt werden kann. Die *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase (*LbADH*) ist in der Lage, dieses Monomer durch oxidative Lactonisierung von 1,5-Pentandiol zu synthetisieren. Für diese Reaktion verwendet der Wildtyp der *LbADH* bevorzugt Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert) (NADP^+) als Cofaktor. Da Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert) (NAD^+) kostengünstiger und stabiler ist, wurden verschiedene Strategien verfolgt, um die Akzeptanz von NAD^+ zu erhöhen.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, eine geeignete NAD^+ -abhängige Variante der *LbADH* zu identifizieren. Als Referenz dienten der Wildtyp sowie zwei aus der Literatur bekannte Mutanten, G37D und R38P. Zur Bewertung der Cofaktorpräferenz wurde die Oxidation von Phenylethanol als Modellreaktion herangezogen. Im Anschluss wurde die Analyse auf die Zielreaktion – die oxidative Lactonisierung von 1,5-Pentandiol – ausgeweitet. Es zeigte sich, dass die Variante G37D die höchste Aktivität bei Verwendung von NAD^+ aufweist. Für diese Variante wurde eine detaillierte kinetische Charakterisierung durchgeführt. Die zweisechrittige Reaktion von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton wurde mittels einer Mehrsubstrat-Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. Basierend auf den ermittelten Parametern konnte ein mathematisches Modell etabliert werden, das die zeitliche Konzentrationsveränderung aller beteiligten Metabolite beschreibt.

Das Modell wurde validiert, optimiert und um ein System zur Cofaktorregenerierung ergänzt. Durch die zusätzliche Erweiterung des Modells um Enzyminaktivierung und Hydrolyse von δ -Valerolacton konnte eine präzise Beschreibung des Konzentrationsverlaufs erreicht werden. Die Modellierung des Gesamtsystems inklusive Cofaktorregenerierung führte jedoch nicht zu übereinstimmenden Ergebnissen mit den vergleichenden experimentellen Untersuchungen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass das eingesetzte Regenerationssystem den maximal erreichbaren Titer steigerte. Unter sonst identischen Bedingungen konnte der maximale δ -Valerolacton-Titer durch die Zugabe von 100 mM Aceton von 3,05 mM auf 12,3 mM erhöht werden.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivität der *LbADH* gegenüber 1,5-Pentandiol ($0,075 \text{ U mg}^{-1}$) im Vergleich zu anderen Substraten sowie zu anderen Alkoholdehydrogenasen sehr gering ist. Für eine mögliche industrielle Anwendung ist daher eine signifikante Steigerung dieser Aktivität durch Protein-Engineering-Strategien sinnvoll.

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung und Motivation	1
1.1 Biokunststoffe	1
1.2 Polyester	2
1.3 <i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase	5
1.4 Enzymkinetik	9
2 Ziel dieser Arbeit	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Chemikalien	12
3.2 Medien und Lösungen	12
3.3 Stämme und Plasmide	13
3.4 <i>In vivo</i> Proteinsynthese und Aufreinigung	14
3.4.1 Kultivierung	14
3.4.2 Proteinaufreinigung	14
3.4.2.1 Zellaufschluss	15
3.4.2.2 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie	15
3.5 Analytische Methoden	16
3.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	16
3.5.2 Bradford	18
3.5.3 Aktivitäts-Assay	19
3.5.3.1 Reaktionsgemisch	20
3.5.3.2 Kalibrierung	20
3.5.3.3 Aktivitätsbestimmung	21
3.5.3.4 Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetik	22
3.5.4 GCMS	22
3.5.4.1 Extraktion	23
3.5.4.2 Kalibrierung	23
3.6 <i>In vitro</i> Biotransformation	24
3.7 Hydrolyse	24
3.8 Kinetische Modellierung des Reaktionssystems	25
3.8.1 Parameterbestimmung mittels gewichteter nichtlinearer Regression	25
3.8.2 Modellierung und Simulation der Reaktionskinetik	26
3.9 Fehlerfortpflanzung	27
4 Ergebnisse	28
4.1 Erfolgreiche Isolierung der Zielproteine	28
4.2 Aktivitätsvergleich	29
4.2.1 Phenylethanol-Oxidation: pH 8 als bester getesteter Wert für alle Varianten	29
4.2.2 G37D und R38P zeigen geänderte Cofaktorpräferenz zugunsten von NAD ⁺	30
4.2.3 Vergleich der Zielreaktion zeigt G37D als leistungsstärkste NAD ⁺ -abhängige Variante	33
4.3 Kinetische Charakterisierung von G37D + NAD ⁺	35
4.3.1 Beschreibung der erweiterten Michaelis-Menten-Kinetik mit Produktinhibierung	35

4.3.2	Umsatz von 1,5-Pentandiol als geschwindigkeitsbestimmender Schritt . .	37
4.3.3	Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Aktivitäten	38
4.4	Modellierung	40
4.4.1	Modellsimulation zeigt effiziente Lactonbildung ohne Zwischenproduktak- kumulation	40
4.4.2	Realistische Abbildung der Lactol-Konzentration, δ -Valerolacton erfordert Erweiterung des Modells	42
4.4.3	Erweiterung um Enzyminaktivierung und Hydrolyse verbessert Modellgü- te deutlich	45
4.4.3.1	Langsame Enzyminaktivierung unter Reaktionsbedingungen . .	45
4.4.3.2	Hydrolyse von δ -Valerolacton	46
4.4.3.3	Modellerweiterung durch Enzyminaktivierung und Hydrolyse . .	47
4.4.3.4	Optimierung des Modells durch angepasste Hydrolysekonstante	49
4.5	Cofaktorregenerierung	51
4.5.1	Modell mit Aceton/Isopropanol-Regenerierung nicht valide bei hohen Acetonkonzentrationen	56
4.6	Prozesstechnischer Vergleich	58
4.6.1	Aceton steigerte δ -Valerolactontiter trotz modellierter Inhibitionseffekte . .	58
4.6.2	G37D erreicht unter Prozessbedingungen höhere δ -Valerolactontiter als der Wildtyp	59
4.6.3	GlycinNaOH-Puffer steigert Endtiter gegenüber Kaliumphosphat (KPi)- Puffer	61
5	Diskussion und Ausblick	63
5.1	Kinetische Einordnung der <i>Lb</i> ADH Varianten und Vergleich mit Literaturdaten . .	63
5.1.1	Abweichungen von Literaturwerten bei der Analyse der Modellreaktion . .	63
5.1.2	Vergleich zwischen Modell- und Zielreaktion veranschaulicht Substrat- spektrum der <i>Lb</i> ADH	64
5.1.3	Vergleich der Aktivität der <i>Lb</i> ADH mit Literaturwerten anderer ADHs . . .	65
5.1.4	Bewertung der Aufnahme der kinetischen Parameter	66
5.2	Einordnung der Aussagekraft und Grenzen des entwickelten Modells	67
5.3	Ursache für limitierte Aussagekraft der NADH-basierten Aktivitätsanalyse	68
5.4	Zweiphasensysteme als Strategie zur Produktstabilisierung gegen Hydrolyse . .	70
5.5	Modellbasierte Optimierung und Sensitivitätsanalyse als Grundlage für die Sys- temverbesserung	71
5.6	G37D vielversprechend für andere Katalysatorformen	72
Tabellenverzeichnis		i
Abbildungsverzeichnis		ii
Literaturverzeichnis		ix
A Appendix		x

Symbolverzeichnis

c_i	Konzentration der Komponente i
k_d	Inaktivierungskonstante
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$	Wechselzahl
k_{hyd}	Hydrolysekonstante
$K_{i,j}^{\text{app}}$	apparente Inhibierungskonstante der Komponente j
$K_{i,j}$	Inhibierungskonstante der Komponente j
$K_{m,i}^{\text{app}}$	apparente Michaelis-Menten-Konstante der Komponente i
$K_{m,i}$	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente i
$m_{\text{NAD(P)}}$	Kalibrierfaktor
r_i	Reaktionsrate der Reaktion i
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$V_{f,\text{well}}$	Verdünnungsfaktor im Well
$V_{f,\text{prot}}$	Verdünnungsfaktor der Proteinlösung
$v_{\text{max}}^{\text{app}}$	apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
γ	Gamma
δ	Delta
ϵ	Epsilon

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	bovinem Serumalbumin
BMVO	Baeyer-Villiger Monooxygenase
CE	<i>Crude Extract</i>
CV	Säulenvolumen
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GCMS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
His6-Tag	Polyhistidin-Tag
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KPi	Kaliumphosphat
LB-Agarplatte	<i>lysogeny broth</i> -Agarplatte
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
<i>LbADH</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase
MS	Massenspektrometer
NAD⁺	Nicotinamadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduziert))
NADP⁺	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD	optische Dichte
PBL	Polybutyrolacton
PCL	Polycaprolacton
PVL	Polyvalerolacton
ROP	Ringöffnungspolymerisation
SD	Standartabweichung

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THFA	Tetrahydrofurfurylalkohol
wt	Wildtyp

1 Einleitung und Motivation

Kunststoffe sind aufgrund ihres geringen Gewichts, ihrer Beständigkeit [1] und Langlebigkeit in zahlreichen Anwendungsbereichen weit verbreitet [2]. Diese positiven Eigenschaften stehen jedoch in starkem Kontrast zu den gravierenden Umweltproblemen, die durch Kunststoffe entstehen.

Zum einen sind Kunststoffe nur sehr langsam biologisch abbaubar, was weltweit zu enormen Mengen an Plastikabfällen führt [3]. Diese landen zu 70 % auf Deponien, Müllkippen oder in den Ozeanen, wo sie langfristig verbleiben [3]. Seit 1950 wurden weltweit etwa 9,5 Milliarden Tonnen Kunststoff produziert, von denen lediglich 16 % recycelt wurden [3].

Zum anderen tragen Kunststoffe maßgeblich zu den weltweiten Treibhausgasemissionen bei [4]. Etwa 3,4 % der weltweiten Emissionen gehen auf Kunststoffe zurück, wobei der Großteil bei der Herstellung aus fossilen Rohstoffen entsteht [4]. Im Jahr 2023 belief sich die weltweite Kunststoffproduktion auf 414 Millionen Tonnen, was einem Anstieg von 12 % gegenüber dem Jahr 2018 entspricht [5]. Für das Jahr 2060 wird ein Anstieg auf 1,2 Milliarden Tonnen prognostiziert [3]. Dies verdeutlicht den dringenden Bedarf an nachhaltigen Alternativen, um die Umweltbelastung zu verringern.

1.1 Biokunststoffe

Kunststoffe lassen sich grob in zwei Hauptgruppen unterteilen: Konventionelle Kunststoffe auf fossiler Basis und Biokunststoffe. Letzteres umfassen sowohl nicht biologisch abbaubare Kunststoffe aus biobasierten Rohstoffen, biologisch abbaubare Kunststoffe aus fossilen Rohstoffen als auch biobasierte und biologisch abbaubare Kunststoffe [6, 7]. Diese Einteilung wird in Abbildung 1.1 dargestellt.

Internationale Normen wie ISO und ASTM definieren ein Material als biologisch abbaubar, wenn es unter bestimmten Bedingungen innerhalb von 56 Tagen in wässriger Umgebung beziehungsweise innerhalb von zwei Jahren im Boden vollständig abgebaut wird [8]. Biologisch abbaubare Kunststoffe bieten daher den wesentlichen Vorteil, Umweltverschmutzungen entgegenzuwirken.

Darüber hinaus tragen biobasierte Kunststoffe zur Reduktion des Kohlenstoff-Fußabdrucks bei [9]. Während herkömmliche Kunststoffe wie Polypropylen und Polyethylen einen Kohlenstoff-Fußabdruck von etwa $314 \text{ kg}_{\text{CO}_2} \text{ kg}^{-1}$ aufweisen, liegt dieser bei biobasierten Kunststoffen rechnerisch bei null [10]. Der freigesetzte Kohlenstoff wird innerhalb eines kurzen Zeitraums durch nachwachsende Pflanzen gebunden [10].

	Nicht biologisch abbaubar	Biologisch abbaubar
Fossil-basiert	Konventionelle Kunststoffe (aus fossilen Monomeren) z. B. PE, PP, PS, PET	Biologisch abbaubare Kunststoffe (aus fossilen Monomeren) z. B. PCL, PBAT, PBS
Bio-basiert	Nicht-biologisch abbaubare Kunststoffe (aus bio-basierten Vorstufen) z. B. PE, PVC, PET, PTT, PBT	Biologisch abbaubare Kunststoffe (aus natürlich vorkommenden Polymeren) z. B. Stärkeblends, PLA, PHAs, PBS

Abbildung 1.1: Klassifikation von Kunststoffen nach Herkunft und biologischer Abbaubarkeit. Übersichtliche Einteilung von Kunststoffen anhand ihrer Rohstoffbasis (fossil-basiert vs. bio-basiert) sowie ihrer biologischen Abbaubarkeit. Beispiele zeigen, dass sowohl biologisch abbaubare als auch nicht abbaubare Kunststoffe aus fossilen oder erneuerbaren Quellen stammen können. Adaptierte Darstellung aus [7].

Biokunststoffe sind jedoch nicht nur aufgrund der Umweltfreundlichkeit von Nutzen. Sie weisen zudem eine gute Biokompatibilität und mechanische Festigkeit auf [11]. Bislang werden Biokunststoffe zu einem großen Teil im medizinischen Sektor genutzt. Hier werden sie in Systemen zur Verabreichung von Medikamenten, in Produkten zum Wundverschluss und zur Wundheilung und für Implantate verwendet. Darüber hinaus werden sie als Verpackungsmaterial, für Hochleistungsanwendungen, Abfallsäcke und Lebensmittelbehälter verwendet. [12]

Trotz dieser vielseitigen Einsatzmöglichkeiten bleibt der Anteil von Biokunststoffen an der weltweiten Kunststoffproduktion gering. Im Jahr 2023 wurden rund 2 Millionen Tonnen produziert, was einem Anteil von unter 0,5 % entspricht [13]. Prognosen zufolge soll die Produktion jedoch bis 2029 auf 5,7 Millionen Tonnen steigen [13].

1.2 Polyester

Innerhalb der Gruppe der biologisch abbaubaren Kunststoffe nehmen aliphatische Polyester eine zentrale Rolle ein [14]. Zu dieser Klasse zählen Polybutyrolacton (PBL), Polyvalerolacton (PVL) als auch Polycaprolacton (PCL). Diese Polymere bestehen aus sich wiederholenden Butyrat-, Pentanoat- beziehungsweise Hexanoat-Einheiten [15].

Die Herstellung dieser Polyester kann über verschiedene Syntheseverfahren erfolgen. So lässt sich PCL entweder durch Polykondensation von 6-Hydroxyhexansäure oder mittels Ringöffnungspolymerisation (ROP) von ϵ -Caprolacton gewinnen. Die ROP wird bevorzugt, da sie zu Polymeren mit höherem Molekulargewicht und engerer Polydispersität führt. Bei diesem Verfahren werden cyclische Monomere unter Katalysatoreinsatz geöffnet [15]. Die entsprechenden Monomere für die ROP von PVL und PBL sind δ -Valerolacton beziehungsweise γ -Butyrolacton [16, 17]. Eine Übersicht der ROP ist in Abbildung 1.2 dargestellt. [18]

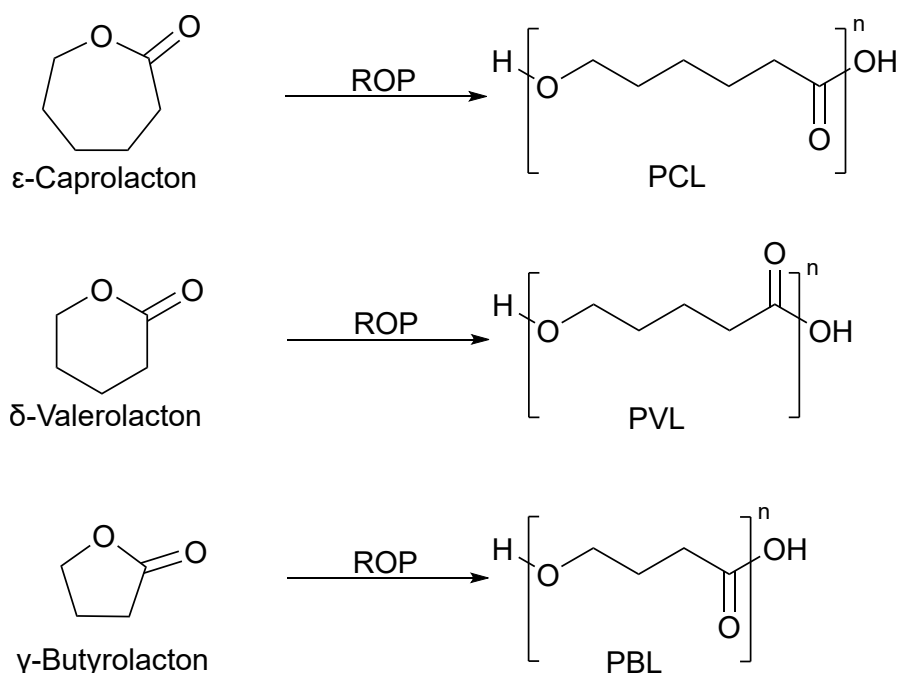


Abbildung 1.2: Übersicht der ROP on ϵ -Caprolacton, δ -Valerolacton und γ -Butyrolacton zu PCL, PVL und PBL.

Darstellung der ROP verschiedener Lactone, einschließlich ϵ -Caprolacton, δ -Valerolacton und γ -Butyrolacton, zur Synthese der entsprechenden Polyester PCL, PVL und PBL. [16–18]

Von den drei zuvor genannten Polylactonen ist PCL der bekannteste Vertreter. Dies liegt sowohl an seinen günstigen Materialeigenschaften als auch an den Herausforderungen bei der Herstellung der beiden anderen Polylactone. PBL galt lange Zeit als nicht polymerisierbar über die ROP von Butyrolacton und stellt auch heute noch eine erhebliche synthetische Herausforderung dar [17, 19]. PVL fand vergleichsweise weniger Beachtung, was teilweise auf die begrenzte Verfügbarkeit fossiler C5-Bausteine für die Monomerherstellung zurückzuführen ist [20].

Die mechanischen, physikalischen und thermischen Eigenschaften werden maßgeblich vom Kristallinitätsgrad und vom Molekulargewicht beeinflusst [18]. PCL ist biokompatibel und kann mit anderen Polymeren gemischt werden. Aufgrund seiner vielseitigen Eigenschaften ist es für eine Anwendung in der Gewebekonstruktion, Arzneimittelverabreichung und Mikroelektronik geeignet [18]. Besonders hervorzuheben ist, dass PCL, wie aliphatische Polyester im Allgemeinen, vollständig bioabbaubar sind [21]. Die Esterbindungen können durch Enzyme wie Lipasen hydrolytisch gespalten werden, wodurch das Polymer in seine Monomere zerfällt [21]. Dank seiner breiten Einsatzmöglichkeiten und der kostengünstigen Herstellung gilt PCL als vielversprechendes Material in der nachhaltigen Kunststofftechnologie [18].

Ein Nachteil von PCL ist jedoch die im Vergleich zu anderen Polyestern relativ langsame Abbaurrate [22]. Dies kann zu Herausforderungen führen, wenn eine schnelle Geweberegeneration oder Materialabsorption erforderlich ist [22]. Um die Eigenschaften von Kunststoffen zu optimieren, hat sich die Copolymerisierung als wirksame Möglichkeit erwiesen. Durch die gezielte Anpassung der Polymerzusammensetzung lassen sich die Materialeigenschaften optimieren [23]. PCL kann unter anderem als Copolymer mit PVL und PBL verwendet werden [24, 25]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Copolymer aus PVL mit PCL eine höhere Abbaurrate aufweist als reines PCL [23].

Die für die Synthese, der in Abbildung 1.2 dargestellten Polylactone, benötigten Monomere lassen sich über verschiedene Wege gewinnen. Dazu zählen die Veresterung von Hydroxycarbonsäuren [26], die Baeyer-Villiger-Oxidation cyclischer Ketone mit Wasserstoffperoxid [27] sowie die oxidative Lactonisierung von Diolen [28]. Für jede dieser Routen existieren auch biokatalytische Alternativen. So kann die Veresterung durch Lipasen [29], die Baeyer-Villiger-Oxidation durch Baeyer-Villiger Monooxygenases (BMVOs) [29] und die Lactonisierung von Diolen durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) [30] katalysiert werden.

Während die BMVO eine der bekanntesten biokatalytischen Optionen darstellt, ist ihre Anwendung mit mehreren Nachteilen verbunden [31]. Dazu zählen ihre geringe Stabilität [18], Produkt- und Substratinhibition sowie der Bedarf an reduzierten Cofaktoren, was eine zusätzliche Cofaktorregeneration erfordert [31]. Eine vielversprechende Alternative sind ADHs, die die oxidative Lactonisierung von Diolen katalysieren [31]. Diese zeichnen sich durch hohe katalytische Effizienz und Selektivität aus und ermöglichen enantioselektive Oxidationen unter milden Bedingungen [32].

Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird das Diol in Gegenwart von NAD(P)^+ zum entsprechenden Hydroxyaldehyd oxidiert, welches sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungen im Gleichgewicht mit dem cyclischen Lactol steht. Im zweiten Schritt erfolgt die Oxidation des Lactols zum Lacton, ebenfalls unter Verbrauch von NAD(P)^+ . Beide Schritte können vom selben Enzym, zum Beispiel der *horse liver* ADH [31] oder der *Lactobacillus kefir* ADH [33], katalysiert werden. Dieser Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.3 dargestellt. [30]

Die für diese Reaktion notwendigen Substrate lassen sich aus fossilen Ausgangsmaterialien herstellen. So kann 1,5-Pentandiol aus Glutarsäure hergestellt werden, einem Nebenprodukt der Adipinsäure-Synthese [20]. Da die fossilbasierten Verfahren jedoch teuer sind [20], wird an weiteren Produktionsmöglichkeiten für 1,5-Pentandiol gearbeitet. Eine Möglichkeit ist die Herstellung aus Tetrahydrofurfurylalkohol (THFA). Dieses kann über Furfural aus Hemicellulosen hergestellt werden [20]. Der Vorteil aus der Verwendung von Biomasse ist der reichhaltige

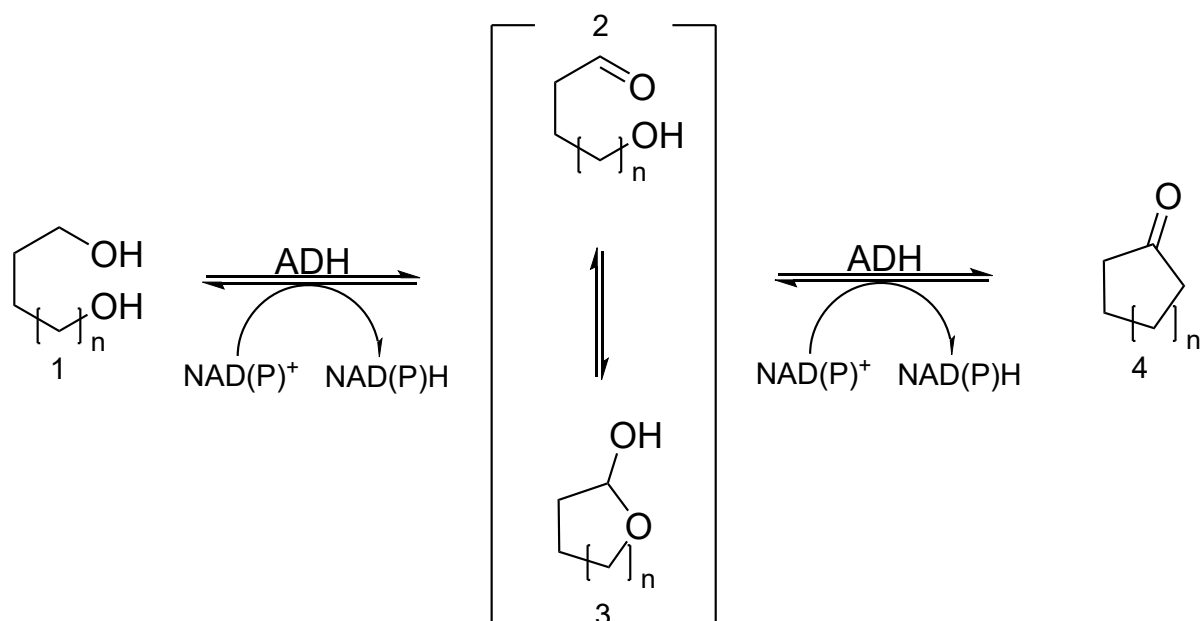


Abbildung 1.3: Oxidative Lactonisierung von Diolen.

Dargestellt ist die von einer ADH katalysierte Reaktion von Alkandiolen (1) zum dementsprechenden Hydroxyaldehyd (2) und die anschließende Reaktion vom Lactol (3) zum Lacton (4). Beide Reaktionen verlaufen unter NAD(P)^+ Verbrauch. [31]

Gehalt an C5 Rohstoffen [20]. Diese Syntheseroute führt jedoch über das in Abbildung 1.3 beschriebene Zwischenprodukt δ -Hydroxyvaleraldehyd [34]. Die Reduktion des Aldehyds zum Alkandiol mit anschließender Reoxidation durch die ADH erscheint nicht als optimaler Reaktionsweg. Die Entwicklung zu Eintopfverfahren, welche in der Lage sind sowohl THFA zu 1,5-Pentandiol als auch Tetrahydrofuran-2,5-dimethanol zu 1,6-Hexandiol umzusetzen, scheint jedoch vielversprechend [35, 36]. Dies macht Cellulosen als auch Hemicellulosen zu interessanten Präkursoren von Alkandiolen. Eine weitere Möglichkeit ist die Produktion von Präkursoren, wie Glutarsäure, durch Fermentation [37]. Dies zeigt die vielseitigen Möglichkeiten nachwachsende Rohstoffe zu nutzen.

Aufgrund ihrer Bioabbaubarkeit, der Herstellung aus nachwachsenden Rohstoffen sowie ihrer vielseitigen Einsatzmöglichkeiten stellen Polylactone wie PBL, PVL und PCL eine attraktive Alternative zu konventionellen, fossilen Kunststoffen wie Polyethylen dar.

1.3 *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase

Die ADH aus *Lactobacillus brevis* (E.C.1.1.1.2) gehört zu der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) [38]. Es handelt sich um ein Homotetramer, dessen identische Untereinheiten jeweils eine molekulare Masse von 26.627 Da aufweisen und aus 251 Aminosäuren bestehen. Jede Untereinheit verfügt über eine Cofaktor-Bindetasche sowie ein aktives Zentrum.

Das vollständige Tetramer enthält zudem zwei Bindestellen für Magnesiumionen (Mg^{2+}), die entscheidend zur Enzymaktivität beitragen. Sowohl die quartäre Struktur als auch die Lage der Cofaktor- und Substrat-Bindetaschen sind in Abbildung 1.4 dargestellt. [39, 40]

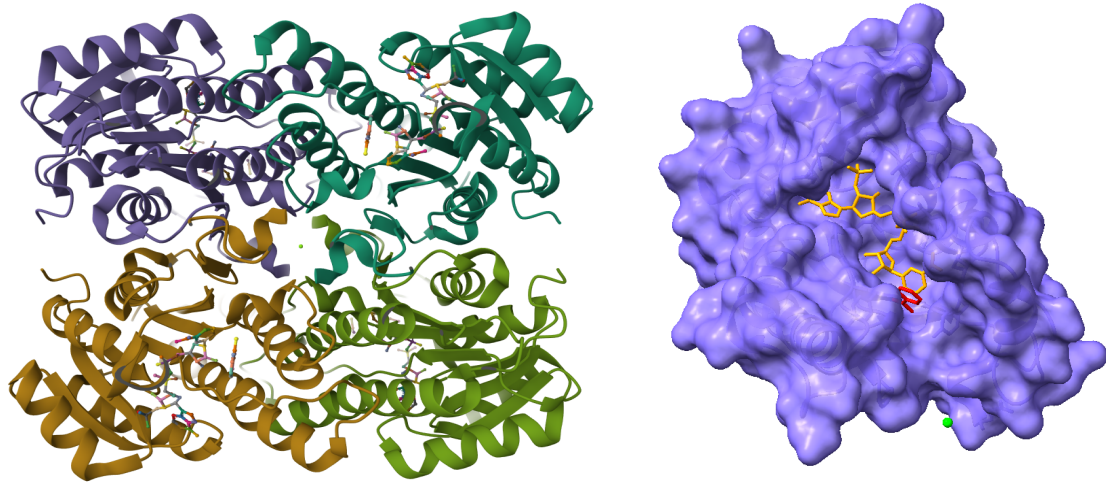


Abbildung 1.4: Quartär und tertiär Struktur der *LbADH*.

Dargestellt sind die quartär Struktur (links) und die tertiär Struktur (rechts) der *LbADH*. Die quartär Struktur verdeutlicht die Anordnung der Untereinheiten mit den Mg-Ionen im Zentrum. Die tertiär Struktur zeigt die Bindetaschen vom Cofaktor (gelb) und dem Modellsubstrat Acetophenon (rot), adaptiert aus der Kristallstruktur (1NXQ) [41].

Die räumliche Nähe zwischen Cofaktor- und Substratbindungstasche lässt vermuten, dass eine koordinierte Interaktion während der Katalyse stattfindet. Die Mg^{2+} -Ionen selbst befinden sich jedoch in zu großer Entfernung vom aktiven Zentrum, um direkt in die Reaktion einzugreifen. Stattdessen wird ein struktureller oder elektrostatischer Einfluss angenommen, der die Konformation des Enzyms stabilisiert und so die Katalyse indirekt begünstigt [39].

Der Wildtyp der *LbADH* zeigt eine klare Präferenz für den phosphorylierten Cofaktor NADP(H). Für industrielle Anwendungen ist jedoch der nicht-phosphorylierte Cofaktor NAD(H) deutlich attraktiver, da er kostengünstiger, stabiler und besser verfügbar ist. Um diese Präferenz gezielt zu verändern, wurden Varianten der *LbADH* entwickelt, die eine NAD(H)-Abhängigkeit aufweisen. [39]

Einen experimentellen Ansatz verfolgten Schlieben et al. (2005), die durch den Vergleich mit anderen NAD(H)-abhängigen SDRs drei Aminosäuren identifizierten, die für die Cofaktorspezifität verantwortlich sind. Dabei zeigte sich, dass ein Aspartat in der Cofaktor-Bindetasche eine entscheidende Rolle für die NAD-Präferenz spielt. Im Wildtyp der *LbADH* befindet sich an dieser Stelle ein Glycin (Gly37), welches in dieser Variante durch ein Aspartat ersetzt wurde. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit G37D auf diese Variante

verwiesen. Der Austausch führt dazu, dass NADP(H) aufgrund sterischer Hinderung und elektrostatischer Abstoßung schlechter bindet, während NAD(H) durch die negativ geladene Aspartat-Seitenkette begünstigt wird. Der Vergleich der Bindetasche zwischen Wildtyp und der Variante G37D ist in Abbildung 1.5 dargestellt. [39]

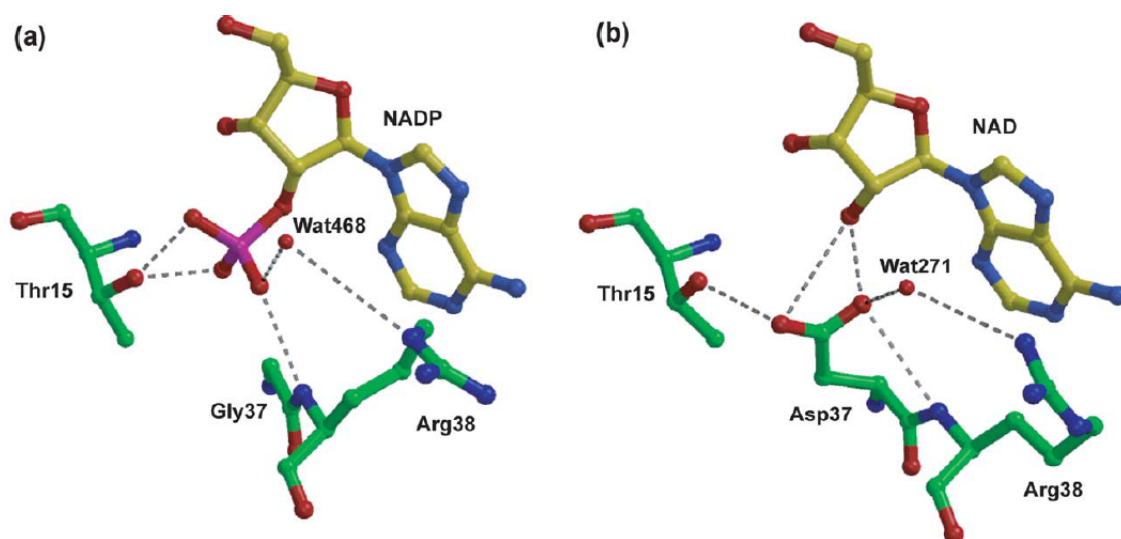


Abbildung 1.5: Vergleich der Cofaktorbinding zwischen Wildtyp und der Variante G37D.

Die Abbildung zeigt die Bindung von NADP an den Wildtyp (a) und die Bindung von NAD mit der Variante G37D (b) der *Lb*ADH. Entnommen aus [39].

Einen weiteren Ansatz verfolgten Machielsen et al. (2009), die ein computergestütztes Verfahren zur Vorhersage geeigneter Mutationen nutzten. Eine vielversprechende Variante entstand durch den Austausch von Arginin 38 gegen Prolin. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf mit R38P auf diese Variante verwiesen. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Phosphatgruppe des NADP(H) wird in diesem Fall verhindert. Gleichzeitig wird der strukturelle Hohlraum, der bei NAD(H) durch das Fehlen der Phosphatgruppe entsteht, gefüllt. Dadurch wird NAD(H) bevorzugt gebunden. [42]

Die *Lb*ADH verfügt über mehrere wichtige Eigenschaften, welche sie zu einem vielseitigen Biokatalysator machen. Auf der einen Seite handelt es sich bei der *Lb*ADH um ein sehr robustes Enzym. Es zeigt Stabilität sowohl bei erhöhter Temperatur als auch Toleranz für organische Lösemittel [43]. Auf der anderen Seite bietet die *Lb*ADH ein breites Substratspektrum. Sie wird oft für die asymmetrische Reduktion prochiraler Ketone verwendet. Ketone, die eine kleine Alkylgruppe als einen Substituenten und eine sperrigen Gruppe, beispielsweise einen aromatischen Ring, als anderen Substituenten aufweisen, dienen als bevorzugtes Substrat. Vor diesem Hintergrund wird die Reduktion von Acetophenon zu Phenylethanol häufig als

Modellreaktion für das Enzym herangezogen [39]. Eine Übersicht über das Substratspektrum bietet Abbildung 1.6. [40, 44]

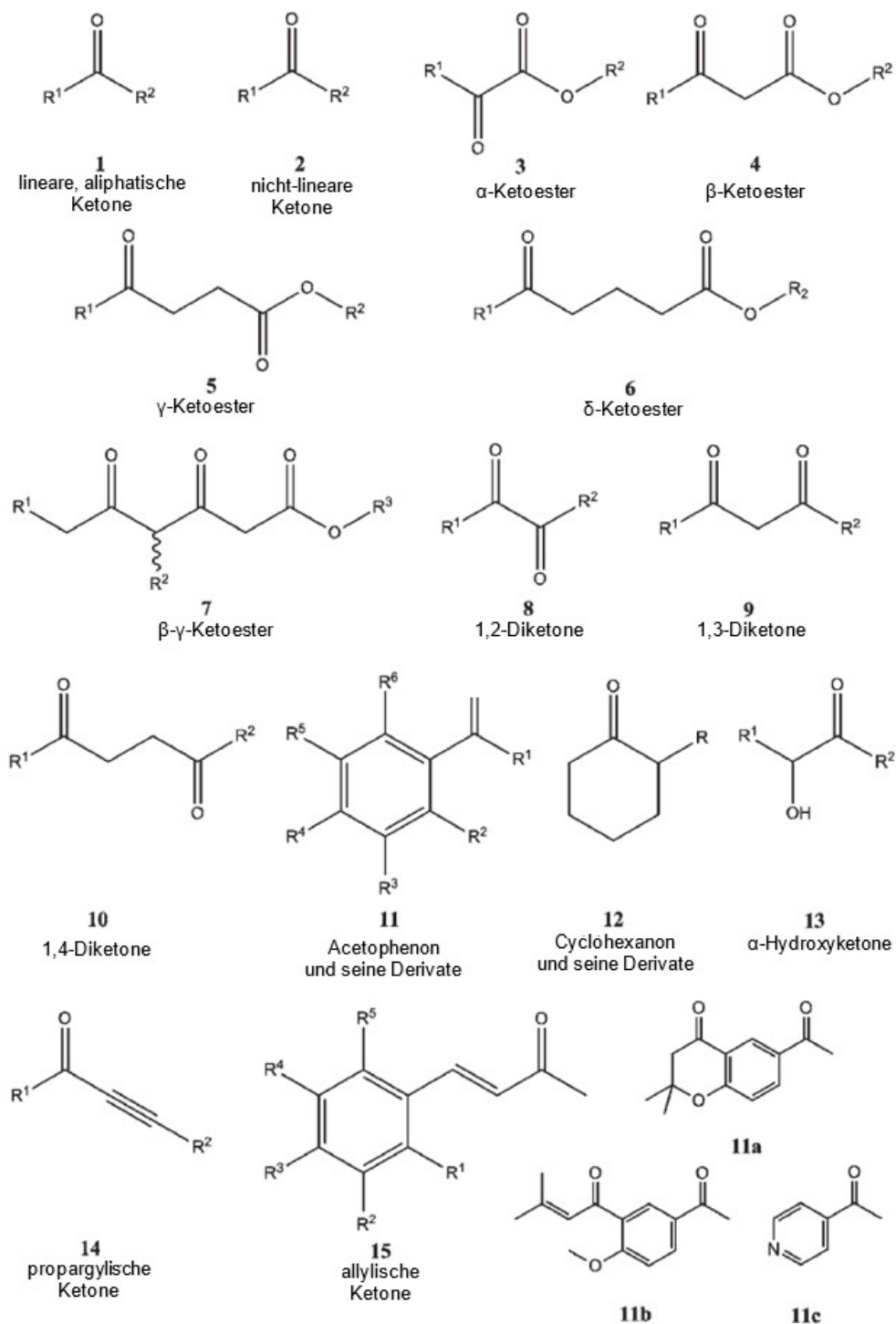


Abbildung 1.6: Substratspektrum der LbADH.

Zusammenfassung der von einer LbADH präferierten Substrate. Dieses Spektrum reicht über lineare aliphatische Ketone bis zu Cyclohexanon und seinen Derivaten. Übernommen aus [44].

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die *Lb*ADH auch in der Lage ist, lineare Dirole umzusetzen [45]. Zusammen mit den zuvor geschilderten Eigenschaften macht dies die *Lb*ADH zu einem interessanten Enzym für die oxidative Lactonisierung.

1.4 Enzymkinetik

Viele enzymkatalysierte Reaktionen beruhen auf der Umsetzung von zwei Substraten. Ein typisches Beispiel ist die Beteiligung eines Cofaktors wie NAD^+ oder Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert) (NADH) an oxidoreduktiven Reaktionen. Das klassische Michaelis-Menten-Modell reicht zur Beschreibung solcher Prozesse nicht mehr aus. Stattdessen kommen erweiterte kinetische Modelle zum Einsatz, die beide Substrate gleichzeitig berücksichtigen. [46, 47]

Im einfachsten Fall, unter Vernachlässigung von Inhibierungen und komplexen Bindungsmechanismen, kann die Reaktionsgeschwindigkeit v durch eine erweiterte Form der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden (siehe Gleichung 1.1) [47]:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{(K_{m,A} + [A]) \cdot (K_{m,B} + [B])} \quad (1.1)$$

Dabei steht v_{\max} für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit beiden Substraten. Die Größen $[A]$ und $[B]$ bezeichnen die Konzentrationen der Substrate, während $K_{m,A}$ und $K_{m,B}$ die jeweiligen Michaelis-Menten-Konstanten darstellen. [47]

Obwohl das Verhalten von Zwei-Substrat-Systemen im Detail komplex ist, erlaubt diese vereinfachte Gleichung bereits eine realitätsnahe Beschreibung vieler biokatalytischer Reaktionen [47].

Reicht diese Näherung jedoch nicht aus, müssen mechanistische Modelle berücksichtigt werden. Dabei wird in der Enzymkinetik zwischen geordneten und zufälligen Bindungsmechanismen unterschieden. Diese unterscheiden sich in der Reihenfolge, in der die Substrate an das Enzym binden. [47]

Ein Beispiel für einen geordneten Mechanismus ist der sogenannte *Theorell-Chance-Mechanismus*. Dieser ist für viele Dehydrogenasen, darunter auch Alkoholdehydrogenasen, charakteristisch. Hierbei bindet das Enzym zunächst den Cofaktor (z. B. NAD^+), bevor das zweite Substrat gebunden wird. Nach der katalytischen Umsetzung werden Produkt und reduzierter Cofaktor ebenfalls in festgelegter Reihenfolge freigesetzt. Im Gegensatz zu anderen sequentiellen Mechanismen wird dabei kein stabiler ternärer Komplex aus Enzym und beiden Substraten oder Produkten angenommen. Eine schematische

Darstellung des *Theorell-Chance-Mechanismus* in Cleland-Notation ist in Abbildung 1.7 dargestellt. [47, 48]

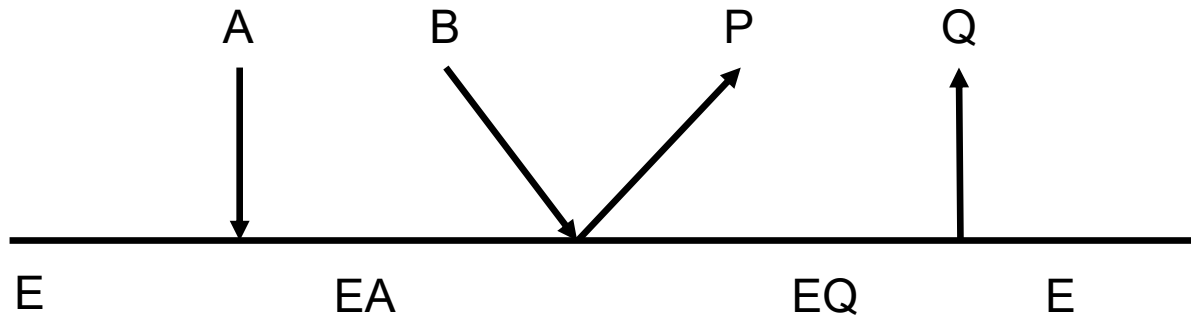


Abbildung 1.7: Theorell-Chance-Mechanismus bei Zwei-Substrat-Reaktionen.

Dieser Mechanismus beschreibt eine geordnete, sequentielle Reaktion, bei der das Enzym zunächst A bindet, anschließend B, und schließlich P sowie Q wieder freigesetzt werden. Eine ternäre Komplexbildung wird dabei nicht angenommen. EA und EQ stellen Enzym-Substrat und Enzym-Produkt Komplexe dar. Adaptiert aus [49].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Modellierung zunächst die vereinfachte Form der Zwei-Substrat-Kinetik verwendet, um eine grundlegende Abschätzung der Reaktionsdynamik zu ermöglichen. Eine Erweiterung um komplexere Mechanismen bleibt späteren Modellierungsansätzen vorbehalten.

2 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung und Modellierung der *LbADH*-katalysierten oxidativen Lactonisierung von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton in wässrigem Puffer-Reaktionssystem. Hierzu wurden zunächst neben dem Wildtyp-Enzym zwei Literatur-bekannte Mutanten untersucht. Diese wurden insbesondere hinsichtlich ihrer Cofaktorpräferenz in Bezug auf die Zielreaktion miteinander verglichen. Die auf dieser Grundlage identifizierte Variante wurde anschließend detailliert charakterisiert.

Für diese Variante wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das auf den experimentell ermittelten Michaelis-Menten-Kinetiken der Teilreaktionen sowie einem differentiellen Gleichungssystem basiert. Zusätzlich wurde sowohl eine Enzyminaktivierung als auch eine Hydrolyse des Produkts berücksichtigt. Dieses Modell diente zur Simulation der zeitlichen Konzentrationsverläufe der Reaktanten.

Um die Cofaktoreffizienz zu erhöhen, wurde zusätzlich ein System zur Cofaktorregenerierung in das Modell integriert. Eine schematische Darstellung des erweiterten Reaktionssystems inklusive Regenerierungsweg zeigt Abbildung 2.1.

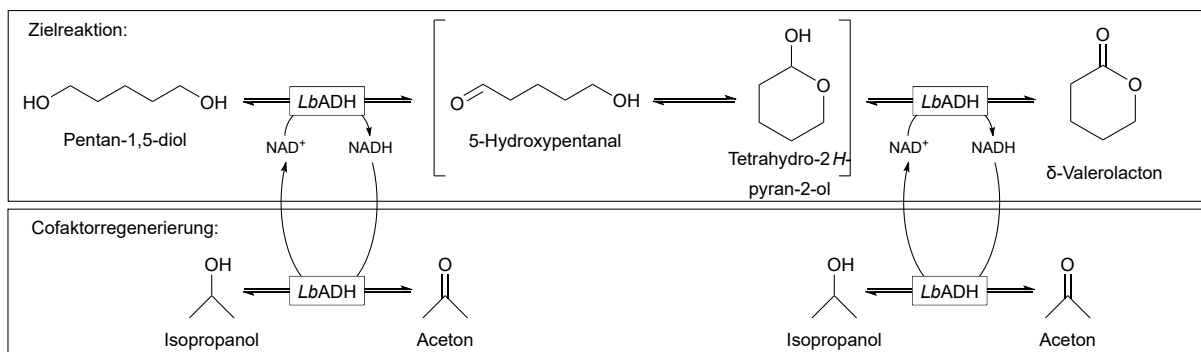


Abbildung 2.1: Erweiterte Reaktionsgleichung mit Cofaktorregenerierungssystem.

Zur Verbesserung der Cofaktoreffizienz wird NADH durch ein gekoppeltes Regenerationssystem wieder zu NAD⁺ umgesetzt.

Neben der Modellierung und Variantenanalyse lag ein besonderer Fokus auf der experimentellen Validierung des Reaktionsmodells anhand von Konzentrationsverläufen aus *in vitro* Ansätzen.

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Mikroorganismen und Plasmide sowie die angewandten Methoden detailliert beschrieben.

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) sowie der Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und jeweils in höchstmöglicher Reinheit eingesetzt.

3.2 Medien und Lösungen

Für die initialen Kultivierungsschritte wurde *lysogeny broth*-Medium (LB-Medium) verwendet. Die temporäre Lagerung der Stämme erfolgte auf einer *lysogeny broth*-Agarplatte (LB-Agarplatte), welche durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar-Agar zum angesetzten LB-Medium hergestellt wurde.

Spätere Kultivierungsschritte erfolgten in LB-Medium. Die heterologe Proteinexpression wurde durch Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Lösungen und ihrer Zusammensetzung ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Lösungen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Quelle
LB-Medium	10 g L ⁻¹ Trypton, 5 g L ⁻¹ Hefeextrakt, 10 g L ⁻¹ NaCl, Kan ⁵⁰	[50]
LB-Agarplatte	10 g L ⁻¹ Trypton, 5 g L ⁻¹ Hefeextrakt, 10 g L ⁻¹ NaCl, 15 g L ⁻¹ Agar-Agar, Kan ⁵⁰	[50]
KPi-Puffer	50 mM KPi, 1 mM Magnesiumchlorid, pH 5,0-8,0	Diese Arbeit
GlycinNaOH-Puffer	50 mM Glycin, NaOH (abhängig vom pH-Wert), 1 mM Magnesiumchlorid, pH 8,0-10,5	Diese Arbeit
Lagerpuffer-Puffer	100 mM KPi, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 % (v/v) Glycerol pH 7,4	Diese Arbeit

Um Kontaminationen vorzubeugen, wurden alle Medien für 20 min bei 121 °C autoklaviert (Laboklav 55-195, SHP Steriltechnik AG, Deutschland). Hitzeempfindliche Substanzen, wie Antibiotika oder IPTG, wurden nachträglich durch sterile Filtration zugegeben.

3.3 Stämme und Plasmide

Die Gene, die für die ADHs kodieren, wurden mit einem N-terminalen Polyhistidin-Tag (His6-Tag) sowie einer kurzen Spacer-Sequenz aus Aminosäuren versehen, um die spätere Proteinreinigung über eine entsprechende Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Zusätzlich wurde die DNA für die Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) optimiert und in das Plasmid pET28a(+) kloniert. Der Stamm BL21 wurde mit den fertigen Plasmiden transformiert und die entsprechenden Arbeitsstämme wurden durch Julian Handke bereitgestellt.

Für die in vivo-Proteinsynthese wurde *E. coli* BL21 (DE3) eingesetzt, da dieser Stamm das Gen für die T7-RNA-Polymerase trägt. Dadurch ist die Expression heterologer Gene unter Kontrolle eines T7-Promotors durch Zugabe von IPTG induzierbar. Die Lagerung der Plasmide erfolgte in *E. coli* DH5 α , da dieser Stamm eine hohe Plasmidstabilität bietet.

Eine Übersicht der verwendeten Stämme ist Tabelle 3.2 zu entnehmen, während Tabelle 3.3 die eingesetzten Plasmide auflistet.

Tabelle 3.2: Auflistung der verwendeten Stämme.

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdSB(rB ⁻ mB ⁻), gal (c1875, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene1), dcm (DE3)	[51]
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi 1, gyrA96, relA1	[52]

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Zielprotein	Referenz
pET28a(+)_His-GSG-LbADH_wt	LbADH Wildtyp	Bereitgestellt durch Julian Handke
pET28a(+)_His-GSG-LbADH_G37D	LbADH Variante G37D	Bereitgestellt durch Julian Handke
pET28a(+)_His-GSG-LbADH_R38P	LbADH Variante R38P	Bereitgestellt durch Julian Handke

Die gezeigten Varianten wurden durch Einzelpunktmutationen im Wildtyp hergestellt und ebenfalls durch Julian Handke bereitgestellt.

3.4 *In vivo* Proteinsynthese und Aufreinigung

Für die Proteinsynthese der *LbADH* wurde *E. coli* BL21 (DE3) eingesetzt, welches je ein Plasmid pET28a(+)_His-GSG-LbADH_wt, pET28a(+)_His-GSG-LbADH_G37D oder pET28a(+)_His-GSG-LbADH_R38P trug. Als Kulturmedium diente das in Tabelle 3.1 beschriebene LB-Medium.

Nach der Kultivierung der Zellen (siehe Abschnitt 3.4.1) erfolgte jeweils ein Zellaufschluss (siehe Abschnitt 3.4.2.1) sowie, falls erforderlich, eine Proteinaufreinigung mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) (siehe Abschnitt 3.4.2.2).

3.4.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten, die mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin supplementiert waren. Eine Probe der Kryokultur wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine einzelne Kolonie zur Anzucht einer Vorkultur verwendet.

Die Vorkultur wurde in 10 mL LB-Medium mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen angesetzt und über Nacht bei 37°C , 200 rpm und 2,5 cm Auslenkung auf dem INFORS HT Orbitron inkubiert. Alternativ konnte die Beimpfung der Vorkultur direkt mit einer Probe aus der Kryokultur erfolgen.

Für die Hauptkultur wurden 100 mL LB-Medium mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin in einem 1 L Schüttelkolben mit Schikanen verwendet. Die Inokulation erfolgte mit 1 % (v/v) der Vorkultur. Die Bestimmung der OD_{600} erfolgte mithilfe eines UV/Vis-Spektrophotometers (Libra S11, Biochrom). Die Kultur wurde bei 30°C , 200 rpm und 2,5 cm Auslenkung auf dem INFORS HT Orbitron inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht wurde.

Anschließend wurde 1 mM IPTG zugegeben, und die Inkubation wurde bei 30°C und 200 rpm für weitere 24 Stunden fortgesetzt.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 3220 g, 4°C für 20 min. Die resultierenden Zellpellets wurden gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.4.2 Proteinaufreinigung

Die Zusammensetzung der Puffer, die für die Aufreinigung der *LbADH* verwendet wurden, basiert auf der Anleitung für die HisTrap™ FF crude 1 mL Säule (Cytiva, Marlborough, USA) und ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Puffer zur Proteinaufreinigung.

Puffer	Komponenten	pH
Bindepuffer	20 mM Natriumphosphat, 500 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, 1 mM Magnesiumchlorid	7,4
Elutionspuffer	20 mM Natriumphosphat, 500 mM Natriumchlorid, 500 mM Imidazol, 1 mM Magnesiumchlorid	7,4

3.4.2.1 Zellaufschluss

Die eingefrorenen Zellpellets wurden zunächst in 10 mL Bindepuffer pro Gramm Zellpellet resuspendiert und die Suspensionen anschließend in einem 50 mL Falcon-Tube zusammengeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe eines Hochdruck-Homogenisators (CF1 Cell Disruptor, Constant Systems) bei 20 000 psi im *One-Shot* Modus. Es wurde lediglich ein Zyklus durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20 000 g und 4 °C für 30 min. Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung abgenommen.

3.4.2.2 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie

Die IMAC wurde zur Aufreinigung der Zielproteine eingesetzt. Die exprimierte *LbADH* wurde über ihren His6-Tag an eine mit Nickel-Ionen beladene HisTrap™ Säule (Cytiva, Marlborough, USA) gebunden, um sie von anderen Proteinen zu trennen. Die His6-Tags bilden mit den Nickel-Ionen Chelatkomplexe, wodurch eine spezifische Bindung der Zielproteine an die Säule ermöglicht wird. Während des Waschschriffs verbleiben die gebundenen Proteine in der Säule, während unspezifisch gebundene Proteine ausgewaschen werden.

Zu Beginn wurde die IMAC mit 10 Säulenvolumen (CV) Bindepuffer vorbehandelt, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule mit dem Zelllysats, welches die Zielproteine enthielt, beladen und erneut mit 10 CV Bindepuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch einen linearen Gradienten durch zunehmende Konzentration des Elutionspuffer in 1 mL-Fractionen von der Säule eluiert. Zur Reinigung der Säule nach dem Elutionsschritt wurde sie nochmals mit 10 CV Bindepuffer sowie 10 CV Wasser gewaschen. Die Lagerung der Säule erfolgte in 20 % (v/v) Ethanol.

Die Fractionen wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) auf ihre Reinheit überprüft. Die Proteinkonzentrationen relevanter Fractionen wurden durch den Bradford Protein Assay bestimmt.

Im Anschluss an die IMAC wurde das Eluat mithilfe einer PD-10 Entsalzungssäule (Cytiva) gemäß dem Herstellerprotokoll entsalzt. Zu Entsalzung diente der Puffer, welcher auch für

die Lagerung der Proteinlösung verwendet wurde. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des KPi-Puffers zur Lagerung der Proteinlösung.

Komponente	Konzentration
KPi-Puffer	50 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Glycerol	10 % (v/v)
pH	7,4

Für die Langzeitlagerung der Proben wurde ein Gefrierschrank mit einer Betriebstemperatur von -70°C verwendet.

3.5 Analytische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Analysemethoden eingesetzt, um Informationen über die Synthese und Aktivität der *LbADH* zu gewinnen. Dabei wurde sowohl die Zellsuspension als auch die aufgereinigte Enzymlösung untersucht. Die Proteinkonzentration der aufgereinigten *LbADH*-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Auch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte photometrisch mittels eines Aktivitäts-Assays. Die Konzentrationen von Substraten und Produkten wurden mithilfe der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GCMS) analysiert.

3.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung verschiedener Proteine wurde die SDS-PAGE nach dem Protokoll von Laemmli (1970) [53] durchgeführt. Die Bestandteile der Gele (siehe Tabelle 3.6) wurden entsprechend zusammen pipettiert. Die Starter der Polymerisation, Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED), wurden erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben.

In dieser Arbeit wurde ein Trenngel mit 12 % Acrylamid eingesetzt. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und die Oberfläche zur Glättung mit Isopropanol überlagert. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, und das Sammelgel über dem Trenngel aufgetragen.

Das gegossene Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer (siehe Tabelle 3.7) aufgefüllt. Die Proben wurden im Verhältnis 3:7 mit Ultrapure-Wasser verdünnt.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung für je zwei Sammel- und Trenngelen (12 % Acrylamid) für die SDS-PAGE.

Komponente	Sammelgel	Trenngel (12 %)
30 % Acrylamidlösung	0,6 mL	4,0 mL
0,5 M TRIS (pH 6,8)	1,25 mL	–
1,5 M TRIS (pH 8)	–	2,5 mL
H ₂ O	3,05 mL	3,35 mL
10 % SDS	0,05 mL	0,1 mL
10 % APS-Lösung	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL

Anschließend wurde die gleiche Menge zweifachkonzentrierter Ladepuffer (siehe Tabelle 3.7) zugegeben. Die Mischung wurde bei 95 °C für 5 min inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren.

Nach einer kurzen Zentrifugation bei 13 000 rpm für 2 min wurden jeweils 10 µL der Proben in die Probetaschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µL eines Proteinmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.) als Größenreferenz geladen.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Lauf- und Ladepuffer für die SDS-PAGE.

Laufpuffer	
Tris-HCl	50 mM
Glycin	384 mM
SDS	0,1 % w/v
pH	8,5
Ladepuffer	
Tris-HCl	100 mM
Glycerol	20 %
SDS	4 %
DTT	200 mM
Bromphenolblau	0,2 % w/v
pH	6,8

Nach einer kurzen Zentrifugation bei 13 000 rpm für 2 min wurden jeweils 10 μL der Proben in die Probetaschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurden 5 μL eines Proteinmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.) als Größenreferenz geladen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer Spannung von 80 V durchgeführt, bis sich die Lauffront am unteren Rand des Sammelgels gesammelt hatte. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Gelelektrophorese für etwa 50 min fortgesetzt, bis die Lauffront das Trenngel vollständig durchlaufen hatte.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der Färbelösung für die SDS-PAGE.

Komponente	Konzentration
Coomassie Brilliantblau G250	2 mM
Methanol	0,55 % v/v
Essigsäure	0,01 % v/v

3.5.2 Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte mittels Bradford-Assay nach dem Protokoll von Bradford (1976) [54]. Der in der Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 (siehe Tabelle 3.9) liegt im sauren Milieu zunächst in seiner kationischen Form vor. Durch die Bindung an basische und hydrophobe Aminosäurenreste des Proteins geht der Farbstoff in seine anionische Form über, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Bradford-Reagenz zur photometrischen Proteinbestimmung.

Komponente	Konzentration
Coomassie-Brillantblau G250	150 mg L^{-1}
Orthophosphorsäure (85 % v/v)	100 mg L^{-1}
Ethanol	50 mg L^{-1}

Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wurde eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 0,1 mg mL^{-1} bis 2 mg mL^{-1} als Standard vorbereitet. Von jeder BSA-Probe sowie den zu analysierenden Proteinproben wurden jeweils 5 μL in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 250 μL Bradford-Reagenz zugegeben und die Mischung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm mithilfe eines Microplate Readers (FLUOstar® Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Die Proteinkonzentrationen der unbekannten Proben wurden anhand der gemessenen Extinktionen und der aus den BSA-Standards erstellten Kalibriergerade bestimmt.

3.5.3 Aktivitäts-Assay

Ein Aktivitäts-Assay dient der quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität, die als die umgesetzte Substratmenge pro Zeiteinheit definiert ist. Diese Kenngröße gibt Aufschluss über die katalytische Leistungsfähigkeit eines Enzyms und wird üblicherweise in Units pro Milligramm Protein (U mg^{-1}) angegeben. Eine Unit (U) entspricht dabei derjenigen Enzymmenge, die 1 μmol Substrat pro Minute umsetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Umsatz von Nikotinamidadenindinukleotid-Cofaktoren verfolgt, da die reduzierte Form eine charakteristische Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm aufweist. Die Änderung der Extinktion bei dieser Wellenlänge steht in direktem Zusammenhang mit der Konzentrationsänderung des jeweiligen Cofaktors und lässt sich zuverlässig photometrisch bestimmen.

Für die Durchführung der Aktivitäts-Assays wurden transparente 96-Well-Mikrotiterplatten mit F-Boden (Greiner Bio-One™, Kremsmünster, Österreich) in Kombination mit dem FLUOstar® Plate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Messeinstellungen sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: Einstellungen für die Absorptionsmessung mit dem FLUOstar® Plate Reader.

Parameter	Wert
Exzitationswellenlänge [nm]	340 nm
Anzahl Flashes	5
Scan-Modus	Spiral scan
Scan-Durchmesser [mm]	6 mm
Schütteln	-

Die Messung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 30 °C. Vor Beginn der Messung wurde das Reaktionsgemisch zunächst für 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym zugegeben und das Reaktionsgemisch mithilfe einer Eppendorf Xplorer® Plus 8-Kanal-Pipettierhilfe gemischt. Die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 3.11 dargestellt.

Tabelle 3.11: Einstellungen der Eppendorf Xplorer® Plus 8-Kanal-Pipettierhilfe für die Reaktionsmischung.

Parameter	Wert
Modus	Pipetting + Mix
Volumen	170 µL
Mischvolumen	140 µL
Geschwindigkeit	5
Zyklen	3

3.5.3.1 Reaktionsgemisch

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitäts-Assay wurden verschiedene Reaktionsgemische verwendet. Zum einen wurden zwei verschiedene Puffer verwendet. Durch die Verwendung von sowohl KPi als auch GlycinNaOH-Puffer konnte ein großer pH-Bereich abgedeckt werden. Zum anderen wurden verschiedene Substrate und Kosubstrate verwendet. Die einzelnen Stammlösungen von Substrat, Cofaktor und auch Enzymlösung wurden im jeweils verwendeten Puffer angesetzt. Eine Übersicht der Zusammensetzung der Reaktionsgemische ist in Tabelle 3.12 gezeigt. Insgesamt hat das Reaktionsgemisch ein Volumen von 200 µL.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für den Aktivitätsassay.

Komponente	Konzentration
Puffer	50 mM
Substrat	0 mM - 1000 mM
Cofaktor	0 mM - 8 mM
Enzymlösung	20 µL

Die Enzymkonzentration wurde jeweils so angepasst, dass in der initialen Phase der Reaktion, mindestens innerhalb der ersten Minute, ein linearer Anstieg der Absorption gewährleistet war. Die vollständigen Zusammensetzungen der Reaktionsansätze sind den jeweiligen Versuchen zu entnehmen.

3.5.3.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung wurde für NADH und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert) (NADPH) in Abwesenheit jeglicher Substrate durchgeführt. Für beide Stoffe

wurden Verdünnungsreihen von 0 mM bis 0,6 mM angesetzt. Die Proben wurden in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit einer Multipipette gründlich durchmischt. Für beide Kalibriergeraden wurden technische Dublikate gemessen.

Die Absorption bei 340 nm (OD_{340}) wurde in einer transparenten 96-Well Mikrotiterplatte mit F-Boden (Greiner Bio-One™, Kremsmünster, Österreich) unter Verwendung des FLUOstar® Plate Readers gemessen. Die Einstellungen des Plate Readers für die Messungen entsprechen denen des Aktivitäts-Assays und sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Die ermittelten Absorptionen wurden gegen die NADH/NADPH-Konzentrationen aufgetragen und mithilfe einer Trendlinie korreliert. Die Kalibriergeraden sind in Abbildung A.1 dargestellt.

3.5.3.3 Aktivitätsbestimmung

Zur Umrechnung der Extinktionsänderung in eine Stoffmengenkonzentration wurde zuvor eine Kalibrierung mit bekannten Konzentrationen der jeweiligen reduzierten Form des Nikotinamidadenindinukleotid-Cofaktors durchgeführt (siehe Abbildung A.1). Aus der linearen Regression dieser Kalibrierreihe wurde die Steigung $m_{\text{NAD(P)}}$ ermittelt. Diese gibt an wie stark sich die Extinktion pro μM ändert. Dieser Kalibrierfaktor ersetzt in der Berechnung den molaren Extinktionskoeffizienten und ermöglicht eine direkte Konzentrationsbestimmung auf Grundlage der gemessenen Extinktionsänderung.

Die Enzymaktivität wurde anhand der Steigung der Extinktionskurve bei 340 nm bestimmt, wobei die Änderung der Absorption über die Zeit die Reaktionsgeschwindigkeit $A_{340} \text{ s}^{-1}$ widerspiegelt. Um den Umsatz auf Minutenbasis anzugeben, wurde dieser Wert mit 60 s min^{-1} multipliziert. Zusätzlich wurde die gemessene Aktivität mit zwei dimensionslosen Korrekturfaktoren multipliziert, welche die eingesetzten Verdünnungen berücksichtigen: $V_{f,\text{well}}$ beschreibt die Verdünnung der Gesamtansatzlösung im Well, während $V_{f,\text{prot}}$ die Verdünnung der Proteinlösung vor Zugabe in den Well angibt.

Um die spezifische Enzymaktivität zu berechnen, wurde die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit schließlich durch den Kalibrierfaktor $m_{\text{NAD(P)}}$ und die eingesetzte Proteinkonzentration c_{prot} geteilt. Daraus ergibt sich folgende Gleichung zur Berechnung der Aktivität:

$$\text{Aktivität } [\text{U mg}^{-1}] = \frac{\text{Steigung } [A_{340} \text{ s}^{-1}] \cdot 60 \text{ s min}^{-1} \cdot V_{f,\text{well}} [-] \cdot V_{f,\text{prot}} [-]}{m_{\text{NAD(P)}} [A_{340} \mu\text{M}^{-1}] \cdot c_{\text{prot}} [\text{mg L}^{-1}]} \quad (3.1)$$

3.5.3.4 Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetik

Die Michaelis-Menten-Kinetik beschreibt die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wird hierzu die Enzymaktivität gegen die Konzentration des variierenden Substrats aufgetragen.

Bei der Untersuchung von Mehrsubstratreaktionen wird ein Substrat im Überschuss vorgelegt, während das andere in unterschiedlichen Konzentrationen variiert wird. Dies ermöglicht eine isolierte Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von diesem Substrat. In dieser Arbeit wurde der Überschuss eines Substrats über die maximale Enzymaktivität definiert: Ein Substrat gilt dann als im Überschuss vorhanden, wenn bei seiner Konzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} erreicht wird.

Konnte die maximale Enzymaktivität experimentell nicht erreicht werden, etwa aufgrund von Löslichkeitsgrenzen oder technischen Begrenzungen, wurde stattdessen die höchste technisch realisierbare Substratkonzentration als konstante Überschusskonzentration verwendet. Für die verschiedenen Michaelis-Menten-Kurven wurden mindestens 6 Messpunkte aufgenommen.

3.5.4 GCMS

Die Konzentrationsbestimmung von δ -Valerolacton, Lactol und 1,5-Pentandiol erfolgte mittels GCMS. Die analytischen Untersuchungen wurden mit einem *Nexis™ GC-2030* (Shimadzu, Japan) durchgeführt, der aus einem Gaschromatographen vom Typ GC-2030 sowie einem dreifach-quadrupolbasierten Massenspektrometer (GCMS-TQ8050 NX) besteht. Die Probeninjektion erfolgte automatisiert mittels eines *AOC-20i Auto Injectors* in Kombination mit dem *AOC-20s Auto Sampler*.

Das Split-Verhältnis betrug 1:5 für 1,5-Pentandiol beziehungsweise 1:50 für δ -Valerolacton und Tetrahydropyranol. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Der Fluss wurde im Modus der linearen Flussgeschwindigkeit geregelt und auf 30 cm s^{-1} eingestellt. Der *Purge Flow* betrug 3 mL min^{-1} , während der Systemdruck auf 29,3 kPa gehalten wurde. Die Injektion erfolgte im Split-Modus bei einer Injektionstemperatur von 280 °C.

Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer RTX-5 MS-Säule mit einer Länge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 μm . Die maximal zulässige Säulentemperatur betrug 350 °C. Die verwendete Säule trug die ID 1650405. Das angewendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 3.13 dargestellt.

Die MS-Analysen wurden im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) durchgeführt. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 280 °C, die der Transferlinie 300 °C. In Tabelle 3.14 sind die jeweiligen Target- und Identifikationsionen der Hauptkomponenten dargestellt.

Tabelle 3.13: Temperaturprogramm des Ofens während der GC-MS-Analyse.

Segment	Rate [$^{\circ}\text{C min}^{-1}$]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Haltezeit [min]
Start	–	60	2
Schritt 1	60	125	1
Schritt 2	5	140	1
Schritt 3	60	250	2

Tabelle 3.14: Ionenübersicht der analysierten Komponenten im SIM-Modus.

Analyt	Target-Ion	Identifikationsion 1	Identifikationsion 2
1,5-Pentandiol	56	41	57
δ -Valerolacton	42	41	56
Tetrahydropyranol	56	41	55

Die Erfassung und Auswertung der chromatographischen Daten erfolgte mit der Software *LabSolutions* (Shimadzu, Japan). Für die quantitative Auswertung wurde der Flächeninhalt der detektierten Peaks herangezogen.

3.5.4.1 Extraktion

Da die GCMS für wässrige Proben ungeeignet ist, musste zunächst eine Extraktion mit Ethylacetat durchgeführt werden. Das für die Extraktion verwendete Ethylacetat enthielt 5 mM n-Dodecan als internen Standard. Die Extraktion begann mit der Zugabe von 250 μL Ethylacetat zu 50 μL der zu analysierenden Probe. Das Gemisch wurde anschließend für 5 min intensiv gemischt und folgend bei 12 000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde die organische (obere) Phase abgenommen und mit einer Spatelspitze Magnesiumsulfat getrocknet. Das Gemisch wurde erneut für 1 min gemischt und nochmals bei 12 000 g für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und für die GC-MS-Analyse verwendet.

3.5.4.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung wurde für δ -Valerolacton, Lactol und 1,5-Pentandiol in Anwesenheit von 0,5 mM n-Dodecan als internem Standard durchgeführt. Der interne Standard war in Ethylacetat gelöst. Die Verdünnungsreihen wurden in KPi-Puffer (pH 8,0) angesetzt und anschließend extrahiert. Die Messungen erfolgten jeweils als Gemisch aller drei Analyte, wobei die Verhältnisse der

Konzentrationen einen realen Reaktionsverlauf widerspiegeln sollten. Für 1,5-Pentandiol wurde ein Split Ratio von 1:5 verwendet, während für δ -Valerolacton und Lactol ein Split Ratio von 1:50 zur Anwendung kam.

Zur Auswertung wurde das Verhältnis der Peakfläche der jeweiligen Analyte zur Peakfläche des internen Standards berechnet. Diese Verhältnisse wurden anschließend gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen, um Kalibriergeraden zu erhalten. Diese sind im Anhang dargestellt (siehe Abbildung A.2).

3.6 *In vitro* Biotransformation

Zur Untersuchung des Konzentrationszeitverlaufs wurden *in vitro* Biotransformationen durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Reaktionsgemische eingesetzt. Zur Analyse der zeitlichen Konzentrationsverläufe kamen die zuvor beschriebenen Pufferlösungen in Kombination mit unterschiedlichen Substrat- und Enzymkonzentrationen zum Einsatz. Die genauen Konzentrationen der relevanten Komponenten ist den jeweiligen Versuchen zu entnehmen. Die Reaktionen wurden in 2 mL-Eppendorfgefäßen angesetzt und in einem Eppendorf® SmartBlock Thermoblock bei 30 °C und 1000 rpm über den gesamten Messzeitraum inkubiert. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsgemische zeigt Tabelle 3.15.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Biotransformationen.

Komponente	Konzentration
Puffer	50 mM bis 1000 mM
1,5-Pentandiol	20 mM bis 250 mM
NAD(P) ⁺	10 mM
Aceton	0 mM bis 100 mM
Enzymlösung	335 μ L bis 365 μ L

Die Ermittlung des Reaktionsverlaufs erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden. Dazu wurden die Konzentrationen der relevanten Komponenten zu definierten Zeitpunkten mittels GCMS bestimmt.

3.7 Hydrolyse

Zur Untersuchung der Hydrolyse von δ -Valerolacton wurden verschiedene Pufferbedingungen getestet. Die Zusammensetzung der eingesetzten Pufferlösungen ist in Tabelle 3.16 dargestellt.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung der Puffer zum Test der Hydrolyse.

Puffer	Komponenten	pH
KPi-Puffer	50 mM Kaliumphosphat, 1 mM Magnesiumchlorid	8,0
GlycinNaOH-Puffer	50 mM Glycin + NaOH, 1 mM Magnesiumchlorid	9,0

Dazu wurden δ -Valerolacton-Konzentrationen im Bereich von 5 mM bis 10 mM unter den zuvor beschriebenen Bedingungen getestet. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden mittels GCMS. Ein anschließender exponentieller Fit der erhaltenen Konzentrationsverläufe ermöglichte die Abschätzung der Halbwertszeit in den jeweiligen Puffersystemen.

3.8 Kinetische Modellierung des Reaktionssystems

In diesem Kapitel wird der Ablauf der kinetischen Modellierung des Reaktionssystems im Detail erläutert. Zunächst erfolgt die Herleitung und Bestimmung der kinetischen Parameter. Im Anschluss wird auf die Simulation der Reaktionsverläufe eingegangen.

3.8.1 Parameterbestimmung mittels gewichteter nichtlinearer Regression

Zur quantitativen Beschreibung der zu untersuchenden enzymatischen Reaktionen wurde jeweils ein Reaktionsmodell auf Basis einer erweiterten Michaelis-Menten-Kinetik formuliert. Dabei wurden für jede Reaktion ein Satz an Substraten und Inhibitoren berücksichtigt. Zur Modellierung der inhibitorischen Effekte wurde eine kompetitive Inhibierung angenommen. Die allgemeine Form der verwendeten Reaktionsgeschwindigkeit lautet:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S_1] \cdot [S_2]}{\left([S_1] + K_{m,1} \cdot \prod_i \left(1 + \frac{[I_i]}{K_{i,i}}\right)\right) \cdot \left([S_2] + K_{m,2} \cdot \prod_j \left(1 + \frac{[I_j]}{K_{i,j}}\right)\right)} \quad (3.2)$$

Die Modellierung und anschließende Parameteranpassung wurden in Python (Version 3.11) unter Verwendung der Bibliotheken NumPy, SciPy und Matplotlib durchgeführt. Zur Modellierung wurden mehrere Messreihen pro Reaktion, in denen jeweils ein kinetisch relevanter Parameter variiert wurde, während die übrigen konstant gehalten wurden verwendet. Die experimentellen Daten wurden als Arrays hinterlegt und umfassten die relevanten Konzentrationen, die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten und die zugehörigen Standardabweichungen.

Für den Großteil der Reaktionen wurde eine simultane globale Regressionsanalyse aller zugehörigen Messreihen durchgeführt. Die Parameter v_{\max} , K_m und K_i wurden hierbei in einem gemeinsamen nicht linearen Fit bestimmt. Die Residuen wurden in einer gewichteten

Fehlerfunktion zusammengefasst, wobei jedes Residuum durch die Wurzel der experimentellen Standardabweichung des zugehörigen Messwertes geteilt wurde. Die Optimierung erfolgte mithilfe der Funktion `least_squares` aus dem Modul `scipy.optimize`, wobei sowohl Startwerte als auch obere und untere Grenzwerte für alle Parameter definiert wurden. Zur Verbesserung der numerischen Stabilität wurden Nullwerte in den Standardabweichungen durch kleine Konstanten ersetzt.

Bei zwei Reaktionen war ein simultaner Fit aller Datenreihen aufgrund von Konvergenzproblemen nicht erfolgreich. Daher wurde eine iterative Regressionsstrategie implementiert, bei der jeweils nur ein Parameter oder eine Parametergruppe pro Iteration angepasst wurde. Die nicht zu optimierenden Parameter wurden dabei in jedem Fit-Schritt fixiert. Beispielsweise wurde v_{\max} gemeinsam mit $K_{m,\text{NADH}}$ über eine NADH-Konzentrationsreihe angepasst, während in einem folgenden Schritt $K_{m,\text{Lactol}}$ über eine Lactol-Reihe geschätzt wurde. Die iterative Optimierung wurde mithilfe der Funktion `curve_fit` aus `scipy.optimize` durchgeführt. Die Iterationen wurden solange wiederholt, bis alle Parameter innerhalb eines Grenzwertes von $\Delta\theta < 10^{-6}$ konvergierten.

Die Standardabweichungen der geschätzten Parameter wurden in beiden Fällen aus der Kovarianzmatrix der jeweiligen Anpassung berechnet. Bei Verwendung von `least_squares` wurde die Kovarianzmatrix aus der Jacobimatrix des Fits approximiert, bei `curve_fit` direkt über die Funktion `pcov` ausgegeben. Beispielhafte Skripts der beiden verwendeten Methoden befinden sich im Anhang (siehe Programmcode A.1-A.2).

3.8.2 Modellierung und Simulation der Reaktionskinetik

Zur Beschreibung der Reaktionskinetik wurde ein Modell auf Basis gekoppelter gewöhnlicher Differentialgleichungen (ODEs) erstellt. Die Modellierung erfolgte in Python (Version 3.11) unter Verwendung der Bibliotheken NumPy, SciPy und Matplotlib. Die Reaktionskinetik berücksichtigt mehrere enzymkatalysierte Reaktionen mit kompetitiven Inhibierungsmechanismen, deren Kinetik durch eine erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben wurde.

Die Konzentrationsverläufe wurden gemäß folgender allgemeiner Struktur modelliert:

$$\frac{dc_i}{dt} = \sum_i r_i \quad (3.3)$$

Die relevanten Reaktionsraten für jede Komponente wurden auf Grundlage ihres Vorkommens in den jeweiligen Reaktionen bestimmt. Die Reaktionsraten r_i der einzelnen Reaktionen werden durch die zuvor bestimmte Michaelis-Menten-Kinetik v beschrieben. Die Parameter v_{\max} , K_m und K_i wurden auf Basis experimenteller Daten ermittelt und jeweils als normalverteilte Zu-

fallsgrößen mit Mittelwert und Standardabweichung berücksichtigt. Die Parameterunsicherheit wurde durch eine Monte-Carlo-Simulation mit 10.000 Iterationen quantifiziert, wobei bei jeder Iteration die Parameterwerte neu gezogen und das Modell numerisch integriert wurden. Hierbei wurde eine Unabhängigkeit der Standardabweichung der Parameter voneinander angenommen, sodass eine Korrelation der Parameter vernachlässigt wurde.

Die numerische Lösung des ODE-Systems erfolgte mit `solve_ivp` aus dem Modul `scipy.integrate` unter Verwendung des LSODA-Solvers. Die Anfangskonzentrationen der betrachteten Metaboliten ($[PD]$, $[NAD]$, $[Lactol]$, $[NADH]$, $[Lacton]$, $[Aceton]$, $[IP]$) wurden auf Basis experimenteller Startbedingungen definiert. Die Integration erfolgte über einen Zeitraum von 3000 Minuten mit 200 diskreten Zeitpunkten.

Zur Auswertung wurden für jeden Metaboliten und für jede Reaktionsrate die mittlere zeitliche Konzentration beziehungsweise Reaktionsgeschwindigkeit sowie das 95%-Konfidenzintervall (2,5- bis 97,5-Perzentil) berechnet. Die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt. Ein beispielhaftes Skript befindet sich im Anhang (siehe Programmcode A.3).

3.9 Fehlerfortpflanzung

Zur Berücksichtigung von Unsicherheiten bei berechneten Größen wurde die Fehlerfortpflanzung nach Gauß verwendet. Dabei wird die Standardabweichung einer abgeleiteten Größe $f(x_1, x_2, \dots, x_n)$, die von mehreren Messgrößen x_i abhängt, mit folgender Formel berechnet [55].

$$\Delta f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x_1} \cdot \Delta x_1\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2} \cdot \Delta x_2\right)^2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial x_n} \cdot \Delta x_n\right)^2} \quad (3.4)$$

Dabei bezeichnen Δx_i die Standardabweichungen der jeweiligen Messgrößen x_i , und $\frac{\partial f}{\partial x_i}$ sind die partiellen Ableitungen der Funktion f nach den einzelnen Variablen. Die Funktion f wurde dabei durch analytische Gleichungen definiert.

4 Ergebnisse

Zunächst wurden die Ergebnisse der *in vivo* Proteinsynthese sowie der anschließenden Aufreinigung untersucht. Im Anschluss daran wurden kinetische Parameter der Modellreaktion (Phenylethanol zu Acetophenon) bestimmt, jeweils unter Verwendung von NAD^+ und NADP^+ als Cofaktor. Dadurch konnte eine Aussage über die Cofaktorpräferenz getroffen werden.

Anhand des Vergleichs der kinetischen Parameter der Zielreaktion wurde die geeignetste Variante zur δ -Valerolactonsynthese selektiert. Für diese Variante wurden anschließend die Michaelis-Menten-Kinetiken der einzelnen Teilreaktionen bestimmt und ein Modell zur Simulation von Konzentrationsverläufen entwickelt. Nach Erweiterung um Enzyminaktivierung, Hydrolyse von δ -Valerolacton und der Validierung des Modells wurde eine Cofaktorregeneration integriert.

4.1 Erfolgreiche Isolierung der Zielproteine

Die *in vivo* Proteinsynthese der verschiedenen Varianten der *Lb*ADH wurde zunächst mittels SDS-PAGE analysiert. Das SDS-PAGE diente zudem der Überprüfung der Aufreinigung durch die IMAC. Die durch Elution gewonnenen Fraktionen wurden untersucht und dem *Crude Extract* (CE) gegenübergestellt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

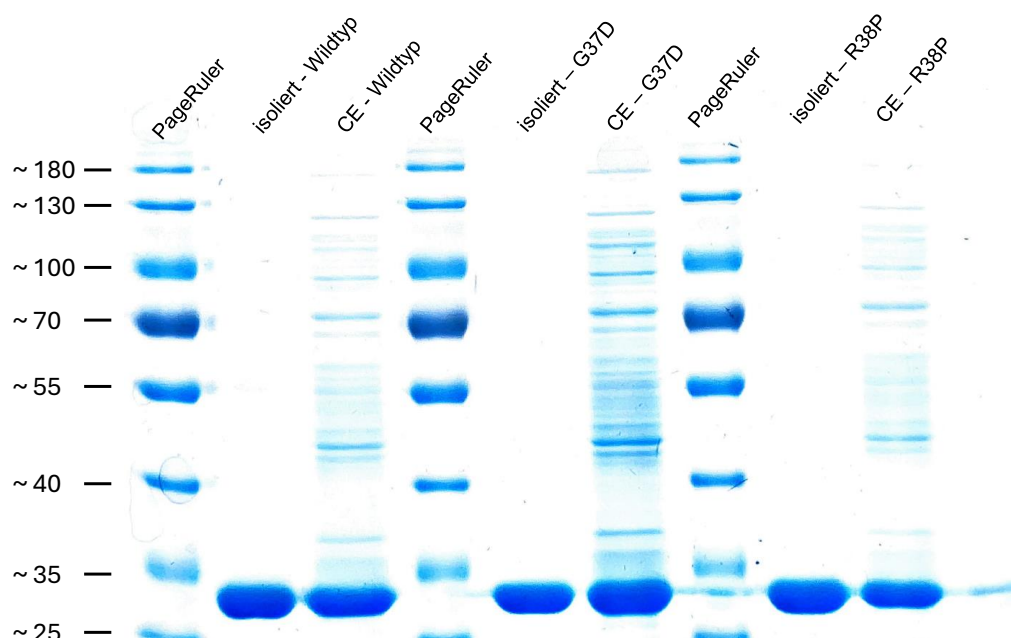


Abbildung 4.1: SDS-PAGE der Lysate und der isolierten Enzyme.

Proteinmarker in der ersten, vierten und siebten Spur von links: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; jeweils CE und isoliertes Enzym der Varianten Wildtyp (2–3), G37D (5–6), R38P (8–9).

Sowohl beim Wildtyp als auch bei den Varianten G37D und R38P war eine deutliche Bande im Bereich zwischen 25 kDa und 35 kDa zu erkennen. Dies entspricht dem molekularen Gewicht der *LbADH* mit His6-Tag und Linker von 27,8 kDa. Die Verunreinigung der isolierten Enzyme war als vernachlässigbar einzustufen, da keine weiteren Banden sichtbar waren.

Mithilfe des Bradford Protein Assays konnte eine Proteinkonzentration im Bereich von $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ bis $2,2 \text{ mg mL}^{-1}$ bestimmt werden.

4.2 Aktivitätsvergleich

In diesem Kapitel erfolgt eine detaillierte Analyse des Vergleichs der Varianten G37D und R38P mit dem Wildtyp (wt). Als Grundlage diente zunächst die Modellreaktion von Phenylethanol zu Acetophenon, da aufgrund der höheren erzielbaren Aktivitäten eine präzisere Bewertung der Cofaktorabhängigkeit möglich war.

Anschließend wurde der Vergleich auf die Zielreaktion ausgeweitet. Hierbei wurde das gesamte Reaktionssystem als *Black Box* betrachtet, wodurch ausschließlich der erste Reaktionsschritt analysiert wurde.

4.2.1 Phenylethanol-Oxidation: pH 8 als bester getesteter Wert für alle Varianten

In der Arbeit von Schlieben et al. (2005) wurde KPi-Puffer verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, kam dieser auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Da bereits eine Nebenproduktbildung durch die Reaktion von Tris mit Aldehyden in der Literatur beschrieben wurde [31], wurde auf die Verwendung von Tris-HCl-Puffer verzichtet.

Während in der Literatur bislang primär die Reduktion untersucht wurde, wurde in dieser Arbeit der Einfluss des pH-Werts auf die Oxidation analysiert. Hierzu wurde in einer ersten Näherung die Aktivität bei konstanten Substratkonzentrationen sowohl bei neutralem pH als auch an den Rändern des Pufferbereichs bestimmt. Zur ersten Charakterisierung der Varianten wurde die Modellreaktion, bei der Phenylethanol zu Acetophenon oxidiert wird, herangezogen.

Da der Grund für die Mutationen der Wechsel in der Cofaktorpräferenz war, wurde für die Analyse des Wildtyps NADP^+ als Cofaktor verwendet, während bei den Varianten G37D und R38P NAD^+ eingesetzt wurde. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass alle getesteten Varianten bei jedem untersuchten pH-Wert enzymatische Aktivität aufwiesen. Unter den getesteten Bedingungen stellte sich pH 8 sowohl für den Wildtyp als auch für die Varianten G37D und R38P als optimal heraus. Der Wildtyp erreichte dabei eine maximale Aktivität von $10,93 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$, gefolgt von G37D mit $7,44 \pm 0,02 \text{ U mg}^{-1}$ und R38P mit $3,07 \pm 0,08 \text{ U mg}^{-1}$.

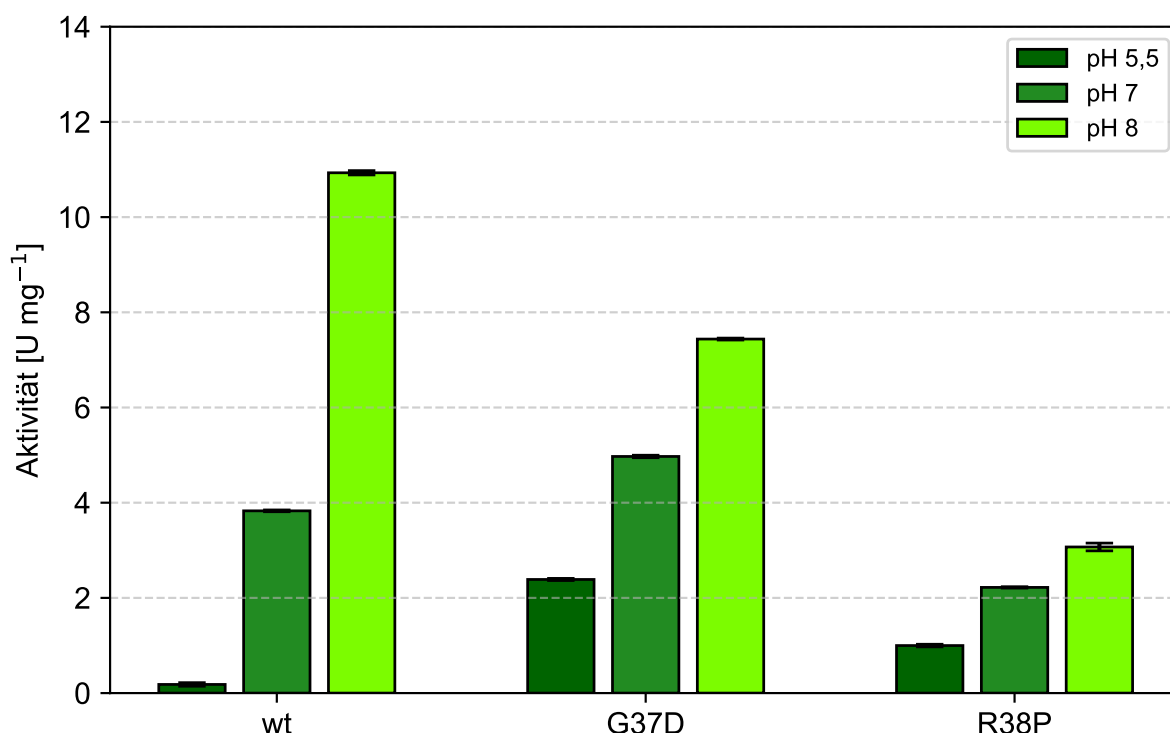


Abbildung 4.2: Vergleich der Aktivität aller Varianten bei unterschiedlichen pH-Werten unter Betrachtung der Modellreaktion.

Die Aktivität des Wildtyps wurde mit 60 mM Phenylethanol und 0,5 mM NADP⁺ mithilfe eines Aktivitätsassays bestimmt. Für die Varianten G37D und R38P wurden 60 mM Phenylethanol und 2 mM NAD⁺ verwendet. Als Puffer diente 50 mM KPi mit 1 mM Magnesiumchlorid und 50 % (v/v) DMSO. Die Aktivitäten wurden aus einem Reaktionsvolumen von 200 µL in einer Mikrotiterplatte aufgenommen. Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus Duplikaten mit Standardabweichung.

Auffällig war jedoch die stärkere pH-Abhängigkeit des Wildtyp. Bei pH 5,5 betrug dessen Aktivität lediglich $0,18 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$, was nur 1,8 % der Aktivität bei pH 8 entsprach. Im Vergleich dazu zeigten G37D und R38P bei pH 5,5 Aktivitäten von $2,39 \pm 0,02 \text{ U mg}^{-1}$ beziehungsweise $0,99 \pm 0,02 \text{ U mg}^{-1}$, was etwa 33 % ihrer jeweiligen Maximalaktivität entspricht.

Auf Basis dieser Daten wurde pH 8 als Reaktionsbedingung für alle weiteren Untersuchungen gewählt, um vergleichbare und optimale Bedingungen für die Charakterisierung der Varianten sicherzustellen.

4.2.2 G37D und R38P zeigen geänderte Cofaktorpräferenz zugunsten von NAD⁺

Zur Bewertung der Cofaktorabhängigkeit der Enzymvarianten Wildtyp, G37D und R38P wurde die Michaelis-Menten-Kinetik der Oxidation von Phenylethanol zu Acetophenon analysiert. Die entsprechenden Diagramme zur Ermittlung der kinetischen Parameter sind im Anhang dargestellt (siehe Abbildung A.3–A.8).

Die ermittelten Parameter wurden anschließend miteinander verglichen. Besonders der $K_{m,NAD(P)^+}^{app}$, welcher die Affinität zum jeweiligen Cofaktor beschreibt, erlaubte Rückschlüsse auf die Cofaktorpräferenz der Varianten. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

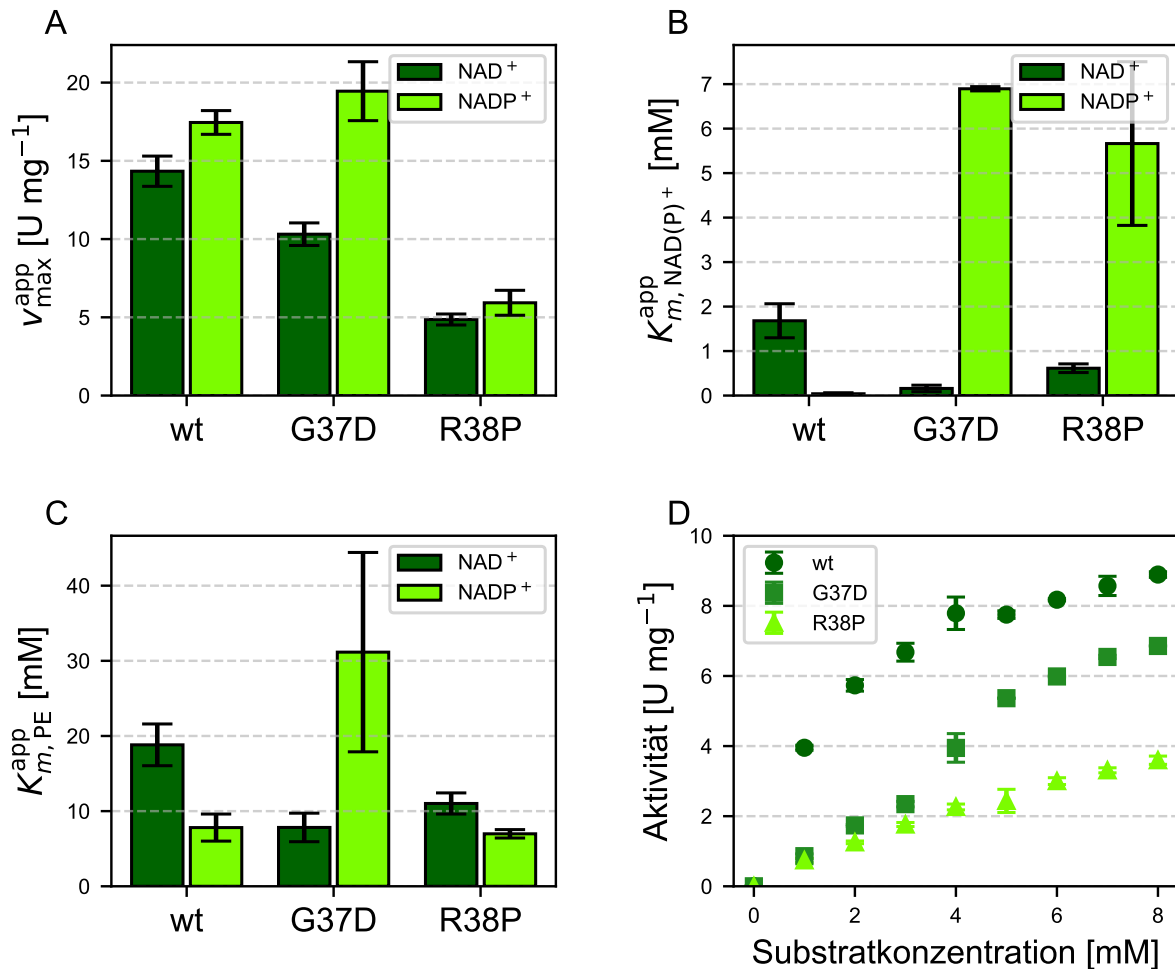


Abbildung 4.3: Vergleich kinetischer Parameter und Aktivitätsverläufe der Varianten unter Betrachtung der Modellreaktion.

(A–C) Vergleich von v_{max}^{app} , $K_{m,PE}^{app}$ und $K_{m,NAD(P)^+}^{app}$ für den Wildtyp (wt) sowie die Varianten G37D und R38P in Anwesenheit von NAD⁺ bzw. NADP⁺. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten mit Standardabweichung.

(D) Aktivitätsverläufe der Varianten in Abhängigkeit von der Cofaktorkonzentration. Phenylethanol wurde konstant im Überschuss gehalten. Für den Wildtyp wurde NAD⁺, für G37D und R38P NADP⁺ verwendet. Als Puffer diente 50 mM KPi mit 1 mM Magnesiumchlorid und 50 % (v/v) DMSO.

Wird die maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit v_{max}^{app} betrachtet (Abbildung 4.3A), so zeigten Wildtyp und G37D mit $17,50 \pm 0,75$ U mg⁻¹ beziehungsweise $19,50 \pm 1,88$ U mg⁻¹ die höchsten Aktivitäten. Auffällig ist zudem, dass die Reaktionen mit NADP⁺ bei allen Varianten schneller verliefen als mit NAD⁺.

Ein anderes Ergebnis zeigt sich bei der Betrachtung der apparenten Michaelis-Menten-Konstanten für den Cofaktor $K_{m,\text{NAD(P)}^+}^{\text{app}}$ (Abbildung 4.3B). Der Wildtyp zeigte mit NADP^+ den niedrigsten Wert ($0,04 \pm 0,02 \text{ mM}$), während bei G37D und R38P jeweils NAD^+ bevorzugt wurde ($0,16 \pm 0,07 \text{ mM}$ beziehungsweise $0,61 \pm 0,10 \text{ mM}$). Im Vergleich zum Wildtyp mit NAD^+ ($K_{m,\text{NAD}^+}^{\text{app}} = 1,68 \pm 0,38 \text{ mM}$) konnte der Wert bei den Varianten somit um bis zu 90 % gesenkt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung der Cofaktorpräferenz bietet das Verhältnis von $K_{m,\text{NADP}^+}^{\text{app}}$ zu $K_{m,\text{NAD}^+}^{\text{app}}$. Der Wildtyp zeigte mit einem Verhältnis von $0,024 \pm 0,010$ eine deutliche Präferenz für den phosphorylierten Cofaktor. Für G37D ergab sich ein Verhältnis von $43,1 \pm 19,7$ und für R38P von $9,22 \pm 3,33$, was in beiden Fällen auf eine Präferenz für den unphosphorylierten Cofaktor hinweist.

Die Michaelis-Menten-Konstanten in Bezug auf Phenylethanol ($K_{m,\text{PE}}^{\text{app}}$, Abbildung 4.3C) lagen für die meisten Kombinationen im Bereich von etwa 10 mM. Auffällig waren lediglich die erhöhten Werte bei G37D mit NADP^+ ($41,0 \pm 13,3 \text{ mM}$) sowie des Wildtyp mit NAD^+ ($19,0 \pm 2,8 \text{ mM}$). Die Aktivitätsverläufe in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Abbildung 4.3D) verdeutlichen die hohen $K_{m,\text{NAD(P)}^+}^{\text{app}}$ -Werte bei Verwendung des nicht-präferierten Cofaktors. Beim Wildtyp mit NAD^+ sowie bei G37D und R38P mit NADP^+ wurde auch bei 8 mM keine vollständige Sättigung erreicht. Es ist daher davon auszugehen, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unter diesen Bedingungen nicht erreicht wurde. Aus praktischen Gründen wurde dennoch auf höhere Cofaktorkonzentrationen verzichtet, und die vorliegenden Daten zur Fit-Erstellung verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Umkehr der Cofaktorpräferenz bei beiden Varianten erfolgreich gelungen ist. Die maximale Aktivität des Wildtyps, sowohl mit NAD^+ als auch NADP^+ , konnte jedoch von keiner weiteren Variante mit NAD^+ erreicht werden. Wird jedoch gezielt eine NAD^+ -abhängige Variante gesucht, stellt G37D eine interessante Alternative dar. Sie wies zwar ein geringfügig niedrigeres $v_{\text{max}}^{\text{app}}$ als der Wildtyp auf, jedoch war auch der $K_{m,\text{NAD}^+}^{\text{app}}$ deutlich reduziert. Dies weist für den praktischen Einsatz auf einen geringeren Bedarf an Cofaktor hin. Zur Verdeutlichung eignet sich die Betrachtung des Verhältnisses $v_{\text{max}}^{\text{app}}/K_{m,\text{NAD}^+}^{\text{app}}$, welches die katalytische Effizienz in Bezug auf NAD^+ beschreibt. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass G37D die höchste katalytische Effizienz aufwies. Trotz einer niedrigeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreichte R38P eine ähnliche Effizienz wie der Wildtyp.

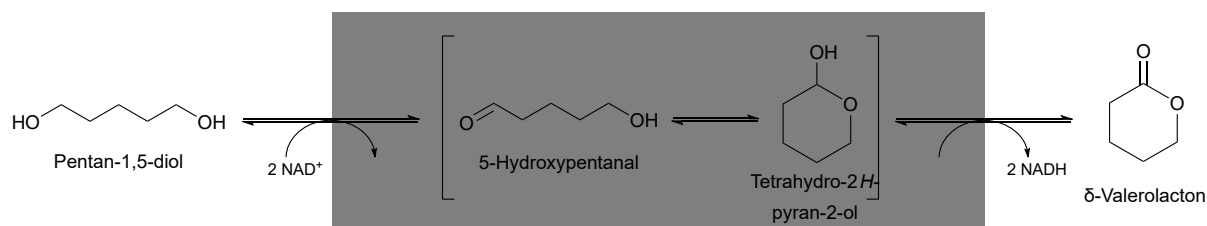
Tabelle 4.1: Katalytische Effizienz der Varianten mit NAD⁺.

Variante	Wildtyp	G37D	R38P
$v_{\max}^{\text{app}}/K_{m,\text{NAD}^+}^{\text{app}}$ [U mg ⁻¹ mM ⁻¹]	8,53 ± 2,03	64,47 ± 29,88	7,91 ± 1,38

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass G37D die am besten geeignete Variante für Reaktionen mit NAD⁺ als Cofaktor darstellt. Für Reaktionen mit NADP⁺ bleibt der Wildtyp weiterhin die bevorzugte Wahl.

4.2.3 Vergleich der Zielreaktion zeigt G37D als leistungsstärkste NAD⁺-abhängige Variante

Im nächsten Schritt wurde der kinetische Vergleich auf die Zielreaktion ausgeweitet. Dabei wurde zunächst ausschließlich der erste Reaktionsschritt betrachtet, indem der Umsatz von 1,5-Pentandiol über den Anstieg der NAD(P)⁺-Konzentration gemessen wurde. Das untersuchte Reaktionssystem ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

**Abbildung 4.4:** Darstellung der betrachteten „Black Box“.

Die Abbildung veranschaulicht das in diesem Kapitel betrachtete Reaktionssystem. Es wird lediglich der Umsatz von 1,5-Pentandiol untersucht; nachfolgende Reaktionen werden dabei vernachlässigt.

Für diese Reaktion wurden die Michaelis-Menten-Parameter für den Wildtyp sowie die Mutanten G37D und R38P bestimmt. Die jeweiligen kinetischen Plots sind im Anhang dargestellt (siehe Abbildung A.9–A.11). Die resultierenden Parameter wurden einander gegenübergestellt, um die für diese Reaktion am besten geeignete Variante zu identifizieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 zusammengefasst.

Beim Vergleich der maximalen apparenten Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max}^{app} (siehe Abbildung 4.5A) fällt auf, dass der Wildtyp und G37D mit jeweils etwa 0,08 U mg⁻¹ vergleichbare Aktivitäten erreichten. Die Mutante R38P hingegen zeigte mit 0,024 ± 0,001 U mg⁻¹ nur etwa 25 % der Aktivität der beiden anderen Varianten.

Bei Betrachtung der Cofaktor-Affinität zeigt sich, dass der Wildtyp eine deutlich höhere Affinität zu NADP⁺ aufwies als die Mutanten zu NAD⁺ (siehe Abbildung 4.5B). Während G37D und

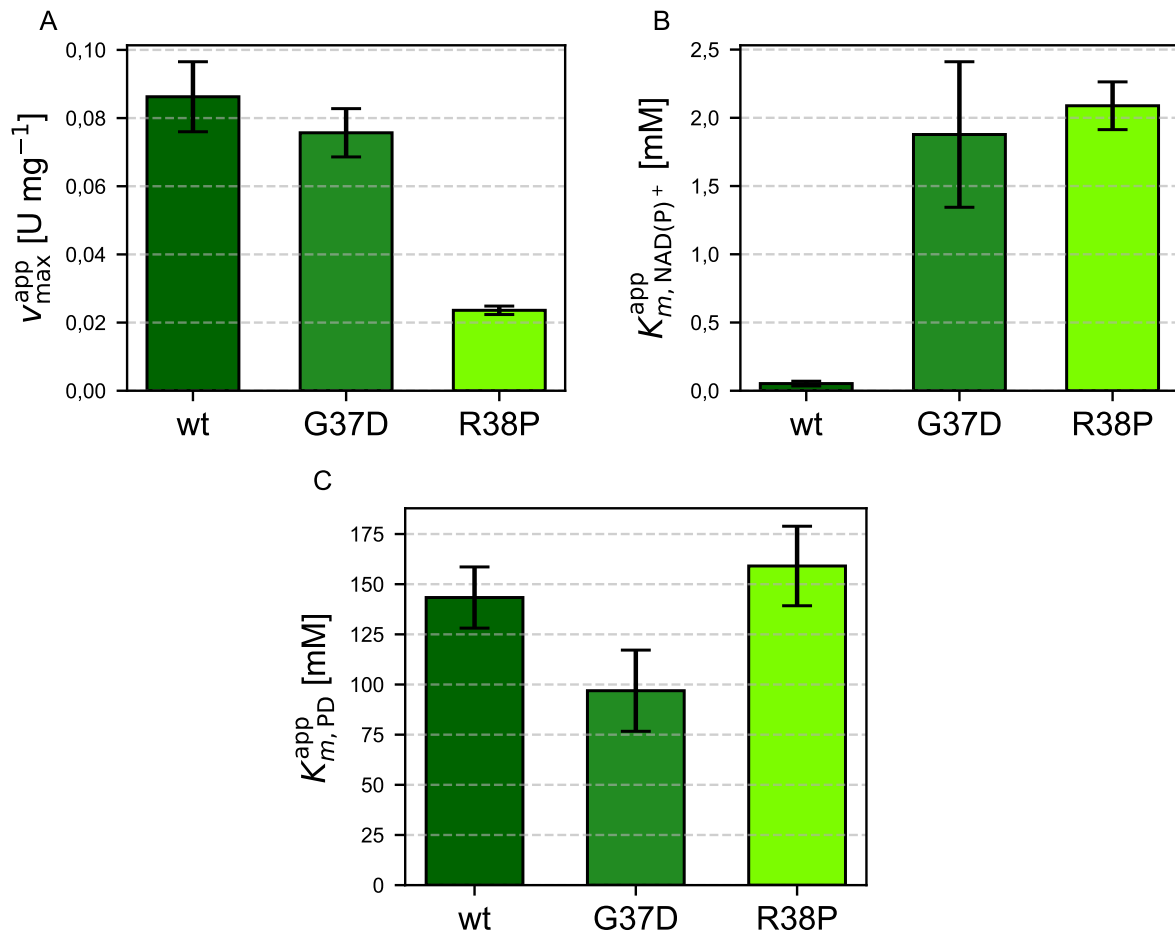


Abbildung 4.5: Vergleich der kinetischen Parameter für wt, G37D und R38P unter Berücksichtigung der Zielreaktion.

Die Abbildung zeigt die aus der Zielreaktion abgeleiteten Parameter v_{\max}^{app} , $K_{m, \text{NAD(P)}+}^{\text{app}}$ und $K_{m, \text{PE}}^{\text{app}}$ für den Wildtyp mit NADP⁺ sowie für die Mutanten G37D und R38P mit NAD⁺. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Als Puffer diente 50 mM KPi mit 1 mM Magnesiumchlorid.

R38P einen $K_{m, \text{NAD(P)}+}^{\text{app}}$ von etwa 2 mM zeigten, war dieser Wert beim Wildtyp um den Faktor 40 geringer.

Auch bei der Substrataffinität ($K_{m, \text{PD}}^{\text{app}}$) zeigten sich Unterschiede (siehe Abbildung 4.5C). Alle drei Varianten wiesen Werte zwischen 100 mM und 150 mM auf. Damit war die Affinität zu 1,5-Pentandiol deutlich geringer als zum Vergleichssubstrat Phenylethanol. Der $K_{m, \text{PD}}^{\text{app}}$ war in der Zielreaktion etwa um den Faktor 10 höher als in der Modellreaktion (siehe Abbildung 4.3C). Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Wildtyp aufgrund seiner hohen Affinität zu NADP⁺ unter den getesteten Varianten die besten kinetischen Eigenschaften für die Zielreaktion aufwies. Da jedoch für die weitere Anwendung NAD⁺ als Cofaktor verwendet werden soll, fiel die Wahl auf die Mutante G37D. Diese zeigte im Vergleich zu R38P eine signifikant höhere

Aktivität und stellt damit die geeignetere NAD^+ -abhängige Variante dar. Zudem kann der hohe $K_{m,\text{NAD}^+}^{\text{app}}$ von G37D als Potential für weitere Optimierungen der Variante angesehen werden.

4.3 Kinetische Charakterisierung von G37D + NAD^+

In diesem Kapitel wurde die zuvor selektierte Variante unter Verwendung von NAD^+ als Cofaktor genauer charakterisiert. Dazu wurde für jede Teilreaktion die Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt. Anschließend erfolgte ein Vergleich der ermittelten apparenten Parameter sowie eine Validierung der Ergebnisse. Diese Validierung basierte zunächst auf einem Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten und somit auf demselben Messprinzip die zur Bestimmung der kinetischen Parameter verwendet wurde.

4.3.1 Beschreibung der erweiterten Michaelis-Menten-Kinetik mit Produktinhibierung

Die Reaktionsraten wurden so definiert, dass jede Rate eine spezifische Teilreaktion des betrachteten Systems beschreibt. Hierzu wurde die in Abbildung 4.4 dargestellte vereinfachte „Black Box“ entfernt und das vollständige Reaktionsnetzwerk berücksichtigt. Abbildung 4.6 zeigt das zugrundeliegende Reaktionssystem, das im Folgenden näher beschrieben wird.

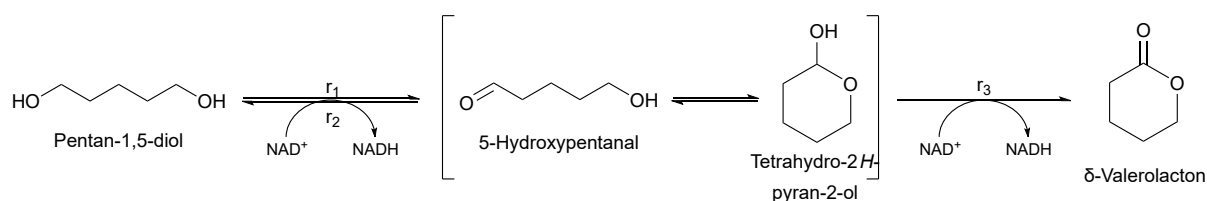


Abbildung 4.6: Reaktionsweg von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton.

Die Abbildung zeigt den NAD^+ -abhängigen Reaktionsweg von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton. Die Oxidation zu Hydroxyaldehyd verläuft mit r_1 , die Rückreaktion mit r_2 . Hydroxyaldehyd und das zyklische Lactol stehen in schnellem chemischen Gleichgewicht; für diese Umwandlung wird keine eigene Reaktionsrate definiert. Die Oxidation des Lactols zu δ -Valerolacton erfolgt über r_3 . Eine Rückreaktion wurde nicht beobachtet und vernachlässigt.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass sowohl für Hydroxypentanal als auch für Tetrahydro-pyranol als Substrat die gleiche Kinetik für Reaktion 3 aufgenommen wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Gleichgewichtsbildung schneller abläuft als r_3 . Aus diesem Grund wurde angenommen, dass beide Stoffe immer im Gleichgewicht vorliegen. Somit war sowohl die Lage als auch die Rate des Gleichgewichts vernachlässigbar. Daher wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit beide Spezies unter dem Begriff „Lactol“ zusammengefasst.

Für die Rückreaktion von δ -Valerolacton konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde diese Reaktion im Folgenden als irreversibel betrachtet.

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Reaktionsraten wurden durch eine erweiterte Mehrsubstrat-Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. Auftretende Inhibierungen wurden als kompetitiv modelliert, da es sich jeweils um Reaktionsprodukte handelt. Die verwendeten Gleichungen lauten:

$$r_1 = \frac{v_{\max,1}^{\text{app}} \cdot c_{\text{CPD}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{(c_{\text{CPD}} + K_{m,\text{PD},1}^{\text{app}}) \cdot \left(c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,1}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_{i,\text{NADH},1}^{\text{app}}} \right) \right)} \quad (4.1)$$

$$r_2 = \frac{v_{\max,2}^{\text{app}} \cdot c_{\text{Lactol}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left(c_{\text{Lactol}} + K_{m,\text{Lactol},2}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{PD}}}{K_{i,\text{PD},2}^{\text{app}}} \right) \right) \cdot (c_{\text{NADH}} + K_{m,\text{NADH},2}^{\text{app}})} \quad (4.2)$$

$$r_3 = \frac{v_{\max,3}^{\text{app}} \cdot c_{\text{Lactol}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{(c_{\text{Lactol}} + K_{m,\text{Lactol},3}^{\text{app}}) \cdot (c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,3}^{\text{app}})} \quad (4.3)$$

Die zur Bestimmung der Parameter durchgeführten Fitdiagramme sind im Anhang (siehe Abbildung A.11-A.13) dargestellt. Eine Zusammenfassung der Parameter gibt Tabelle 4.2.

Tabelle 4.2: Kinetische Parameter von r_1 – r_3 .

Apparente Maximalgeschwindigkeiten (v_{\max}^{app}), Michaelis-Menten-Konstanten (K_m^{app}) und Inhibitionskonstanten (K_i^{app}) jeweils mit Einheit und Standardabweichung.

Parameter	Einheit	Wert	Standardabw.
Reaktionsrate r_1			
$v_{\max,1}^{\text{app}}$	U mg ⁻¹	0,08	0,0071
$K_{m,\text{PD},1}^{\text{app}}$	mM	96,91	20,24
$K_{m,\text{NAD}^+,1}^{\text{app}}$	mM	1,88	0,53
$K_{i,\text{NADH},1}^{\text{app}}$	mM	0,78	0,27
Reaktionsrate r_2			
$v_{\max,2}^{\text{app}}$	U mg ⁻¹	3,54	2,56
$K_{m,\text{Lactol},2}^{\text{app}}$	mM	125,63	6,44
$K_{m,\text{NADH},2}^{\text{app}}$	mM	2,90	2,43
$K_{i,\text{PD},2}^{\text{app}}$	mM	315,87	115,47
Reaktionsrate r_3			
$v_{\max,3}^{\text{app}}$	U mg ⁻¹	2,42	0,14
$K_{m,\text{Lactol},3}^{\text{app}}$	mM	59,59	9,30
$K_{m,\text{NAD}^+,3}^{\text{app}}$	mM	2,13	0,38

Die vorliegenden Kapitel dargestellten kinetischen Parameter dienen als Grundlage für die weiterführende Bewertung, die im Folgenden Kapitel erfolgte.

4.3.2 Umsatz von 1,5-Pentandiol als geschwindigkeitsbestimmender Schritt

Beim Vergleich der kinetischen Parameter v_{\max}^{app} , $K_{m,\text{NAD(H)}}^{\text{app}}$ und $K_{m,\text{Substrat}}^{\text{app}}$ ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den Reaktionen R_1 , R_2 und R_3 feststellen. Eine graphischer Vergleich der Parameter ist in Abbildung 4.7 gezeigt.

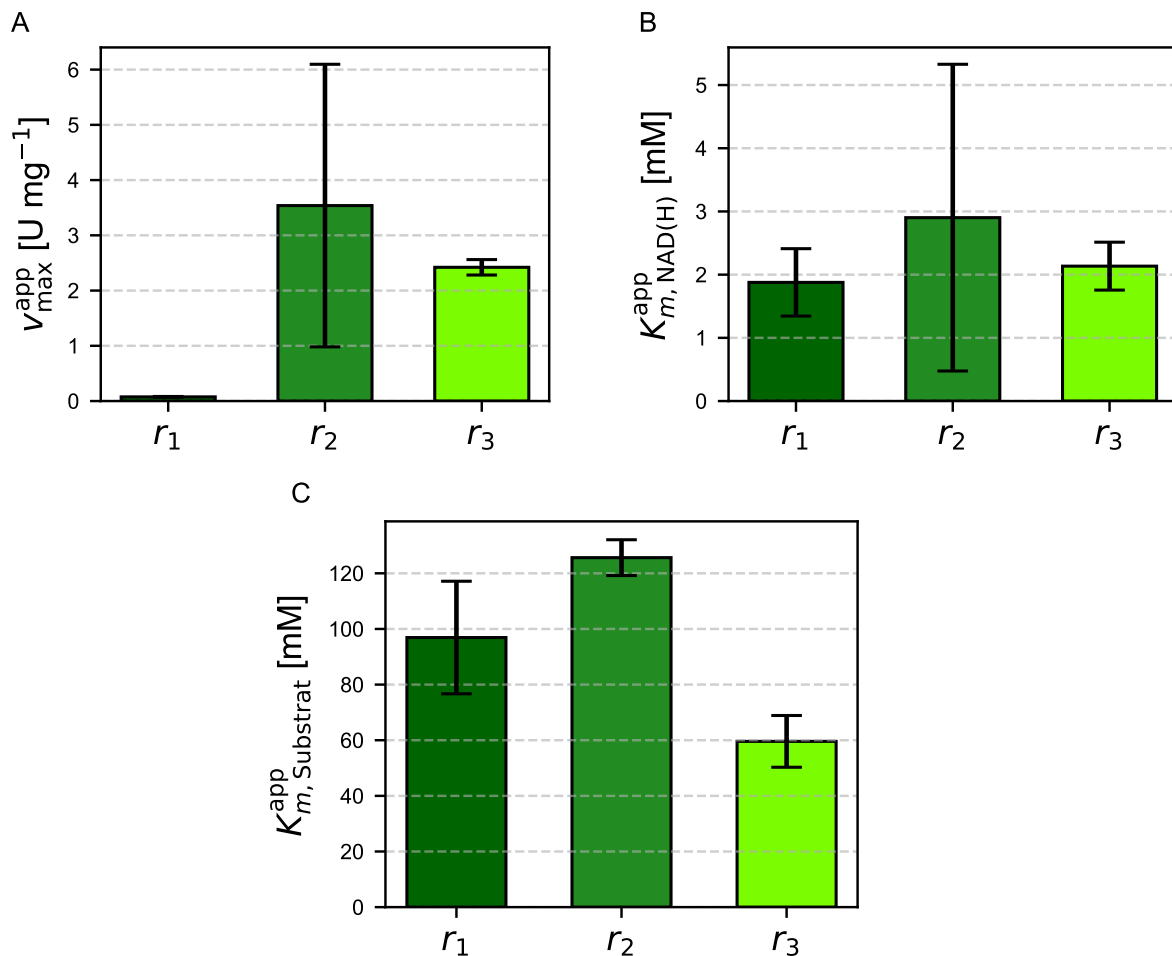


Abbildung 4.7: Vergleich der kinetischen Parameter für r_1 , r_2 und r_3 .

Die Abbildung zeigt die apparenten Maximalgeschwindigkeiten v_{\max}^{app} , die Cofaktor-Affinitäten $K_{m,\text{NAD(H)}}^{\text{app}}$ sowie die Substrataffinitäten $K_{m,\text{Substrat}}^{\text{app}}$ für die drei betrachteten Reaktionen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten; die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. Als Puffer diente 50 mM KPi mit 1 mM Magnesiumchlorid.

Bei Betrachtung der maximalen apparenten Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max}^{app} (siehe Abbildung 4.7A) wird deutlich, dass es sich bei r_1 um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt. Zwischen r_1 , mit einem v_{\max}^{app} von $0,075 \pm 0,007 \text{ U mg}^{-1}$, und r_3 , mit

$2,42 \pm 0,14 \text{ U mg}^{-1}$, lag ein Unterschied von Faktor 30. Zudem lagen die v_{\max}^{app} von r_2 und r_3 näher an den Werten der Modellreaktion.

Die Cofaktor-Affinitäten $K_{m,\text{NAD(H)}}^{\text{app}}$ waren für alle drei Reaktionen ähnlich und lagen zwischen 2 mM bis 3 mM (siehe Abbildung 4.7B).

Auch die Michaelis-Menten-Konstanten der Substrate $K_{m,\text{Substrat}}^{\text{app}}$ befanden sich in einem ähnlichen Größenbereich (siehe Abbildung 4.7C). Hierbei zeigte r_3 mit $59,6 \pm 9,3 \text{ mM}$ die höchste Affinität, gefolgt von r_1 mit $96,9 \pm 20,2 \text{ mM}$ und r_2 mit $125,6 \pm 6,4 \text{ mM}$.

Auffällig waren die hohen Standardabweichungen für v_{\max}^{app} und $K_{m,\text{NAD(H)}}^{\text{app}}$ bei r_2 . Diese ergaben sich aus der eingeschränkten Messbarkeit aufgrund des Absorptionsmaximums des FLUOstar®-Plate-Readers, wodurch die NADH-abhängige Aktivität lediglich bis zu einer Konzentration von 0,6 mM quantifiziert werden konnte. Da in diesem Konzentrationsbereich v_{\max}^{app} noch nicht erreicht wurde, konnten sowohl die maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit als auch der zugehörige $K_{m,\text{NAD(H)}}^{\text{app}}$ nur näherungsweise bestimmt werden. Die daraus resultierende Extrapolation unterlag daher einer erhöhten Unsicherheit, welche in den nachfolgenden Simulationen jedoch über entsprechende Konfidenzintervalle berücksichtigt wurde.

4.3.3 Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Aktivitäten

Zur ersten Validierung wurden Anfangsgeschwindigkeiten mit Substratkonzentrationen unterhalb der Überschusskonzentration aufgenommen. Diese Aktivitäten konnten im Folgenden mit den über die Michaelis-Menten-Kinetik berechneten Aktivitäten verglichen werden. Dieser Vergleich erlaubte eine erste Abschätzung der Genauigkeit der ermittelten kinetischen Parameter innerhalb der analytischen Methode. Die Standardabweichung der berechneten Aktivitäten wurde dabei über eine Fehlerfortpflanzung der Standardabweichungen der einzelnen Parameter berechnet. Tabelle 4.3 zeigt die verwendeten Anfangskonzentrationen.

Tabelle 4.3: Startkonzentrationen der eingesetzten Substrate und Cofaktoren in den Teilreaktionen R_1 bis R_3 .

Komponente	R_1	R_2	R_3
1,5-Pentandiol	100 mM	200 mM	–
Lactol	–	100 mM	100 mM
NAD ⁺	2 mM	–	2 mM
NADH	0,2 mM	0,2 mM	–

Mit dieser Auswahl konnten sowohl die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten als auch die Michaelis-Menten- und Inhibitionskonstanten überprüft werden. Die graphische Darstellung des Vergleiches befindet sich in Abbildung 4.8.

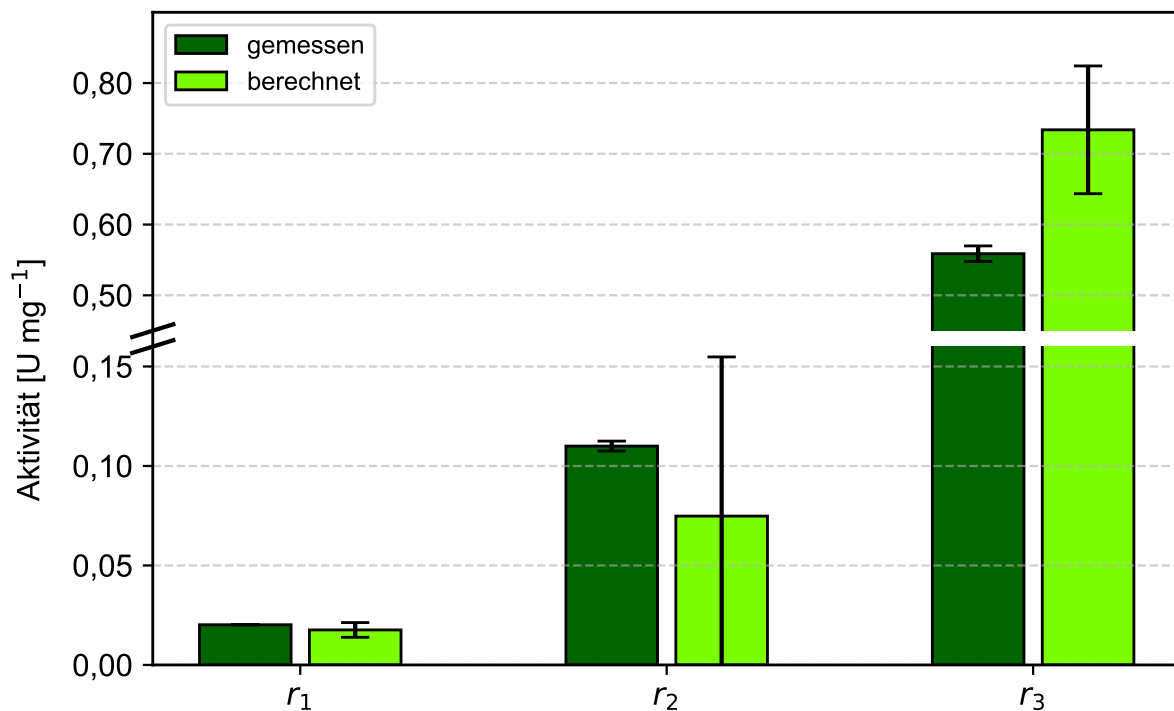


Abbildung 4.8: Vergleich der gemessenen und berechneten Aktivitäten (in U mg⁻¹) der Reaktionen R_1 bis R_3 .

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die berechneten Aktivitäten basieren auf den zuvor bestimmten kinetischen Parametern. Zur Bestimmung der Aktivität wurde für jede Reaktion ein Aktivitätsassay mit unterschiedlichen Startbedingungen durchgeführt: R_1 mit 100 mM 1,5-Pentandiol, 2 mM NAD⁺ und 0,2 mM NADH; R_2 mit 100 mM Lactol, 0,2 mM NADH und 200 mM 1,5-Pentandiol; sowie R_3 mit 100 mM Lactol und 2 mM NAD⁺. Als Puffer diente 50 mM KPi mit 1 mM Magnesiumchlorid. Ein Achsenbruch wurde eingefügt, um die gleichzeitige Darstellung niedriger und hoher Aktivitäten zu ermöglichen.

Es zeigt sich, dass für r_1 und r_2 eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und simulierten Aktivitäten bestand, da hier die gemessene Aktivität innerhalb der Fehlerbalken der berechneten Aktivität lag. Insbesondere bei r_2 fiel die hohe Standardabweichung der berechneten Aktivität auf. Für r_3 ergab sich eine leichte Abweichung von etwa $0,175 \pm 0,091$ U mg⁻¹, was einer relativen Abweichung von ungefähr 24 % entspricht.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die simulierten Aktivitäten größtenteils mit den experimentell bestimmten Werten übereinstimmten. Inwiefern die beobachtete Abweichung bei r_3 als auch die Unsicherheit bei r_2 Auswirkungen auf die Genauigkeit des Konzentrationsverlaufsmodells hat, wurde in den folgenden Abschnitten näher untersucht.

4.4 Modellierung

In diesem Kapitel wurde das zur Beschreibung des Reaktionssystems verwendete mathematische Modell vorgestellt. Zunächst wurde das System aus Differentialgleichungen definiert, welches den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen aller relevanten Metaboliten beschreibt. Dabei wurden die zuvor beschriebenen Reaktionsraten mit den ermittelten Parametern und Standardabweichungen berücksichtigt.

Anschließend wurde der Konzentrationsverlauf über die Zeit anhand numerischer Simulationen analysiert. Der zeitliche Verlauf diente dazu, die Dynamik des Reaktionssystems zu erfassen und zu prüfen, ob charakteristische Trends wie Substratverbrauch und Produktbildung realistisch abgebildet werden konnten.

Zum Abschluss erfolgte eine erste Validierung des Modells durch den Vergleich von simulierten Konzentrationen mit experimentellen Daten. Dabei wurde beurteilt, inwieweit die Simulation die beobachteten Verläufe reproduzieren kann. Auf dieser Grundlage wurde das Modell gezielt angepasst, um die Übereinstimmung mit den Messwerten zu verbessern und die Genauigkeit sowie die Vorhersagekraft weiter zu optimieren.

4.4.1 Modellsimulation zeigt effiziente Lactonbildung ohne Zwischenproduktakkumulation

Zur Beschreibung der zeitlichen Konzentrationsverläufe von 1,5-Pentandiol, Lactol, δ -Valerolacton, NAD^+ und NADH wurden im Folgenden die zugrunde liegenden differentiellen Gleichungen dargestellt. Diese setzen sich aus den zuvor beschriebenen Reaktionsraten zusammen (siehe Gleichung 4.1-4.3).

$$\frac{dc_{\text{PD}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.4)$$

$$\frac{dc_{\text{Lactol}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 \quad (4.5)$$

$$\frac{dc_{\text{Lacton}}}{dt} = r_3 \quad (4.6)$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 + r_2 - r_3 \quad (4.7)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 - r_2 + r_3 \quad (4.8)$$

Ausgehend von diesen Gleichungen ließen sich durch numerische Integration und Vorgabe geeigneter Anfangsbedingungen, wie beispielsweise der Konzentration von 1,5-Pentandiol oder NAD^+ , die zeitlichen Konzentrationsverläufe aller beteiligten Metabolite berechnen. Zusätzlich konnte eine variable Enzymkonzentration im Modell berücksichtigt werden.

Beispielhaft wurde eine Simulation mit folgenden Startbedingungen durchgeführt: 500 mM 1,5-Pentandiol, 20 mM NAD^+ und einer Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} . Die Konzentration der restlichen Metabolite wurde auf 0 mM gesetzt. Abbildung 4.9 zeigt die resultierenden Konzentrationsverläufe aller relevanten Metabolite über die Zeit.

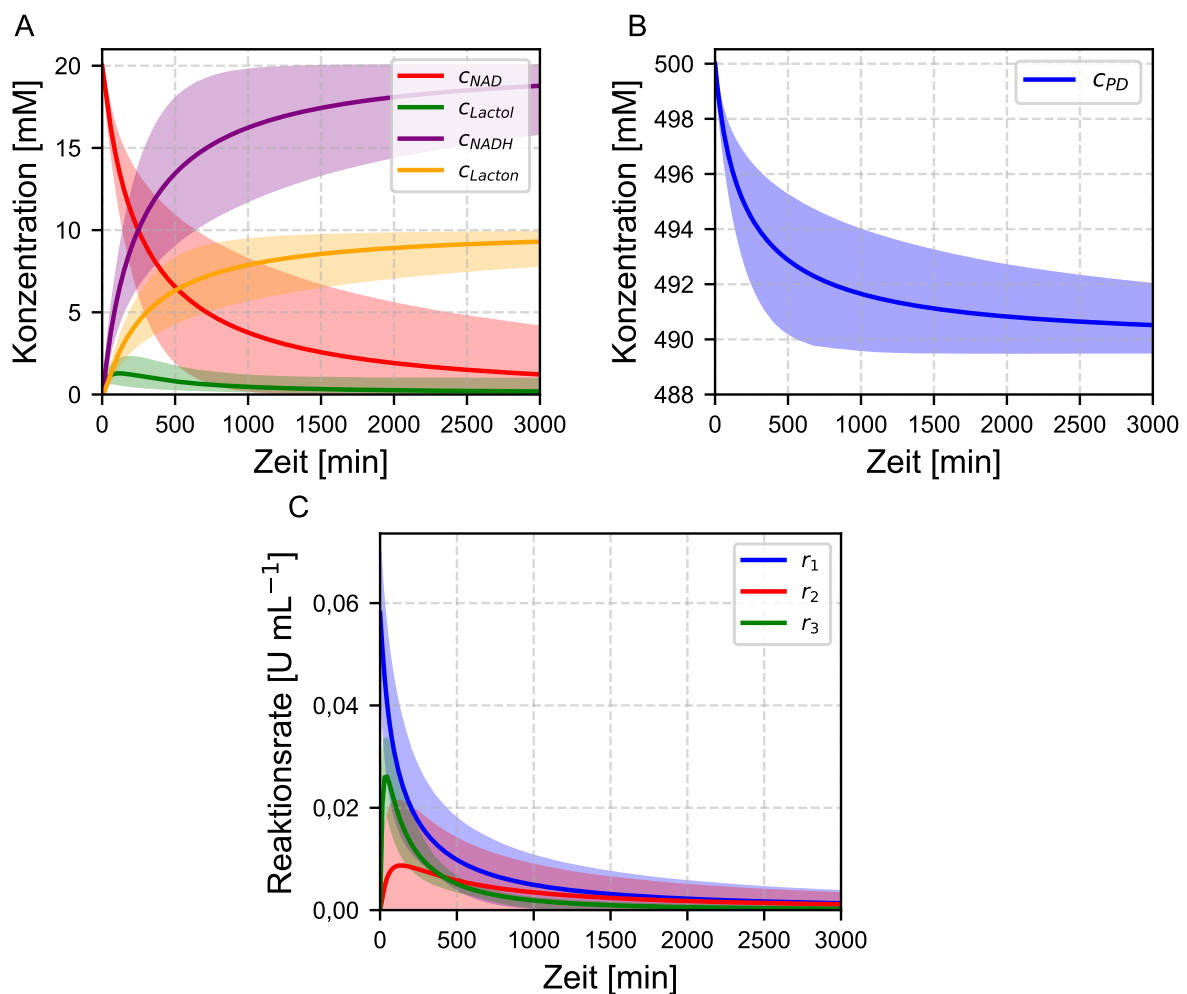


Abbildung 4.9: Simulierter zeitlicher Verlauf von Konzentrationen und Reaktionsraten.

Die Abbildung zeigt den Verlauf ausgewählter Metaboliten- und Cofaktorkonzentrationen sowie Reaktionsraten über 3000 min, basierend auf einer Anfangskonzentration von 500 mM 1,5-Pentandiol, 20 mM NAD^+ , 0 mM δ -Valerolacton, 0 mM Lactol, 0 mM NADH und einer Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} . Dargestellt sind Mittelwerte mit 95 %-Konfidenzintervallen aus 10 000 Monte-Carlo-Simulationen. Panel A zeigt die Konzentrationen von NAD^+ , NADH, Lactol und δ -Valerolacton, Panel B den zeitlichen Abbau von 1,5-Pentandiol und Panel C die Reaktionsraten r_1 , r_2 und r_3 .

Dabei zeigt Abbildung 4.9A den Verlauf von NAD^+ , NADH , Lactol und δ -Valerolacton. Es ist zu erkennen, dass nach 3000 Minuten beinahe alles an NAD^+ zu NADH umgewandelt wurde. Somit stellte sich zum Ende der Reaktion eine Konzentration von beinahe 10 mM an Produkt δ -Valerolacton ein. Zudem ließ sich keine Akkumulation des Zwischenproduktes Lactol über die Zeit beobachten. Nach einem kurzen Anstieg der Konzentration in den ersten Minuten, folgte eine stetige Abnahme. Die Konzentration von 1,5-Pentandiol nahm stetig ab und erreichte nach 3000 Minuten eine Konzentration von 490 mM (siehe Abbildung 4.9B).

Zu Beginn verlief die Reaktion R_1 am schnellsten. Obwohl sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, erreichte sie aufgrund der hohen Substratkonzentrationen absolut die höchste Reaktionsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 4.9C). Für r_2 zeigte sich erneut die größte Unsicherheit. Die Reaktionsrate r_3 stieg in den ersten Minuten auf über $0,02 \text{ U mg}^{-1}$ an, nahm jedoch im weiteren Verlauf mit abnehmender Konzentration des Zwischenprodukts wieder ab.

4.4.2 Realistische Abbildung der Lactol-Konzentration, δ -Valerolacton erfordert Erweiterung des Modells

Im nächsten Schritt wurde das aufgestellte mathematische Modell anhand experimenteller Daten validiert. Zu diesem Zweck wurde die enzymatische Reaktion mit drei unterschiedlichen Startkonzentrationen von 1,5-Pentandiol durchgeführt. Die Experimente fanden unter konstanten Bedingungen statt. Es wurden 10 mM NAD^+ und eine Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} verwendet. Als Variable diente ausschließlich die Ausgangskonzentration von 1,5-Pentandiol, die auf 20 mM, 100 mM und 250 mM eingestellt wurde. Zu definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 48 Stunden wurden Proben entnommen und anschließend analysiert. Durch den Vergleich der so gewonnenen Konzentrationsverläufe mit den Vorhersagen des Simulationsmodells ließ sich die Qualität des Modells im Hinblick auf seine Prognosefähigkeit evaluieren.

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der 1,5-Pentandiol-Konzentration betrachtet (siehe Abbildung 4.10). Die Darstellung zeigt sowohl die experimentell gemessenen Konzentrationen inklusive Standardabweichungen als auch die simulierten Mittelwerte samt 95 %-Konfidenzintervallen, welche auf 10 000 Monte-Carlo-Simulationen basieren.

Die Abbildung verdeutlicht starke Abweichungen zwischen Simulation und experimentellen Daten. Sowohl bei niedriger als auch bei hoher Startkonzentration wichen die Messwerte erheblich von den simulierten Verläufen ab. Besonders auffällig sind dabei zwei Aspekte. Zum einen traten große absolute Unterschiede in den Konzentrationswerten auf, wobei einige Messpunkte weit außerhalb des vorhergesagten Konfidenzintervalls lagen. Zum anderen war bei zwei der drei Varianten (siehe Abbildung 4.10B und C) ein Anstieg der 1,5-Pentandiol-Konzentration über

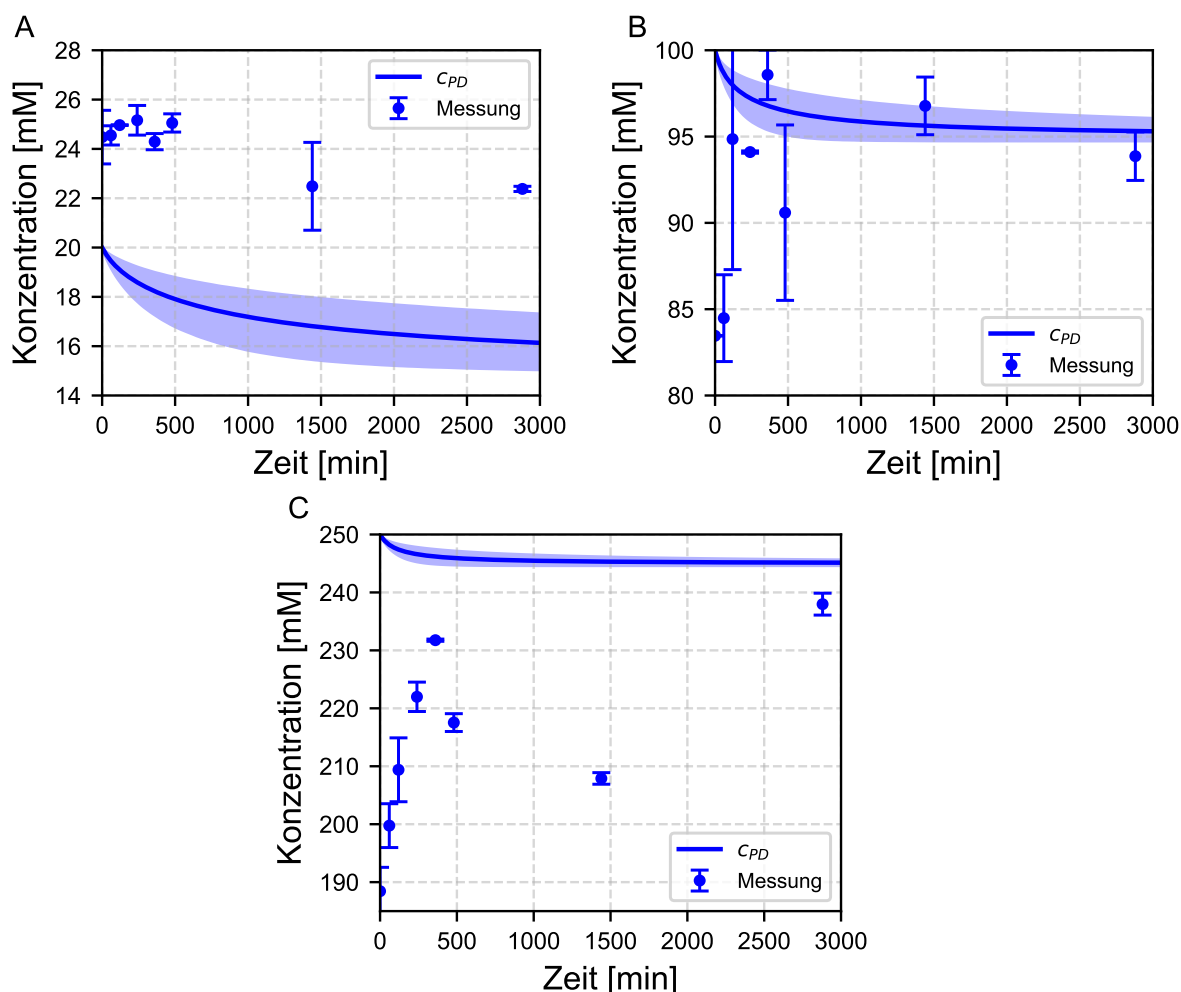


Abbildung 4.10: Vergleich von Simulation und Messdaten des zeitlichen Verlaufs der 1,5-Pentandiol-Konzentration bei variierender 1,5-Pentandiol-Startkonzentration.

Die Abbildung zeigt den simulierten zeitlichen Verlauf der 1,5-Pentandiol-Konzentration bei Startkonzentrationen von 20 mM, 100 mM und 250 mM. Dargestellt sind Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle aus 10 000 Monte-Carlo-Simulationen sowie experimentelle Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen erfolgten jeweils mit den genannten 1,5-Pentandiol-Startkonzentrationen, 10 mM NAD⁺, 1 mg mL⁻¹ Enzym, in 800 μ L Reaktionsvolumen bei 30 °C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid.

die Zeit zu beobachten. Dieser Verlauf ist nicht plausibel und deutet auf eine Optimierung der Analytik hin. Aufgrund dieser Inkonsistenzen wurde die Messung von 1,5-Pentandiol als nicht zuverlässig bewertet und in den weiteren Auswertungen nicht mehr berücksichtigt.

Stattdessen wurde der Fokus auf die Analyse der Reaktionsprodukte Lactol und δ -Valerolacton gelegt. Abbildung 4.11 zeigt den Vergleich der simulierten Verläufe mit den experimentellen Daten für diese beiden Metaboliten.

Im Vergleich zur 1,5-Pentandiol-Kinetik zeigten sich hier deutlich bessere Übereinstimmungen zwischen Simulation und experimentellen Konzentrationsverlauf. Bis zu einem Zeitpunkt von etwa 500 min befanden sich die gemessenen Werte von Lactol und δ -Valerolacton überwiegend

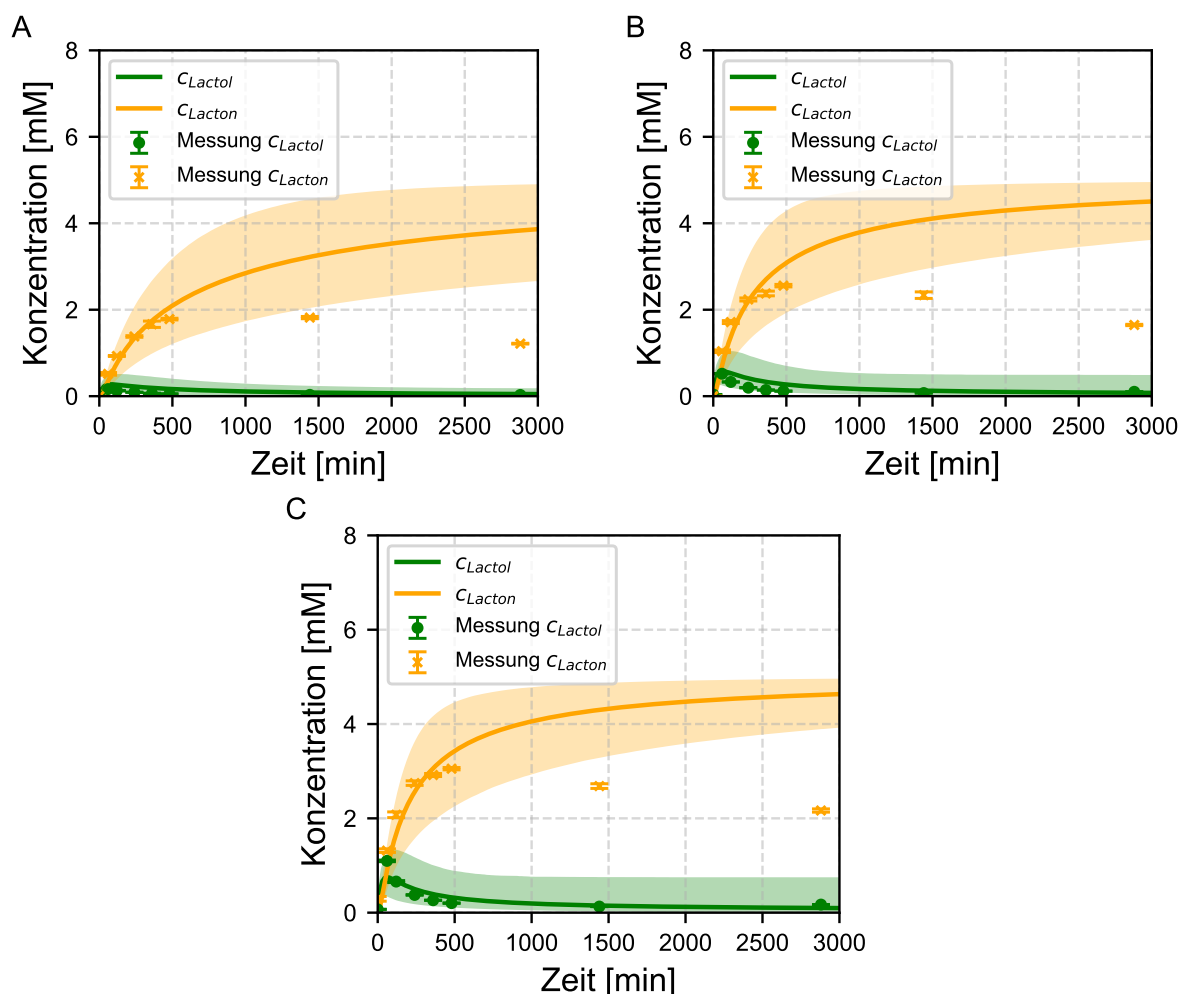


Abbildung 4.11: Vergleich von simulierten und gemessenen Konzentrationen von Lactol und δ -Valerolacton bei variierender 1,5-Pentandiol-Konzentration.

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von Lactol (blau) und δ -Valerolacton (orange) über 3000 min bei drei Startkonzentrationen von Pentandiol: 20 mM (A), 100 mM (B) und 250 mM (C). Dargestellt sind Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle aus 10 000 Monte-Carlo-Simulationen sowie experimentelle Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen erfolgten jeweils mit den genannten 1,5-Pentandiol-Startkonzentrationen, 10 mM NAD^+ , 1 mg mL^{-1} Enzym, in 800 μL Reaktionsvolumen bei 30 °C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid.

innerhalb der vorhergesagten Konfidenzintervalle. Dies galt für alle drei Varianten der Startkonzentration. Die Entwicklung der Lactol-Konzentration wurde vom Modell über den gesamten Zeitraum hinweg realistisch abgebildet, was auf eine gute Modellierung der intermediären Reaktionsschritte hinweist. Im Fall von δ -Valerolacton kam es ab etwa 480 min jedoch zu leichten Abweichungen. Nach 1440 min lagen die Messwerte nicht mehr im Bereich der Konfidenzintervalle. Die experimentell gemessenen Konzentrationen stagnierten beziehungsweise nahmen leicht ab, während die Simulation weiterhin einen kontinuierlichen Anstieg vorhersagte.

Da eine Rückreaktion ausgeschlossen wurde, könnte dieses Verhalten auf einen nachgeschalteten Abbauprozess hindeuten, der im aktuellen Modell nicht berücksichtigt wurde. Denkbar wäre etwa eine nicht enzymatische Hydrolyse von δ -Valerolacton unter wässrigen Reaktionsbedingungen. Solch ein Effekt würde zu einem Rückgang der gemessenen Konzentration führen, obwohl das eigentliche biochemische System diesen Verlauf nicht vorsieht.

Insgesamt zeigte der Vergleich, dass das Modell in der Lage ist, die initiale Dynamik der Umwandlung realistisch abzubilden. Die systematische Abweichung der δ -Valerolacton-Konzentrationen zu späteren Zeitpunkten legte jedoch nahe, dass Erweiterungen des Modells, zum Beispiel durch Einbeziehung zusätzlicher Abbaureaktionen oder Inaktivierungseffekte, notwendig sind, um auch den Langzeitverlauf zuverlässig zu beschreiben.

4.4.3 Erweiterung um Enzyminaktivierung und Hydrolyse verbessert Modellgüte deutlich

Eine mögliche Erklärung für die zu frühe Stagnation der δ -Valerolacton-Konzentration könnte eine Inaktivierung der *Lb*ADH über die Zeit sein. Dieses Phänomen erklärt jedoch nicht die beobachtete Abnahme der Konzentration. In verschiedenen literarischen Quellen finden sich Hinweise auf eine Hydrolyse von Lactonen, wie ϵ -Caprolacton in wässriger Umgebung [56–58]. Um das Modell final zu validieren und zu verfeinern, wurden im Folgenden beide Aspekte experimentell untersucht.

4.4.3.1 Langsame Enzyminaktivierung unter Reaktionsbedingungen

Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms proportional zur Konzentration des aktiven Enzyms ist, kann zur Beschreibung der Inaktivierung v_{\max} verwendet werden. Der Prozess folgt einer Reaktion erster Ordnung und wird durch die Inaktivierungskonstante k_d beschrieben. Die zeitliche Änderung von $v_{\max}(t)$ ergibt sich durch die Differentialgleichung:

$$\frac{dv_{\max}}{dt} = -k_d \cdot v_{\max} \quad (4.9)$$

Die Lösung dieser Gleichung beschreibt den exponentiellen Zerfall von v_{\max} im Zeitverlauf:

$$v_{\max}(t) = v_{\max,0} \cdot e^{-k_d t} \quad (4.10)$$

Zur Untersuchung der Enzyminaktivierung wurde das Enzym unter Reaktionsbedingungen inkubiert, und in definierten Zeitabständen wurde die Aktivität bei konstanten Substratkonzen-

trationen bestimmt. Aus dem zeitlichen Verlauf (siehe Abbildung 4.12) der Aktivität ließ sich eine Inaktivierungskonstante ermitteln.

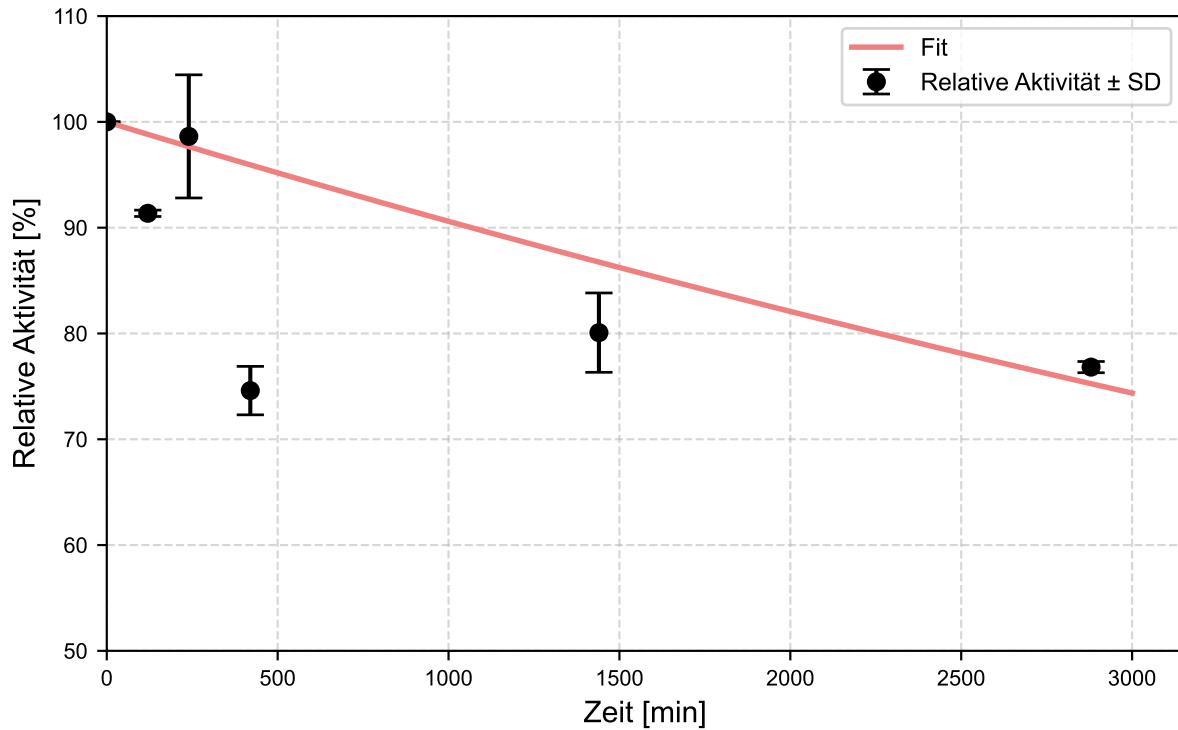


Abbildung 4.12: Bestimmung der Inaktivierungskinetik des Enzyms.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Enzymaktivität bei 30 °C in unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid. Die Punkte zeigen die gemessene Aktivität in Prozent bezogen auf den Startwert, jeweils mit zugehöriger Standardabweichung. Der exponentielle Fit (blaue Linie) basiert auf einer gewichteten Regression mit Standardabweichungen. Die berechnete Inaktivierungskonstante beträgt $k_d = 0,0059 \pm 0,0018 \text{ h}^{-1}$, entsprechend einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 117,02 \pm 2,88 \text{ h}$.

Die Abbildung zeigt, dass die Enzymaktivität über die Zeit leicht abnahm. Nach 48 h lag noch etwa 80 % der ursprünglichen Aktivität vor. Obwohl die Aktivitätswerte merklich streuten, ließ sich durch einen Reaktion 1. Ordnung eine Inaktivierungskonstante von $k_d = 0,0059 \pm 0,0018 \text{ h}^{-1}$ bestimmen, was einer Halbwertszeit von $117,02 \pm 2,88 \text{ h}$ entsprach.

4.4.3.2 Hydrolyse von δ -Valerolacton

Die Hydrolyse wurde untersucht, indem δ -Valerolacton in einer Konzentration von 5 mM bis 10 mM in KPi-Puffer gelöst und bei 30 °C inkubiert wurde. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit mit den zuvor durchgeführten Versuchen blieben sowohl die Probenvor- als auch die -nachbereitung unverändert. Die Konzentration von δ -Valerolacton wurde mithilfe der GCMS nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 und 48 Stunden bestimmt. Der zeitliche Konzentrationsverlauf ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

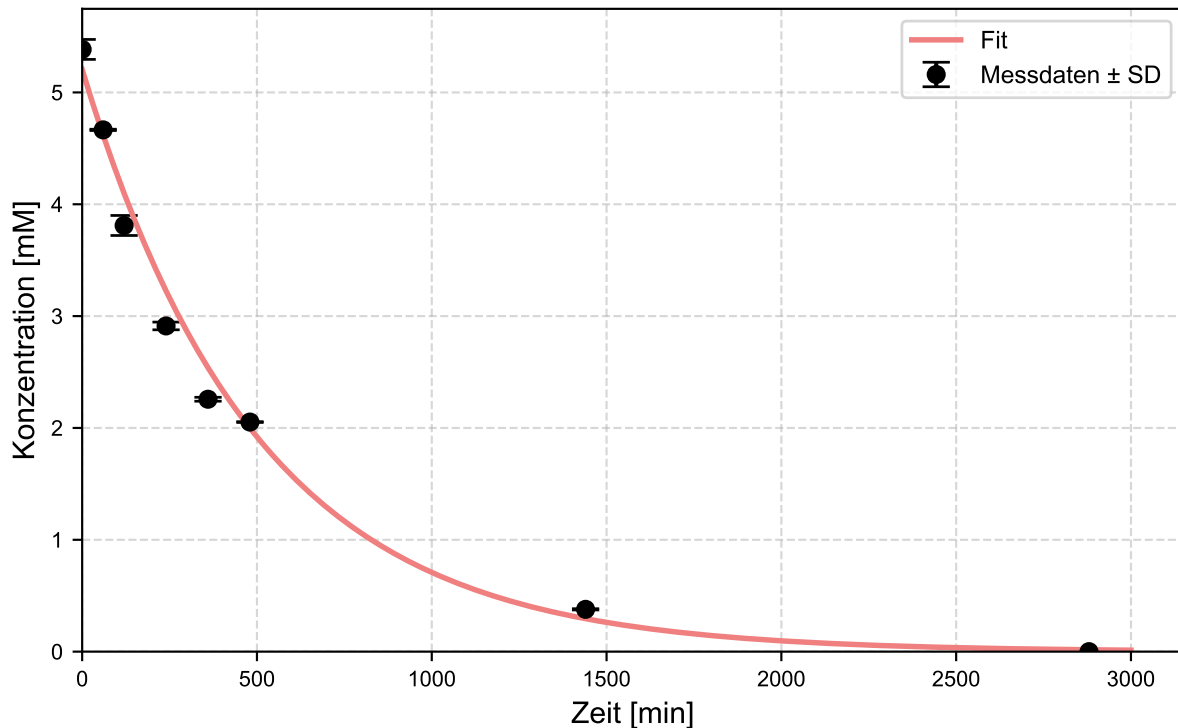


Abbildung 4.13: Bestimmung der Hydrolysekinetik von δ -Valerolacton.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der δ -Valerolacton-Konzentration bei 30 °C unter Verwendung von 50 mM KPiPuffer mit 1 mM Magnesiumchlorid.. Die schwarzen Punkte zeigen die gemessenen Konzentrationen in mM mit zugehöriger Standardabweichung. Der exponentielle Fit (blaue Linie) basiert auf einer gewichteten Regression unter Annahme einer Kinetik erster Ordnung. Die ermittelte Zerfallskonstante beträgt $k_{\text{hyd}} = 0,119 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$, entsprechend einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 5,8 \pm 0,2 \text{ h}$.

Über den Fit einer Kinetik erster Ordnung konnte eine Hydrolysekonstante von $0,119 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ bestimmt werden. Diese beschreibt den nicht-enzymatischen Abbau des Lactons in wässriger Lösung. Die entsprechende Halbwertszeit beträgt $t_{1/2} = 5,8 \pm 0,2 \text{ h}$. Aus Abbildung 4.13 geht zudem hervor, dass nach 48 Stunden kein δ -Valerolacton mehr nachweisbar war, was auf eine vollständige Hydrolyse innerhalb dieses Zeitraums unter den gewählten Bedingungen hinweist.

4.4.3.3 Modellerweiterung durch Enzyminaktivierung und Hydrolyse

Die Einführung von sowohl der Enzyminaktivierung als auch der Hydrolysereaktion hatte Auswirkungen auf die mathematische Beschreibung des Gesamtsystems. Sowohl die Reaktionsraten als auch die zugrunde liegenden Differentialgleichungen mussten entsprechend erweitert werden. Die nachfolgend dargestellten Gleichungen bilden den aktualisierten Stand des Modells ab. Die Gleichungen 4.4, 4.5, 4.7 und 4.8 bleiben dabei unverändert.

Die Reaktionsraten r_1^+ bis r_3^+ beinhalten nun einen zeitabhängigen Abnahme der Aktivität über den Faktor $e^{-k_d \cdot t}$, während r_4 die neue, nicht-enzymatische Hydrolyse beschreibt:

$$r_1^+ = \frac{v_{\max,1}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{PD}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{(c_{\text{PD}} + K_{m,\text{PD},1}^{\text{app}}) \cdot \left(c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,1}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_{i,\text{NADH},1}^{\text{app}}} \right) \right)} \quad (4.11)$$

$$r_2^+ = \frac{v_{\max,2}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{Lactol}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left(c_{\text{Lactol}} + K_{m,\text{Lactol},2}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{PD}}}{K_{i,\text{PD},2}^{\text{app}}} \right) \right) \cdot (c_{\text{NADH}} + K_{m,\text{NADH},2}^{\text{app}})} \quad (4.12)$$

$$r_3^+ = \frac{v_{\max,3}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{Lactol}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left(c_{\text{Lactol}} + K_{m,\text{Lactol},3}^{\text{app}} \right) \cdot (c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,3}^{\text{app}})} \quad (4.13)$$

$$r_4 = k_{\text{hyd}} \cdot c_{\text{Lacton}} \quad (4.14)$$

Die zugehörige Differentialgleichung für den δ -Valerolacton-Konzentrationsverlauf (zuvor Gleichung 4.6) lautet nun entsprechend:

$$\frac{dc_{\text{Lacton}}}{dt} = r_3^+ - r_4 \quad (4.15)$$

Basierend auf dem erweiterten Modell wurden die zuvor durchgeführten Simulationen erneut berechnet. Abbildung 4.14 zeigt die simulierten Konzentrationsverläufe von Lactol und δ -Valerolacton im Vergleich zu den experimentell gemessenen Werten. Die Simulationen wurden jeweils für drei verschiedene Startkonzentrationen von 1,5-Pentandiol (20 mM, 100 mM und 250 mM) durchgeführt.

Die simulierten Konzentrationen von δ -Valerolacton zeigten unter Berücksichtigung der Hydrolyse einen deutlich schnelleren Abfall als in den experimentellen Daten. Während die Simulation zu Beginn noch gut mit den Messwerten übereinstimmte, variierte die Dauer dieser Übereinstimmung in Abhängigkeit von der eingesetzten Startkonzentration (siehe Abbildung 4.14).

In den Panels A und B lagen die experimentellen Daten bis etwa 500 min im Konfidenzbereich der Simulation. Bei einer Startkonzentration von 250 mM Pentandiol (Panel C) war dies nur bis etwa 180 min der Fall. Ab diesem Zeitpunkt fiel die simulierte δ -Valerolacton-Konzentration deutlich schneller ab als in den experimentellen Beobachtungen.

Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die tatsächliche Hydrolysegeschwindigkeit unter Reaktionsbedingungen geringer war als unter idealisierten Bedingungen (reiner KPi-Puffer bei 30 °C). Diese Abweichung lässt vermuten, dass zusätzliche Einflussfaktoren im Reaktionssystem die Hydrolyse von δ -Valerolacton verlangsamt hatten.

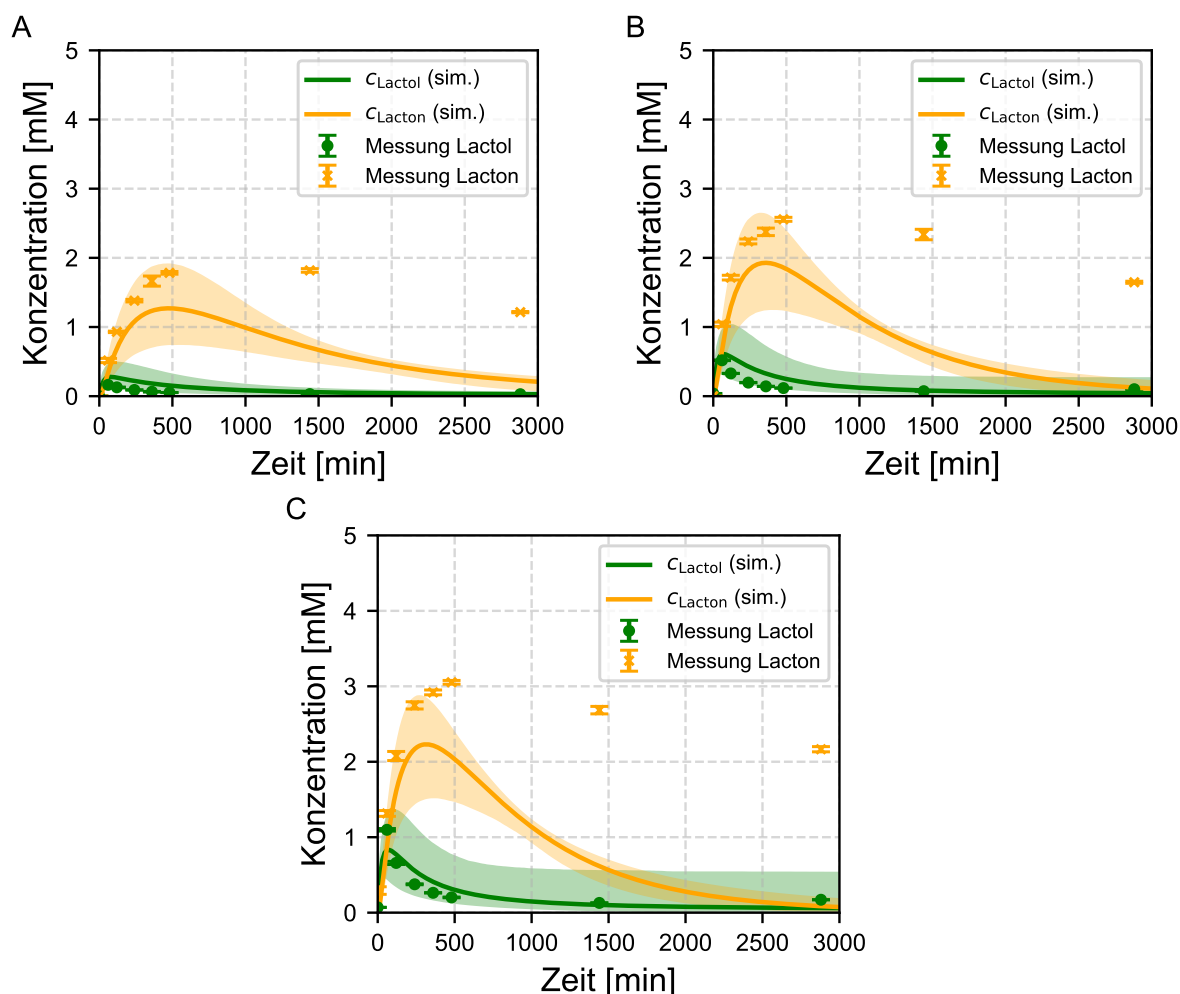


Abbildung 4.14: Simulierte und gemessene Konzentrationen von Lactol und δ -Valerolacton unter Berücksichtigung von Enzyminaktivierung und Hydrolyse.

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von Lactol (grün) und δ -Valerolacton (orange) über 3000 min bei drei Startkonzentrationen von 1,5-Pentandiol: 20 mM (A), 100 mM (B) und 250 mM (C). Die Simulation basiert auf einem erweiterten Modell mit Enzyminaktivierung und Lacton-Hydrolyse. Dargestellt sind Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle aus 10 000 Monte-Carlo-Simulationen sowie experimentelle Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen erfolgten jeweils mit den genannten 1,5-Pentandiol-Startkonzentrationen, 10 mM NAD^+ , 1 mg mL⁻¹ Enzym, in 800 μL Reaktionsvolumen bei 30 °C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid.

Aus diesem Grund waren weiterführende Untersuchungen der Hydrolyse unter reaktionsnahen Bedingungen erforderlich. Diese werden im folgenden Kapitel beschrieben.

4.4.3.4 Optimierung des Modells durch angepasste Hydrolysekonstante

Vor diesem Hintergrund wurde die Hydrolyse von δ -Valerolacton gezielt unter realitätsnäheren Bedingungen untersucht. Ziel war es zu überprüfen, ob der zuvor bestimmte Zerfall tatsächlich mit den Bedingungen im Reaktionsansatz übereinstimmt. Dafür wurde die Hydrolyse erneut durchgeführt, diesmal jedoch nicht im reinen KPi-Puffer, sondern im vollständigen Reakti-

Ansatz unter Ausschluss der enzymatischen Umsetzung. Das Enzym wurde hierfür aus dem Ansatz weggelassen, sodass die δ -Valerolacton-Konzentration nicht durch enzymatische Prozesse beeinflusst werden konnte. Zudem wurde GlycinNaOH als weiterer Puffer untersucht. Die Bestimmung des zeitlichen Konzentrationsverlaufs erfolgte analog zur vorherigen Hydrolyseanalyse mittels GCMS. Anschließend wurde die erhaltenen Messreihen unter Annahme einer Kinetik erster Ordnung analysiert.

Der resultierenden Fits sind im Anhang dargestellt (siehe Abbildung A.14-A.15). Die ermittelten Hydrolysekonstanten und Halbwertszeiten wurden tabellarisch zusammengefasst und sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Diese Ergebnisse ermöglichen eine differenzierte Bewertung der Hydrolyse unter praxisnahen Bedingungen und liefern die Grundlage für eine weitere Verfeinerung des Modells.

Tabelle 4.4: Ermittelte Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten der Lacton-Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen.

Bedingung	$k_{\text{hyd}} [\text{h}^{-1}]$	$t_{1/2} [\text{h}]$
KPi pH 8	$0,119 \pm 0,004$	$5,8 \pm 0,2$
GlycinNaOH pH 9	$0,023 \pm 0,002$	$30,5 \pm 2,5$
Startbed. ohne Enzym	$0,033 \pm 0,001$	$21,2 \pm 0,6$

Es zeigt sich, dass δ -Valerolacton in GlycinNaOH-Puffer am stabilsten war, da hier eine Halbwertszeit von über 30 Stunden erreicht wurde. Auffällig war zudem die starke Abweichung unter reaktionsnahen Bedingungen zum KPi-Puffer. Dies deutet darauf hin, dass weitere Komponenten im Reaktionsgemisch einen erheblichen Einfluss auf die Hydrolyse hatten.

Für die unter Reaktionsbedingungen ermittelte Hydrolysekonstante wurden daraufhin neue Simulationen durchgeführt. Die resultierenden Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 4.15 dargestellt.

Es ist klar zu erkennen, dass die simulierten Konzentrationsverläufe wesentlich besser mit den experimentellen Daten übereinstimmten. In allen drei Reaktionsansätzen (A–C) lagen die Messpunkte für die Lactol und δ -Valerolacton Konzentration nahezu vollständig innerhalb der jeweiligen 95 %-Konfidenzintervalle der Simulationen. Lediglich ein einzelner Messwert, bei etwa 2880 min in Abbildung 4.15C, wich leicht vom prognostizierten Intervall ab. Angesichts der experimentellen Unsicherheiten konnte dieser Unterschied jedoch als akzeptabel betrachtet werden.

Die Integration der experimentell bestimmten Hydrolysekonstante sowie der zeitabhängigen Enzyminaktivierung ermöglichte somit eine realitätsnahe Modellierung des Reaktionssystems.

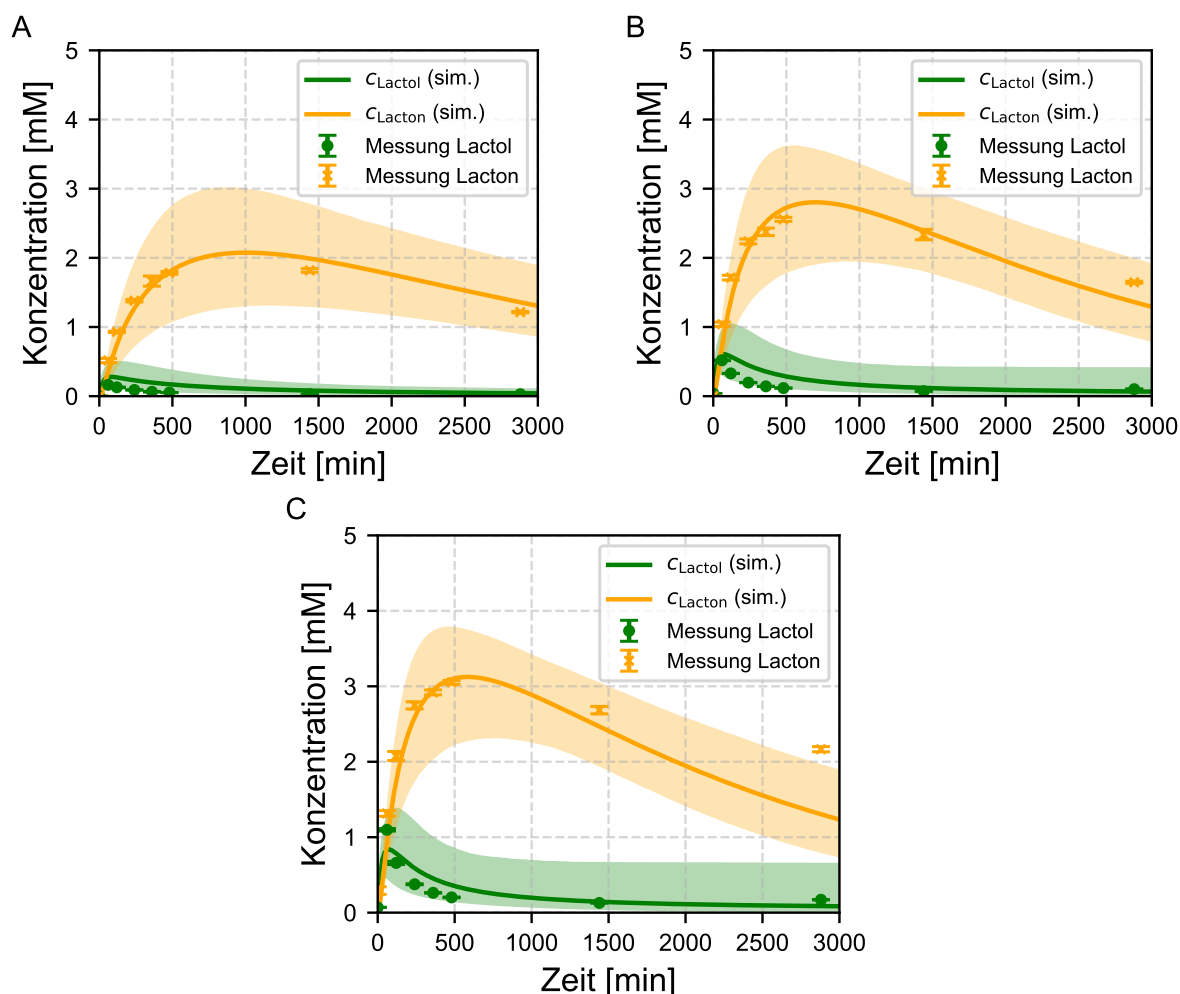


Abbildung 4.15: Simulierte und gemessene Konzentrationen von Lactol und δ -Valerolacton unter Berücksichtigung optimierter Modellparameter.

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von Lactol (grün) und δ -Valerolacton (orange) über 3000 min bei drei Startkonzentrationen von 1,5-Pentandiol: 20 mM (A), 100 mM (B) und 250 mM (C). Die Simulation erfolgte mit den optimierten Hydrolysekonstanten. Dargestellt sind Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle aus 10 000 Monte-Carlo-Simulationen sowie experimentelle Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen erfolgten jeweils mit den genannten 1,5-Pentandiol-Startkonzentrationen, 10 mM NAD^+ , 1 mg mL^{-1} Enzym, in 800 μL Reaktionsvolumen bei 30 °C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid.

Das Modell bildete sowohl die Konzentration des Zwischenprodukts als auch den Abbau des Produkts zuverlässig ab. Es konnte daher als hinreichend valide angesehen werden und bietet eine belastbare Grundlage für weiterführende Analysen und Optimierungen.

4.5 Cofaktorregenerierung

In diesem Kapitel wurde die Bedeutung einer Cofaktorregenerierung im Kontext des vorgestellten Reaktionssystems untersucht. Ziel war es ein regeneratives System auf Basis von

Isopropanol und Aceton detailliert zu beschreiben und in das bestehende Modell zu integrieren beziehungsweise dahingehend zu erweitern.

Das erweiterte Reaktionssystem mit den zugehörigen Reaktionsraten ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

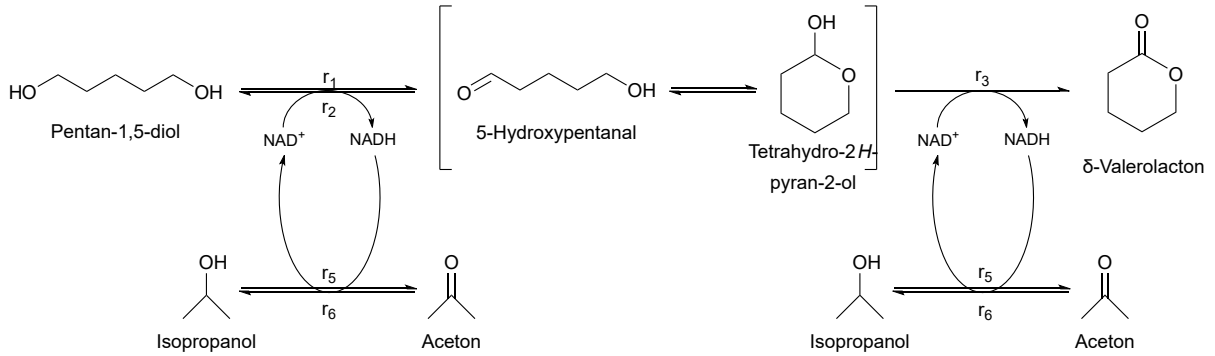


Abbildung 4.16: Erweiterte Reaktionsgleichung mit Cofaktorregenerierungssystem.

Zur Verbesserung der Cofaktornutzung wird NADH über ein gekoppeltes Regenerierungssystem aus Isopropanol und Aceton erneut zu NAD⁺ oxidiert. Die Oxidation von Isopropanol wird durch r_5 und die Reduktion von Aceton durch r_6 beschrieben.

Im Zuge der Systemerweiterung wurden die Reaktionsraten r_5 und r_6 , welche das Cofaktorregenerierungssystem beschreiben, erstmals kinetisch charakterisiert. Als Enzym diente weiterhin die Variante G37D. Zusätzlich wurden für die bestehenden Reaktionsraten r_1 bis r_3 neue Inhibitionskonstanten ermittelt (siehe Gleichungen 4.16–4.18).

Die Methodik zur Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte analog zu den bisherigen kinetischen Betrachtungen über einen Aktivitätsassay. Die Fit-Ergebnisse sind im Anhang dokumentiert (siehe Abbildungen A.11–A.13 sowie A.16–A.17). Die mathematischen Ausdrücke der Reaktionsraten r_1^* bis r_3^* sowie r_5^* und r_6^* sind im Folgenden dargestellt; die Reaktionsrate r_4 blieb unverändert.

$$r_1^* = \frac{v_{\max,1}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{CPD}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left(c_{\text{CPD}} + K_{m,\text{PD},1}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Aceton}}}{K_{i,\text{Aceton},1}^{\text{app}}} \right) \right) \cdot \left(c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,1}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_{i,\text{NADH},1}^{\text{app}}} \right) \right)} \quad (4.16)$$

$$r_2^* = \frac{v_{\max,2}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{Lactol}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left(c_{\text{Lactol}} + K_{m,\text{Lactol},2}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{CPD}}}{K_{i,\text{PD},2}^{\text{app}}} + \frac{c_{\text{IP}}}{K_{i,\text{IP},2}^{\text{app}}} \right) \right) \cdot \left(c_{\text{NADH}} + K_{m,\text{NADH},2}^{\text{app}} \right)} \quad (4.17)$$

$$r_3^* = \frac{v_{\max,3}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{Lactol}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left(c_{\text{Lactol}} + K_{m,\text{Lactol},3}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Lactol}}}{K_{i,\text{Aceton},3}^{\text{app}}} \right) \right) \cdot \left(c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,3}^{\text{app}} \right)} \quad (4.18)$$

$$r_5^* = \frac{v_{\max,5}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{IP}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left(c_{\text{IP}} + K_{m,\text{IP},5}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Aceton}}}{K_{i,\text{Aceton},5}^{\text{app}}}\right)\right) \cdot \left(c_{\text{NAD}^+} + K_{m,\text{NAD}^+,5}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_{i,\text{NADH},5}^{\text{app}}}\right)\right)} \quad (4.19)$$

$$r_6^* = \frac{v_{\max,6}^{\text{app}} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{\text{Aceton}}}{\left(c_{\text{Aceton}} + \frac{c_{\text{Aceton}}^2}{K_{i,\text{Aceton},6}^{\text{app}}} + K_{m,\text{Aceton},6}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{IP}}}{K_{i,\text{IP},6}^{\text{app}}} + \frac{c_{\text{PD}}}{K_{i,\text{PD},6}^{\text{app}}}\right)\right)} \cdot \frac{c_{\text{NADH}}}{\left(c_{\text{NADH}} + K_{m,\text{NADH},6}^{\text{app}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_{i,\text{NAD}^+,6}^{\text{app}}}\right)\right)} \quad (4.20)$$

Alle kinetischen Parameter einschließlich ihrer Standardabweichungen sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5: Kinetische Parameter der Reaktionen R_1 – R_3 , R_5 und R_6 einschließlich Standardabweichungen.

Parameter	Einheit	Wert	Standardabw.
Reaktionsrate r_1^*			
$v_{\max,1}^{\text{app}}$	U mg^{-1}	0,08	0,0071
$K_{m,\text{PD},1}^{\text{app}}$	mM	96,91	20,24
$K_{m,\text{NAD}^+,1}^{\text{app}}$	mM	1,88	0,53
$K_{i,\text{NADH},1}^{\text{app}}$	mM	0,78	0,27
$K_{i,\text{Aceton},1}^{\text{app}}$	mM	1,20	0,28
Reaktionsrate r_2^*			
$v_{\max,2}^{\text{app}}$	U mg^{-1}	3,54	2,56
$K_{m,\text{Lactol},2}^{\text{app}}$	mM	125,63	6,44
$K_{m,\text{NADH},2}^{\text{app}}$	mM	2,90	2,43
$K_{i,\text{PD},2}^{\text{app}}$	mM	315,87	115,47
$K_{i,\text{IP},2}^{\text{app}}$	mM	4,12	4,41

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.5

Parameter	Einheit	Wert	Standardabw.
Reaktionsrate r_3^*			
$v_{\max,3}^{\text{app}}$	U mg^{-1}	2,42	0,14
$K_{m,\text{Lactol},3}^{\text{app}}$	mM	59,59	9,30
$K_{m,\text{NAD}^+,3}^{\text{app}}$	mM	2,13	0,38
$K_{i,\text{Aceton},3}^{\text{app}}$	mM	1,95	0,37
Reaktionsrate r_5^*			
$v_{\max,5}^{\text{app}}$	U mg^{-1}	8,14	0,12
$K_{m,\text{IP},5}^{\text{app}}$	mM	9,15	2,18
$K_{m,\text{NAD}^+,5}^{\text{app}}$	mM	0,035	0,013
$K_{i,\text{Aceton},5}^{\text{app}}$	mM	0,086	0,020
$K_{i,\text{NADH},5}^{\text{app}}$	mM	0,033	0,014
Reaktionsrate r_6^*			
$v_{\max,6}^{\text{app}}$	U mg^{-1}	32,57	8,49
$K_{m,\text{Aceton},6}^{\text{app}}$	mM	38,36	5,06
$K_{m,\text{NADH},6}^{\text{app}}$	mM	1,63	0,54
$K_{i,\text{Aceton},6}^{\text{app}}$	mM	1327,34	190,89
$K_{i,\text{IP},6}^{\text{app}}$	mM	2,06	0,31
$K_{i,\text{PD},6}^{\text{app}}$	mM	27,24	8,05
$K_{i,\text{NAD}^+,6}^{\text{app}}$	mM	0,61	0,12

Mit der Einführung der beiden zusätzlichen Komponenten Isopropanol und Aceton hatte sich die Komplexität des betrachteten Reaktionssystems deutlich erhöht. Durch das erweiterte Co-faktorregenerierungssystem entstanden zwei zusätzliche Reaktionen (R_5 und R_6). Gleichzeitig beeinflussten Isopropanol und Aceton als Inhibitoren auch die übrigen Reaktionsschritte.

In den Reaktionsraten r_1^* bis r_3^* wurden daher zusätzliche Inhibitionsmechanismen integriert, um die experimentell beobachteten Effekte dieser Substanzen abzubilden. Insbesondere Aceton zeigte dabei eine deutliche hemmende Wirkung, was durch die sehr niedrigen Inhibitionskonstanten K_i für diese Reaktionen bestätigt wird. Diese K_i -Werte lagen deutlich unter denen der zuvor bestimmten Inhibitoren und wiesen auf eine starke Inhibition bereits bei vergleichsweise geringen Konzentrationen hin.

Besonders hervorzuheben ist die Reaktionsrate r_6^* , die die Reduktion von Aceton durch NADH beschreibt. Diese Reaktion weist die komplexeste kinetische Beschreibung innerhalb des erweiterten Modells auf, da sie neben einer Substratüberschussinhibition auch drei zusätzliche kompetitive Hemmungen berücksichtigt.

Die maximalen apparenten Reaktionsgeschwindigkeiten von sowohl r_5^* als auch r_6^* lagen deutlich über denen der anderen Reaktionen. Mit Aceton als Substrat konnte ein v_{\max}^{app} von $32,57 \pm 8,49 \text{ U mg}^{-1}$ und mit Isopropanol von $8,14 \pm 0,12 \text{ U mg}^{-1}$ erreicht werden. Auch die Michaelis-Menten-Konstanten waren deutlich niedriger ($K_{m,\text{IP}}^{\text{app}} = 9,15 \pm 2,18 \text{ mM}$, $K_{m,\text{Aceton}}^{\text{app}} = 38,57 \pm 5,06 \text{ mM}$), wohingegen sich die apparenten Michaelis-Menten-Konstanten der anderen Substrate zwischen 60 mM bis 126 mM bewegten.

Die Erweiterung des Reaktionsnetzwerks hatte direkte Auswirkungen auf das zugrunde liegende System an Differentialgleichungen, das die zeitlichen Konzentrationsverläufe beschreibt. Zum einen veränderte sich die zeitliche Beschreibung von NAD^+ und NADH durch die neu eingeführten Reaktionen. Zum anderen mussten mit Isopropanol und Aceton nun zwei zusätzliche Komponenten als eigene Bilanzgrößen berücksichtigt werden.

Das resultierende System an Differentialgleichungen umfasst sieben Bilanzgleichungen und ist im Folgenden dargestellt:

$$\frac{dc_{\text{PD}}}{dt} = -r_1^* + r_2^* \quad (4.21)$$

$$\frac{dc_{\text{Lactol}}}{dt} = r_1^* - r_2^* - r_3^* \quad (4.22)$$

$$\frac{dc_{\text{Lacton}}}{dt} = r_3^* - r_4 \quad (4.23)$$

$$\frac{dc_{\text{Aceton}}}{dt} = r_5^* - r_6^* \quad (4.24)$$

$$\frac{dc_{\text{IP}}}{dt} = -r_5^* + r_6^* \quad (4.25)$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1^* + r_2^* - r_3^* - r_5^* + r_6^* \quad (4.26)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1^* - r_2^* + r_3^* + r_5^* - r_6^* \quad (4.27)$$

Mithilfe des Differentialgleichungssystems sowie der zuvor bestimmten und erweiterten Reaktionsraten konnte das um die Cofaktorregenerierung ergänzte Reaktionssystem nun numerisch analysiert werden. Voraussetzung dafür ist jedoch eine Validierung des Modells, die im folgenden Kapitel ausführlich behandelt wurde.

4.5.1 Modell mit Aceton/Isopropanol-Regenerierung nicht valide bei hohen Acetonkonzentrationen

Auf Grundlage der neu formulierten Gleichungen wurden weiterführende Simulationen durchgeführt, welche das erweiterte Reaktionssystem inklusive der Cofaktorregenerierung mit Isopropanol und Aceton abbilden. Diese Modellierung diente zugleich der Validierung des neuen Reaktionsmodells durch den Abgleich mit experimentell erhobenen Daten.

Zu diesem Zweck wurden drei unabhängig voneinander durchgeführte *in vitro* Versuche herangezogen, in denen jeweils eine Ausgangskonzentration von 250 mM 1,5-Pentandiol sowie 10 mM NAD⁺ eingesetzt wurde. Die Acetonkonzentration wurde in diesen Ansätzen gezielt variiert, um den Einfluss dieser Komponente auf die Modellgüte im Detail zu untersuchen. Als Einsatzkonzentrationen wurden dabei 10, 50 und 100 mM Aceton gewählt.

Im Anschluss wurden die experimentell gemessenen Konzentrationsverläufe von Lactol und δ -Valerolacton mit den durch das Modell prognostizierten Konzentrationsverläufen verglichen. Die entsprechenden Simulationsergebnisse sowie deren Abgleich mit den Messdaten sind in Abbildung 4.17 zusammenfassend dargestellt.

Wie die Abbildung verdeutlicht, nahm die Abweichung zwischen simulierten und experimentellen Konzentrationen mit steigender Acetonkonzentration deutlich zu. Während sich bei einer Zugabe von 10 mM Aceton noch eine grobe Übereinstimmung zwischen Simulation und Messdaten erkennen ließ, zeigten sich bei 50 mM und insbesondere 100 mM deutliche Abweichungen. Diese betrafen sowohl die resultierenden Konzentrationen des Zwischenprodukts als auch die Konzentrationen des Lacton's.

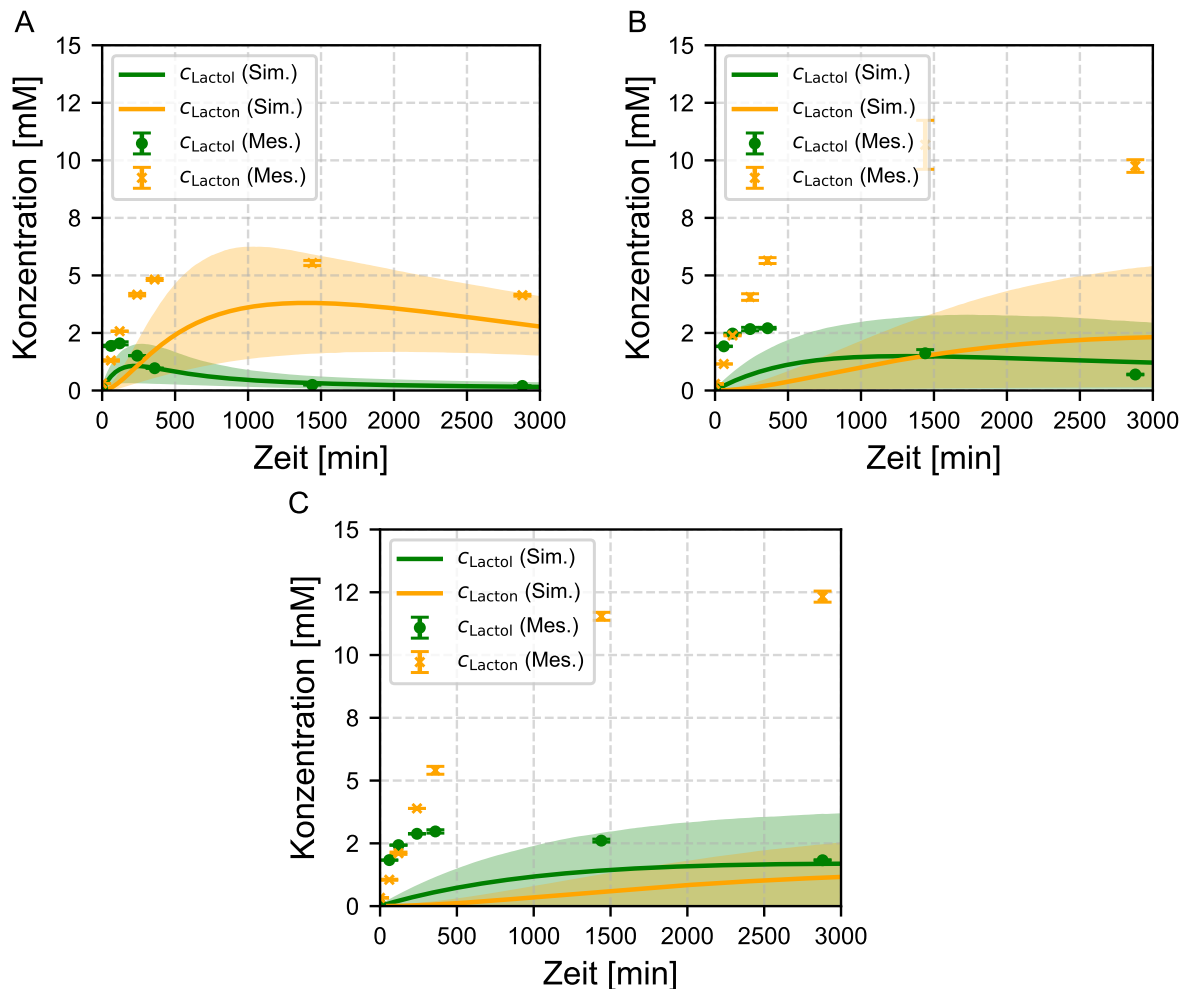


Abbildung 4.17: Vergleich von Simulation und Messdaten bei variierender Aceton-Konzentration.

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von Lactol und δ -Valerolacton über 3000 min bei drei Aceton-Konzentrationen: 10 (A), 50 (B) und 100 mM (C). Die Simulation basiert auf dem erweiterten Modell mit Cofaktorregenerierung. Dargestellt sind Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle aus 10 000 Monte-Carlo-Simulationen sowie experimentelle Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen erfolgten jeweils mit den genannten Aceton-Konzentrationen, 250 mM 1,5-Pentandiol, 10 mM NAD^+ , 1 mg mL⁻¹ Enzym, in 800 μ L Reaktionsvolumen bei 30 °C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid.

Die wachsende Diskrepanz legt nahe, dass die im Modell implementierten Inhibitionsmechanismen für Aceton in den Reaktionsraten r_1^* und r_3^* die tatsächlichen Effekte nur unzureichend abbilden. Denkbar ist eine systematische Überschätzung der hemmenden Wirkung von Aceton. Vor diesem Hintergrund konnte das derzeitige Modell in seiner bestehenden Form nicht als validierte Grundlage für weiterführende Prozessanalysen oder -optimierungen herangezogen werden. Um die Modellgüte zu verbessern, bedarf es entweder einer strukturellen Überarbeitung der mathematischen Modellansätze oder zusätzlicher experimenteller Untersuchungen, die die genaue Wirkweise von Aceton im Reaktionskontext klären. Erst auf Basis belastbarer

Daten und verbesserter Modellannahmen lässt sich eine robuste, realitätsnahe Simulation des Gesamtsystems erreichen.

4.6 Prozesstechnischer Vergleich

In diesem Kapitel wurde das untersuchte System anhand real gemessener Konzentrationsverläufe von Intermediat und Produkt bewertet. Zunächst wurde der Einfluss der Cofaktorregeneration auf den zeitlichen Verlauf analysiert. Anschließend erfolgte ein Vergleich des mit der G37D-Mutante erzielten Konzentrationsverlaufs mit dem des Wildtyps unter Verwendung von NADP⁺ als Cofaktor. Abschließend wurde der bisher durchgängig verwendete KPi-Puffer bei pH 8 mit einem alternativen Puffersystem verglichen, um zu überprüfen, ob sich durch Variation des pH-Werts eine verbesserte Reaktionsführung erzielen lässt.

4.6.1 Aceton steigerte δ -Valerolactontiter trotz modellierter Inhibitionseffekte

Auch wenn das durch die Cofaktorregenerierung erweiterte Modell nicht für weiterführende Prozessoptimierungen herangezogen werden konnte, ließen sich die im Rahmen der Modellvalidierung erhobenen experimentellen Daten dennoch zur qualitativen Bewertung der Regenerationseffizienz nutzen. Insbesondere boten sie eine Grundlage zur Einschätzung, inwieweit die Kopplung von Isopropanol und Aceton den Reaktionsverlauf beeinflussen und gezielt steuern kann.

Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationsverläufe von Lactol und δ -Valerolacton bei vier unterschiedlichen Aceton-Konzentrationen (0, 10, 50 und 100 mM) miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

Wie Abbildung 4.18A zeigt, erfolgte bei höheren Aceton-Konzentrationen eine stärkere Akkumulation von δ -Valerolacton. Die anfängliche Bildung innerhalb der ersten Stunde lag jedoch bei allen drei Ansätzen mit 10, 50 und 100 mM Aceton bei rund 2 mM und zeigte damit nur geringe Unterschiede.

Abbildung 4.18B zeigt den zeitlichen Verlauf der δ -Valerolacton-Konzentration. Es wurde deutlich, dass durch die Zugabe von Aceton eine signifikante Steigerung des Endtiters erreicht werden konnte. Besonders bei einer Aceton-Konzentration von 100 mM wurde ein maximaler Titer von $12,3 \pm 0,2$ mM δ -Valerolacton gemessen. Dies entsprach etwa der vierfachen Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ohne Aceton, die einen Wert von $3,05 \pm 0,02$ mM erreichte. Zudem wurde bei dieser Variante auch nach 48 h keine Abnahme der δ -Valerolacton-Konzentration festgestellt, was darauf hinwies, dass zu diesem Zeitpunkt die Bildungsrate des Produkts noch immer über der Rate der spontanen Hydrolyse lag. Dieser Effekt war vermutlich

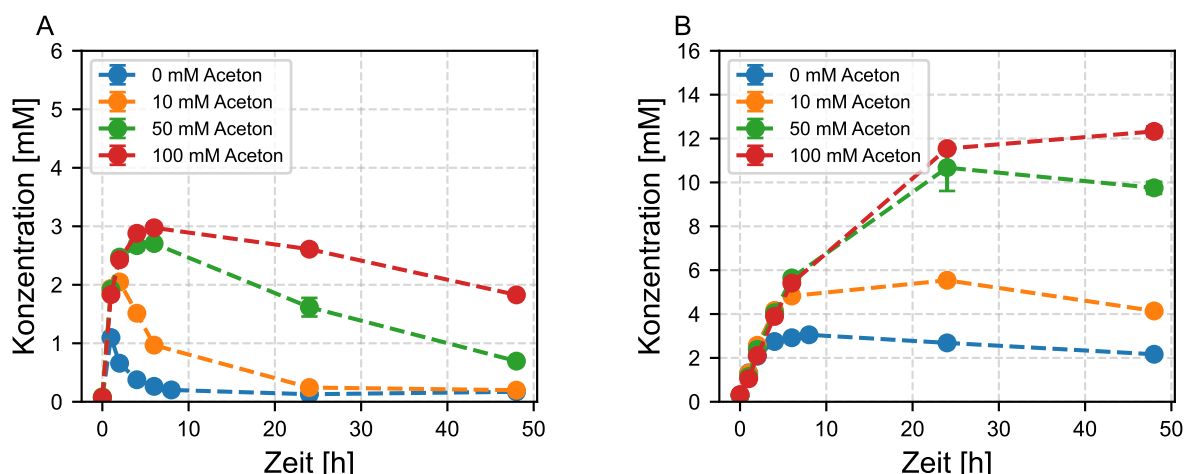


Abbildung 4.18: Gemessener Konzentrationsverlauf von Lactol (A) und δ -Valerolacton (B) bei variierender Aceton-Konzentration.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentrationen von Lactol (A) und δ -Valerolacton (B) bei 250 mM 1,5-Pentandiol, 10 mM NAD^+ und einer Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} . Die Versuche wurden für vier unterschiedliche Aceton-Konzentrationen (0, 10, 50 und 100 mM) durchgeführt. Die restlichen Metabolite hatten eine Startkonzentration von 0 mM. Dargestellt sind experimentell gemessenen Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen wurden in einem Reaktionsvolumen von $800 \mu\text{L}$ bei 30°C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPiPuffer mit 1 mM Magnesiumchlorid durchgeführt.

auf die im Vergleich höhere Lactol-Konzentration in der Spätphase zurückzuführen, die als Substrat für die nachfolgende Oxidation diene.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zugabe von Aceton einen positiven Einfluss auf das Reaktionssystem ausübte. Trotz der noch bestehenden Limitierungen des mathematischen Modells lieferten die experimentellen Ergebnisse wertvolle Hinweise auf die prinzipielle Wirksamkeit des Regenerationssystems. Eine weiterentwickelte Modellstruktur, die die beobachteten Effekte besser abbildet, könnte zukünftig als Grundlage für gezielte Prozessoptimierungen dienen.

4.6.2 G37D erreicht unter Prozessbedingungen höhere δ -Valerolactontiter als der Wildtyp

Nachdem die Mutante G37D bereits ausführlich auf biochemischer Ebene mit dem Wildtyp verglichen und charakterisiert wurde, sollte nun auch die Leistungsfähigkeit beider Enzymvarianten unter Prozessbedingungen gegenübergestellt werden. Ziel der Untersuchung war es, die Effizienz der δ -Valerolactonsynthese von G37D mit NAD^+ als Cofaktor mit der des Wildtyps unter Verwendung von NADP^+ zu vergleichen.

Für diesen Vergleich wurden zwei Reaktionsansätze konzipiert, die sich ausschließlich in der verwendeten Enzymvariante und im entsprechenden Cofaktor unterschieden. Der erste

Ansatz basierte auf der Mutante G37D, wobei 250 mM 1,5-Pentandiol zusammen mit 10 mM NAD^+ als Cofaktor eingesetzt wurden. Im zweiten Ansatz kam der Wildtyp der *LbADH* zum Einsatz, ebenfalls mit 250 mM 1,5-Pentandiol, jedoch in Kombination mit 10 mM NADP^+ . In beiden Ansätzen wurde eine identische Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} verwendet, um eine vergleichbare katalytische Ausgangsbasis zu gewährleisten.

Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurden die Konzentrationen der Reaktionszwischenprodukte Lactol sowie des Zielprodukts δ -Valerolacton regelmäßig gemessen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Sie bieten einen direkten Einblick in das Verhalten unter Prozessbedingungen der beiden Enzymvarianten unter ansonsten identischen Bedingungen.

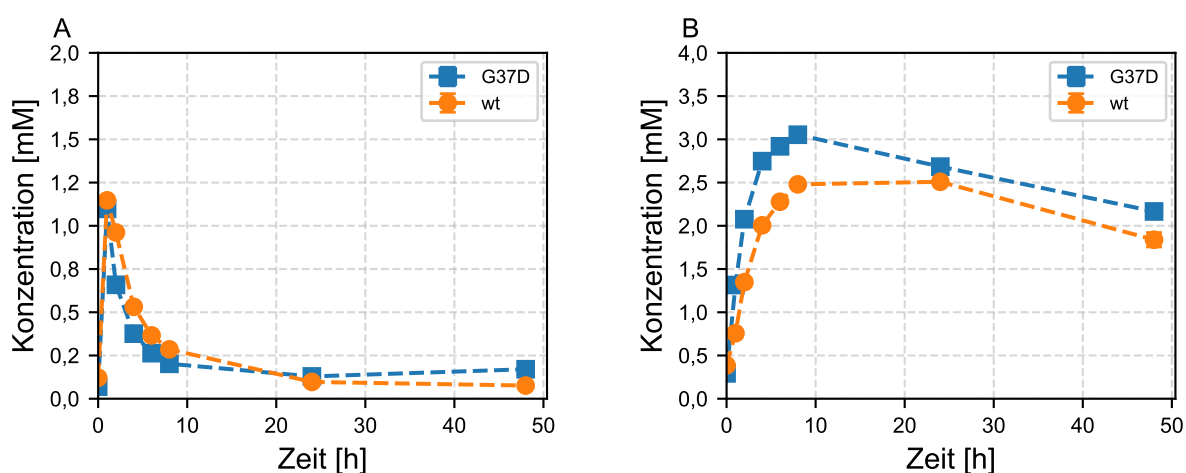


Abbildung 4.19: Gemessener Konzentrationsverlauf von Lactol (A) und Lacton (B) mit G37D und Wildtyp.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentrationen bei 250 mM 1,5-Pentandiol und einer Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} . Für G37D wurde 10 mM NAD^+ , für den Wildtyp 10 mM NADP^+ eingesetzt. Die restlichen Metabolite hatten eine Startkonzentration von 0 mM. Dargestellt sind experimentell gemessenen Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen wurden in einem Reaktionsvolumen von $800 \mu\text{L}$ bei 30°C und 1000 rpm unter Verwendung von 50 mM KPi-Puffer mit 1 mM Magnesiumchlorid durchgeführt.

Wie aus Abbildung 4.19A hervorgeht, unterschieden sich die Konzentrationsverläufe von Lactol zwischen den beiden Enzymvarianten nur geringfügig. In beiden Fällen zeigte sich zunächst eine schnelle Akkumulation des Zwischenprodukts, dessen Konzentration im weiteren Verlauf wieder abnahm. Auch beim Zielprodukt δ -Valerolacton (siehe Abbildung 4.19B) verliefen die Kurven weitgehend ähnlich. Dennoch ließ sich feststellen, dass mit der Variante G37D in Kombination mit NAD^+ ein insgesamt höherer Endtiter erreicht wurde.

Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als sie die erfolgreiche Umstellung der Cofaktorabhängigkeit bestätigte und zeigte, dass die Mutation G37D nicht nur zu einer veränderten Cofaktorpräferenz führt, sondern auch unter realen Reaktionsbedingungen eine vergleichbare

oder gar bessere Produktbildung ermöglicht. Damit stellt G37D eine vielversprechende Alternative zum Wildtyp dar, insbesondere in Prozessen, in denen NAD^+ anstelle von NADP^+ als Cofaktor eingesetzt wird.

4.6.3 GlycinNaOH-Puffer steigert Endtiter gegenüber KPi-Puffer

Zum Abschluss wurde untersucht, ob sich durch die Wahl eines alternativen Puffersystems ein günstigerer Einfluss auf den Gesamtprozess erzielen lässt. Hierzu wurde der GlycinNaOH-Puffer ausgewählt, da dieser einen pH-Bereich von etwa 8 bis 11 abdeckt und somit nahtlos an den Wirkungsbereich des zuvor verwendeten KPi-Puffers (pH 5,5–8) anschließt. Zunächst wurde der Einfluss des pH-Werts auf die enzymatische Aktivität untersucht. Dazu wurden unter konstanten Substratbedingungen (500 mM 1,5-Pentandiol und 5 mM NAD^+ für G37D und NADP^+ für den Wildtyp) die Anfangsaktivitäten der Enzyme G37D und Wildtyp in beiden Puffersystemen ermittelt. Abbildung 4.20 zeigt die relative Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.

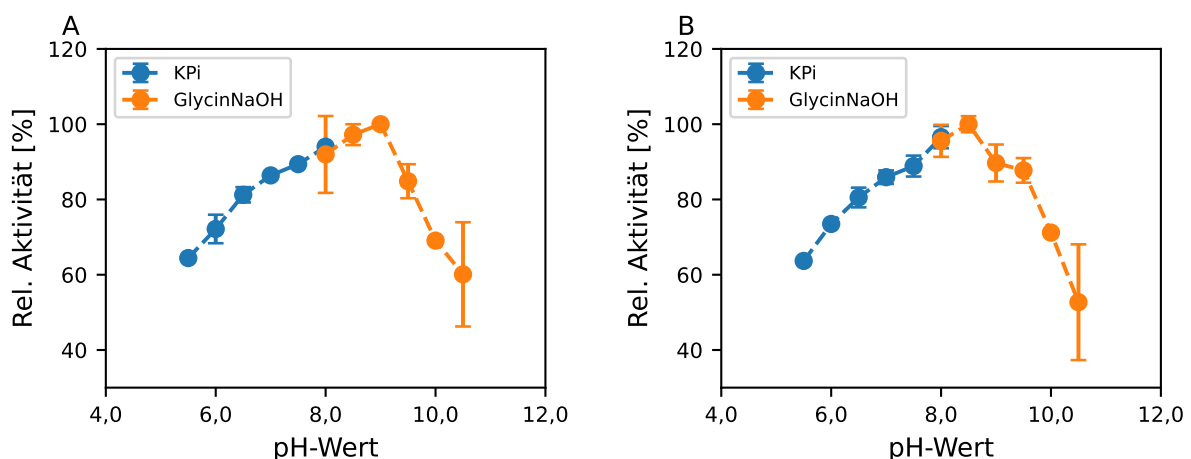


Abbildung 4.20: Aktivitätsvergleich in KPi- und GlycinNaOH-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten.

Dargestellt sind die relativen Aktivitäten der Varianten G37D (A) und Wildtyp (B) im KPi-Puffer (pH 5,5–8) sowie im GlycinNaOH-Puffer (pH 8–10,5). Die Aktivitätsmessungen erfolgten unter identischen Substratbedingungen (500 mM 1,5-Pentandiol, 5 mM NAD^+) über ein Aktivitätsassay.

Die Ergebnisse zeigen, dass der KPi-Puffer im Bereich um pH 8 für beide Enzymvarianten ein Aktivitätsmaximum aufwies. Im GlycinNaOH-Puffer konnte allerdings bei beiden Varianten eine vergleichbar hohe oder sogar leicht erhöhte Aktivität im Bereich zwischen pH 8,5 und 9 beobachtet werden. Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde entschieden, einen prozesstechnischen Vergleich bei pH 8 im KPi-Puffer und pH 9 im GlycinNaOH-Puffer durchzuführen, um den Einfluss der Pufferwahl unter realen Reaktionsbedingungen zu untersuchen.

Für diesen Vergleich wurden Reaktionsansätze mit der Variante G37D bei 250 mM 1,5-Pentandiol, 10 mM NAD^+ und einer Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} jeweils über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet. Die resultierenden Konzentrationsverläufe von Lactol und δ -Valerolacton sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

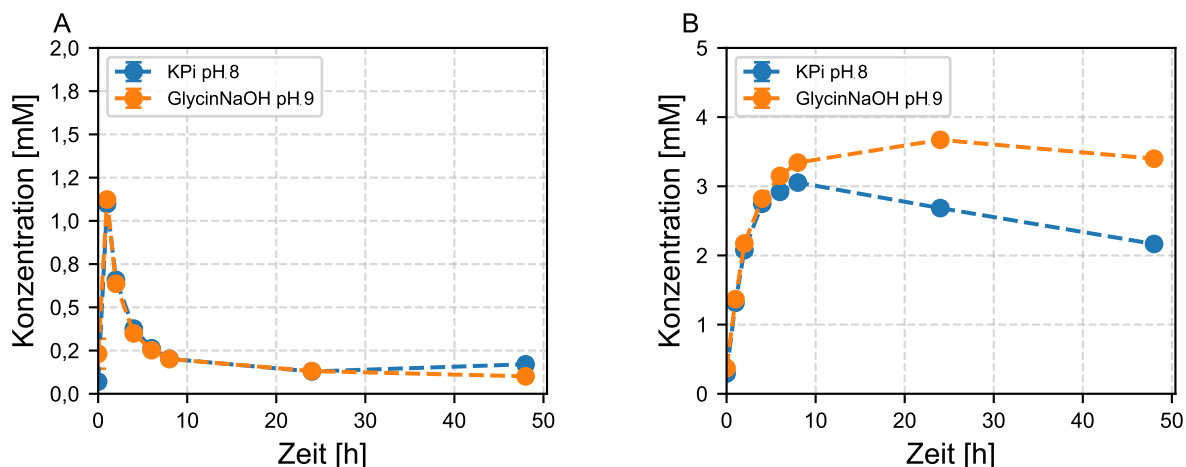


Abbildung 4.21: Gemessener Konzentrationsverlauf von Lactol (A) und δ -Valerolacton (B) bei pH 8 (KPi) und pH 9 (GlycinNaOH).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Konzentrationen bei 250 mM 1,5-Pentandiol, 10 mM NAD^+ und 1 mg mL^{-1} G37D. Die restlichen Metabolite hatten eine Startkonzentration von 0 mM. Dargestellt sind experimentell gemessenen Konzentrationen mit Standardabweichungen. Die *in vitro* Biotransformationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 800 μL bei 30°C und 1000 rpm durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.21A zu sehen ist, zeigte sich für den Verlauf der Lactolkonzentration kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Pufferbedingungen. In beiden Fällen stieg die Konzentration in der Anfangsphase stark an und nahm anschließend kontinuierlich ab.

Im Verlauf der δ -Valerolactonkonzentration (siehe Abbildung 4.21B) zeigten sich hingegen deutlichere Unterschiede. Während sich die Konzentrationen in den ersten vier Stunden noch ähnelten, sank die δ -Valerolactonkonzentration im KPi-Puffer ab einem Zeitpunkt von acht Stunden wieder ab. Im Gegensatz dazu blieb die Konzentration im GlycinNaOH-Puffer stabil beziehungsweise stieg weiter an.

Da sowohl der Verlauf der Lactolkonzentration als auch der Anstieg der δ -Valerolactonkonzentration innerhalb der ersten vier Stunden in beiden Puffersystemen nahezu identisch waren, deutet dieser Unterschied darauf hin, dass der Puffer einen geringeren Einfluss auf die enzymatische Umsetzung als auf die Stabilität beziehungsweise die Hydrolyse des Lactons hatte.

5 Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel werden die erzielten Ergebnisse diskutiert und in den Kontext der bestehenden wissenschaftlichen Literatur eingeordnet. Dabei wird insbesondere diskutiert, inwieweit die Resultate die eingangs formulierte Zielsetzung beantworten und welche Rückschlüsse daraus gezogen werden können.

Darüber hinaus werden potenzielle Schwächen und Fehlerquellen des gewählten Ansatzes reflektiert. Auf dieser Basis werden Ansätze für mögliche Verbesserungen vorgestellt, die in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden könnten. Abschließend erfolgt ein Ausblick auf weiterführende Forschungsfragen sowie auf Anwendungsmöglichkeiten der gewonnenen Erkenntnisse.

5.1 Kinetische Einordnung der *Lb*ADH Varianten und Vergleich mit Literaturdaten

In dieser Arbeit wurden verschiedene kinetische Parameter sowohl für die Modellreaktion von Phenylethanol zu Acetophenon als auch für die Zielreaktion von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton bestimmt. Hierzu wurden die bestimmten Parameter diskutiert und in die Literatur eingeordnet.

5.1.1 Abweichungen von Literaturwerten bei der Analyse der Modellreaktion

Die v_{\max}^{app} -Werte der Modellreaktion lagen bei $17,50 \pm 0,75 \text{ U mg}^{-1}$ für den Wildtyp und $10,3 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$ für die Mutante G37D, jeweils bezogen auf den bevorzugten Cofaktor. Die Mutante R38P zeigte mit $4,8 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ eine geringere maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Ein Wechsel in der Cofaktorpräferenz konnte sowohl über die K_m^{app} -Werte als auch über die katalytische Effizienz nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass G37D die aktivere NAD^+ -abhängige Mutante ist. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben. Machielsen et al. (2009) berichten, dass die Mutation G37D zu einem Aktivitätsverlust und R38P zu einer etwa vierfach erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp führt. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigt werden. Während G37D ebenfalls eine verminderte Aktivität zeigte, führte R38P entgegen der Literatur zu einem Aktivitätsverlust von über 70 %. Ein direkter Vergleich ist jedoch erschwert, da in der Publikation keine absoluten Aktivitäten angegeben wurden, die Reduktionsrichtung von Acetophenon untersucht wurde und das verwendete Puffersystem einen pH-Wert von 6,5 aufwies.

Die Oxidation von Phenylethanol durch den Wildtyp und die Variante G37D wurde auch von Schlieben et al. (2005) untersucht. Hierzu vergleicht Tabelle 5.1 die in dieser Arbeit bestimmten Parameter mit den Literaturwerten.

Tabelle 5.1: Vergleich kinetischer Parameter zwischen eigener Arbeit und Literaturangaben.

Parameter	Eigene Arbeit	Literaturwert	Quelle
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (wt, NADP ⁺)	$8,09 \pm 0,35 \text{ s}^{-1}$	$5,40 \pm 0,30 \text{ s}^{-1}$	[39]
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (wt, NAD ⁺)	$6,63 \pm 0,44 \text{ s}^{-1}$	–	[39]
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (G37D, NADP ⁺)	$9,02 \pm 0,87 \text{ s}^{-1}$	$8,20 \pm 1,00 \text{ s}^{-1}$	[39]
$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (G37D, NAD ⁺)	$4,78 \pm 0,33 \text{ s}^{-1}$	$9,50 \pm 1,40 \text{ s}^{-1}$	[39]
K_m^{app} (wt, NADP ⁺)	$0,04 \pm 0,02 \text{ mM}$	$0,02 \pm 0,01 \text{ mM}$	[39]
K_m^{app} (G37D, NADP ⁺)	$6,89 \pm 0,04 \text{ mM}$	$9,10 \pm 1,50 \text{ mM}$	[39]
K_m^{app} (G37D, NAD ⁺)	$0,15 \pm 0,07 \text{ mM}$	$0,75 \pm 0,07 \text{ mM}$	[39]

Es ist zu erkennen, dass die $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Werte dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Größenordnung mit Literaturwerten übereinstimmen. Ein nennenswerter Unterschied besteht beim $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Wert der Variante G37D mit NAD⁺. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp mit NADP⁺ beobachtet, während Schlieben et al. (2005) eine Steigerung berichten. Zudem konnten Schlieben et al. (2005) keine Aktivität des Wildtyps mit NAD⁺ feststellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch die hohe Affinität zum phosphorylierten Cofaktor während der Aufreinigung NADP⁺ in der Bindetasche verblieben ist und die gemessene Aktivität ein Artefakt dieses Phänomens darstellt. Dass die Aktivität jedoch mit höheren NAD⁺ Konzentrationen zunimmt, widerspricht dieser Hypothese. Auch die ermittelten $K_{m,\text{NAD(P)}^+}^{\text{app}}$ -Werte für den Wildtyp und G37D lagen in derselben Größenordnung wie die Literaturangaben. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die in dieser Arbeit bestimmten kinetischen Parameter weitgehend mit den Literaturwerten übereinstimmen. Unterschiede lassen sich unter anderem durch pH-Effekte erklären, da die Literaturdaten bei pH 7 und die vorliegenden Messungen bei pH 8 gewonnen wurden.

5.1.2 Vergleich zwischen Modell- und Zielreaktion veranschaulicht

Substratspektrum der LbADH

Ein Vergleich zwischen Modell- und Zielreaktion lässt sich durch die Betrachtung der kinetischen Parameter unter Verwendung der Variante G37D mit NAD⁺ als Cofaktor ermöglichen.

Für die Zielreaktion konnten insgesamt niedrigere maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeiten als für die Modellreaktion gemessen werden. Besonders auffällig war die Aktivität bei der Umsetzung von 1,5-Pentandiol zum Hydroxyaldehyd mit lediglich $0,075 \pm 0,007 \text{ U mg}^{-1}$. Im Vergleich zur Modellreaktion wird deutlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in der Zielreaktion deutlich geringer ausfällt. Die gemessenen Aktivitäten lagen hier um etwa zwei Größenordnungen niedriger. Die Reaktionen R_2 und R_3 zeigten höhere Werte von $3,5 \pm 2,6 \text{ U mg}^{-1}$ bzw. $2,4 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$.

Ein weiterer Unterschied zwischen Modell- und Zielreaktion lässt sich anhand der K_m^{app} -Werte der Substrate feststellen. Während der K_m^{app} für Phenylethanol bei $7,83 \pm 1,89 \text{ mM}$ lag, wurden für die Zielreaktion durchweg deutlich höhere Werte bestimmt. Für 1,5-Pentandiol ergab sich ein K_m^{app} von $96,9 \pm 20,2 \text{ mM}$, für das Hydroxyaldehyd $125,6 \pm 6,4 \text{ mM}$, und für Tetrahydropyranol $59,5 \pm 9,3 \text{ mM}$.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Phenylethanol eine deutlich höhere Affinität zum Enzym aufweist als die anderen untersuchten Substrate. Auch innerhalb der Zielreaktion lässt sich eine Abstufung erkennen. Das Lactol (Tetrahydropyranol) zeigte die höchste Affinität. Der strukturelle Unterschied zwischen den Substraten liefert eine mögliche Erklärung. Bei Phenylethanol und dem Lactol handelt es sich um zyklische Verbindungen, während 1,5-Pentandiol und das Hydroxyaldehyd lineare Moleküle sind. Die Ergebnisse veranschaulichen das Substratspektrum der *LbADH*, da dieses Enzym bevorzugt Substrate mit sperrigen Seitengruppen umsetzt [44]. Darüber hinaus handelt es sich bei Phenylethanol um einen sekundären Alkohol, wohingegen die Substrate der Zielreaktion primäre Alkohole sind. Auch dieser Unterschied kann zur Erklärung der höheren Affinität von Phenylethanol im Vergleich zu Tetrahydropyranol herangezogen werden.

5.1.3 Vergleich der Aktivität der *LbADH* mit Literaturwerten anderer ADHs

Andere Arbeiten mit verschiedenen ADHs berichten über deutlich höhere Aktivitäten für die Umsetzung von 1,5-Pentandiol. So geben Xu et al. (2019) für die Wildtyp-*Kluyveromyces polysporus*-ADH einen $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Wert von $55,7 \pm 1,0 \text{ min}^{-1}$ an, der durch Mutationen auf bis zu $64,4 \pm 1,6 \text{ min}^{-1}$ gesteigert werden konnte. Andere Mutationen führten zwar zu einer Abnahme des K_m^{app} , jedoch nicht zu einer Erhöhung des $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$. Diese Werte wurden, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in GlycinNaOH-Puffer bei pH 9 bestimmt. Da jedoch gezeigt wurde, dass sich die Aktivität im basischen Bereich nur um maximal 5 % erhöht, erscheint ein Vergleich dennoch gerechtfertigt.

Velasco-Lozano et al. (2022) berichten für die Umsetzung von 1,5-Pentandiol mit der *Bacillus stearothermophilus*-ADH von einem $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Wert von 1812 min^{-1} sowie für die Horse Liver ADH von einem Wert von 156 min^{-1} . Die Reaktionsbedingungen basierten auf einem Phosphatpuffer bei pH 8. Vergleicht man diese Werte mit der hier gemessenen Aktivität der *Lb*ADH, wird deutlich, dass andere ADHs für die Umsetzung von 1,5-Pentandiol deutlich besser geeignet erscheinen. Unter Berücksichtigung einer molaren Masse von 27 800 Da ergibt sich für die *Lb*ADH ein $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ von lediglich $2,1 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$. Dies entspricht nur etwa 3,1 % der Aktivität der mutierten *K. polysporus*-ADH, 1,3 % der Horse Liver ADH und lediglich 0,1 % der *B. stearothermophilus*-ADH.

Die geringe Aktivität der *Lb*ADH-Variante G37D gegenüber 1,5-Pentandiol ist besonders auffällig. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die anderen aufgezeigten ADHs, durch ihre hohe Aktivität mit 1,5-Pentandiol, zyklische Substrate wie Tetrahydropyranol nur unzureichend umsetzen können. Eine Limitierung im ersten Reaktionsschritt ist dabei günstiger, da sich diese durch den Einsatz hoher Substratkonzentrationen kompensieren lässt.

Da zukünftig möglicherweise ein nicht-wässriges Reaktionssystem eingesetzt wird und für die *Lb*ADH bereits ein etabliertes Cofaktorregenerationssystem mit Aceton und Isopropanol vorliegt, ist ein Enzymwechsel nicht vorgesehen. Vielmehr ist aus industrieller Sicht eine gezielte Steigerung der Aktivität dieser ADH von großem Interesse. Aufbauend auf den bereits vorgenommenen Mutationen in der Cofaktorbindetasche könnten zusätzliche Veränderungen in der Substratbindetasche weitere Verbesserungen ermöglichen. Solche Mutationen lassen sich beispielsweise durch Protein-Engineering und computergestützte Verfahren effizient identifizieren und bewerten [61]. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Änderungen in der Substratbindetasche auch die Aktivität gegenüber anderen Substraten wie Tetrahydropyranol beeinflussen können.

5.1.4 Bewertung der Aufnahme der kinetischen Parameter

Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die Methodik zur Erfassung der Michaelis-Menten-Kinetik. Wie bereits beschrieben, werden Mehrsubstrat-Kinetiken üblicherweise erfasst, indem ein Substrat konstant im Überschuss gehalten wird, während das andere variiert wird. In dieser Arbeit wurde ein Substrat dann als im Überschuss betrachtet, wenn bei dessen Konzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erreicht wurde. In der Fachliteratur wird häufig von einem Überschuss $c_S \gg K_{m,S}$ gesprochen [62], ohne diesen näher zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde mit einem Überschuss im Bereich des 4- bis 5-fachen K_m gearbeitet. In den Arbeiten von Findrik et al. (2005) und Xu et al. (2019) wurden hingegen entweder höhere

Überschuss-Faktoren gewählt oder eine vollständige Kinetikschar aufgenommen, bei der für jede Cofaktorkonzentration eine Substratkinetik ermittelt wurde.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter entsprach nicht vollständig der exakten biochemischen Praxis. Darüber hinaus wurde ein deutlich vereinfachtes Modell verwendet. Dennoch erwies sich die angewandte Methodik als ausreichend, um eine erste Einschätzung der kinetischen Parameter zu ermöglichen und eine geeignete Variante zu selektieren.

5.2 Einordnung der Aussagekraft und Grenzen des entwickelten Modells

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Modells zur Beschreibung des biochemischen Reaktionssystems. Für die Zielreaktion von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton konnte das Ziel erreicht werden. Durch die Erweiterung um Hydrolyse und Enzyminaktivierung konnte das Modell als valide bestätigt werden. Es führte zu einer sehr guten Beschreibung der gemessenen Konzentrationsverläufe vom Lactol und von δ -Valerolacton.

Die Erweiterung des Modells um ein Cofaktorregenerierungssystem mit Aceton und Isopropanol war hingegen nicht erfolgreich. Die im Modell angenommenen Inhibierungseffekte konnten in *in vitro* Experimenten nicht bestätigt werden.

Ein wesentlicher Bestandteil der Modellvalidierung war die Beurteilung der Lage der experimentellen Messpunkte im Vergleich zu den berechneten Konfidenzbändern. Dabei stellt sich die Frage, wie realistisch die zugrunde liegende Fehlerbetrachtung ist. Entscheidend ist, welche Unsicherheiten in die Fehleranalyse eingeflossen sind – und welche nicht.

Die Aktivitätsmessungen wurden mithilfe eines Aktivitätsassays durchgeführt. Die Aktivität wurde dabei auf Basis einer Kalibriergeraden bestimmt, deren Bestimmtheitsmaß gut war, jedoch nicht in die Fehleranalyse einfluss. Auch die Umrechnung der Absorption auf die NADH-Konzentration bzw. die Bestimmung der Enzymkonzentration beruhte auf Kalibriergeraden, deren Unsicherheiten ebenfalls unberücksichtigt blieben. Die Aktivitätsmessungen wurden als Duplikate durchgeführt; die daraus resultierende Standardabweichung ging im Sinne eines *soft weightings* in die Parameterschätzung ein.

Die Unsicherheiten der Fit-Parameter wurden über die Kovarianzmatrix ermittelt. Dabei wurden jedoch nur die Diagonalelemente zur Berechnung der Standardabweichungen verwendet; die Kovarianzen selbst wurden ignoriert. Dies ist insofern kritisch, als Parameterkorrelationen, etwa zwischen v_{\max}^{app} und K_m^{app} , wahrscheinlich sind. Die Annahme unabhängiger, normalverteilter Parameter kann daher zu einer Überschätzung der Aussagekraft führen. Die Konfidenzintervalle der Simulation basieren auf 10 000 zufälligen Parameterziehungen und zeigen die Konzentrationsbereiche, die in 95 % der Fälle erreicht wurden.

Letztlich stellt sich die Frage, ob eine Modellvalidierung als erfolgreich gelten kann, wenn sie ausschließlich auf einer visuellen Übereinstimmung zwischen Simulation und *in vitro* Messung basiert. Da jedoch sowohl Findrik et al. (2005) als auch Schroer et al. (2009) vergleichbare Modelle vorgestellt und ebenfalls auf Basis experimenteller Messwerte bewertet haben, wird dieses Vorgehen in der Literatur als hinreichend akzeptiert. Zudem liegen die in dieser Arbeit erzielten Abweichungen im Rahmen der in der Literatur berichteten Werte, was die Annahme stützt, dass das Modell die Realität den Anforderungen entsprechend abbildet.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Fehlerbetrachtung nicht vollständig ist. Mit größerem methodischem Aufwand ließen sich hier deutlich präzisere Aussagen zur Modellgüte treffen. Für einen ersten Eindruck ist die in dieser Arbeit gewählte Fehleranalyse jedoch als ausreichend anzusehen. Im Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit – die Entwicklung eines Modells zur Beschreibung des enzymatischen Reaktionssystems – kann festgehalten werden, dass die gewählten Methoden sich als geeignet zur Zielerreichung erwiesen haben. Das Reaktionssystem ohne Cofaktorregenerierung konnte dabei erfolgreich modelliert werden.

5.3 Ursache für limitierte Aussagekraft der NADH-basierten Aktivitätsanalyse

Beim Vergleich der Ergebnisse aus dem Aktivitätsassay mit den Konzentrationsverläufen der *in vitro* Versuche zeigten sich deutliche Diskrepanzen. Es wurden sowohl δ -Valerolacton- als auch Lactolkonzentrationen erreicht, die nicht mit den über den Aktivitätsassay ermittelten kinetischen Parametern des Modells vereinbar sind. Zudem war die anfängliche Bildung von δ -Valerolacton unabhängig von der Aceton-Konzentration. Bei jeder getesteten Aceton-Konzentration wurden deckungsgleiche anfängliche Konzentrationsverläufe erreicht. Dies deutet darauf hin, dass ein stark inhibitorischer Einfluss von Aceton auf die Bildung von Lactol vernachlässigt werden kann.

Diese Beobachtungen werfen die zentrale Frage auf, welcher Datengrundlage bei der Bewertung des Reaktionssystems ein höheres Maß an Vertrauen geschenkt werden sollte: Den Ergebnissen aus dem Aktivitätsassay oder den direkt aus den *in vitro* Biotransformationen abgeleiteten Konzentrationsverläufen.

Im Aktivitätsassay wird lediglich der Verlauf der NAD(P)H-Konzentration erfasst, während die *in vitro* Versuche eine detaillierte Quantifizierung der messbaren Metabolite ermöglichen. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die im Assay beobachtete Acetoninhibierung nicht die tatsächliche Reaktionskinetik widerspiegelt, sondern durch sekundäre Effekte beeinflusst ist.

Ein möglicher Einflussfaktor ist die Acetonreduktion. Während im Assay bislang angenommen wurde, dass Produkte wie Aceton das Ergebnis aufgrund der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit kaum beeinflussen, könnte eine gezielte kinetische Betrachtung jedoch zu einem gegenteiligen Ergebnis führen. Die Acetonreduktion verläuft mit einer maximalen Umsatzrate v_{\max}^{app} von 32 U mg^{-1} , was etwa dem 400-Fachen von Reaktion 1 und dem 13-Fachen von Reaktion 3 entspricht. Zudem liegen die Michaelis-Menten-Konstanten K_m^{app} für Aceton und NADH deutlich unter den Werten der übrigen Reaktionen, was die Katalyse des Umsatzes von Aceton auch bei niedrigen NADH-Konzentrationen begünstigt. In R_1 könnten demnach während des 5 minütigen Aktivitätsassays maximal $0,075 \text{ mM}$ NADH entstehen. Unter diesen Bedingungen reichen 10 mM Aceton aus um mit $0,107 \text{ U mg}^{-1}$ eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen als r_1 .

Diese Daten deuten auf einen erheblichen, nicht gewünschten NADH-Verbrauch durch Aceton hin. Theoretisch wäre bei steigender NADH-Konzentration eine verstärkte Acetonreduktion zu erwarten, was wiederum zu einer Stabilisierung oder gar Reduktion der NADH-Konzentration führen müsste. Experimentell konnte dieses Verhalten jedoch nicht bestätigt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein längerer Versuchszeitraum zu dem beschriebenen Verhalten führen könnte.

In vergleichbaren enzymatischen Systemen werden häufig gezielte Maßnahmen ergriffen, um solche Rückreaktionen zu unterbinden. So wird beispielsweise bei der Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch eine Lactatdehydrogenase Hydrazin als Pyruvatfalle eingesetzt, um die Rückreaktion zu verhindern [65]. Eine solche Strategie ist im vorliegenden Fall jedoch nicht umsetzbar, da der Einfluss von Aceton als kompetitiver Inhibitor untersucht werden soll und externe Zusätze das Ergebnis verfälschen würden.

Insgesamt zeigt sich, dass die alleinige Betrachtung der NADH-Konzentration zur Bewertung der Aceton-Inhibierung nicht ausreicht. Eine mögliche Alternative wäre die direkte Bestimmung des Substratabbaus, insbesondere des 1,5-Pentandiols. Dies würde jedoch eine Anpassung der bestehenden Analysemethoden erfordern, da derzeit keine verlässlichen Daten zum Verlauf dieses Edukts vorliegen. Auch eine direkte Produktanalyse ist wenig zielführend, da das primär gebildete Lactol zu δ -Valerolacton weiteroxidiert wird und somit nur schwer isoliert betrachtet werden kann.

5.4 Zweiphasensysteme als Strategie zur Produktstabilisierung gegen Hydrolyse

Im Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Produkt nach einer bestimmten Zeit zur Hydrolyse neigt. Im Folgenden sollen sowohl die verwendete Messmethodik als auch die Auswirkungen auf die prozesstechnische Auslegung diskutiert werden.

Zur Verfolgung der Hydrolyse in verschiedenen Medien wurde die GCMS eingesetzt. Die durch die GCMS beobachtete Abnahme der δ -Valerolactonkonzentration deutet zwar auf eine chemische Umwandlung hin, erlaubt jedoch keine eindeutige Aussage über den Reaktionstyp. Da mit GCMS lediglich flüchtige Verbindungen detektiert werden können, bleiben nicht flüchtige Reaktionsprodukte unentdeckt. Die entstehende 5-Hydroxyvaleriansäure ist stark polar und weist eine geringe Flüchtigkeit auf [66]. Eine Detektion mittels GCMS erfordert daher eine chemische Derivatisierung [66]. Somit ist die GCMS allein nicht ausreichend, um eine Hydrolyse sicher nachzuweisen.

Eine verlässliche Alternative stellt die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) dar, da sie eine direkte Identifikation der Reaktionsprodukte ermöglicht. Im Falle einer Hydrolyse würden charakteristische Signale der entstehenden Hydroxycarbonsäuren (z. B. COOH- und CH-OH-Gruppen) erscheinen. Eine zeitaufgelöste NMR-Analyse könnte somit sowohl die Produktidentifikation als auch Informationen zur Reaktionskinetik liefern. [67]

Eine genaue Analyse der Hydrolyse ist aus zwei Gründen entscheidend: Zum einen ermöglicht sie eine belastbare Validierung des Modells, zum anderen ist die Kenntnis der Hydrolysekinetik essenziell für die prozesstechnische Auslegung. Hierbei gilt es zu klären, inwieweit die Hydrolyse die Gewinnung des gewünschten Lactons stört. Ist eine Rückgewinnung des Lactons aus der gebildeten Hydroxycarbonsäure nicht möglich, müssen Maßnahmen zur Minimierung der Hydrolyse getroffen werden.

Eine Möglichkeit besteht in der Auswahl eines Puffersystems, in dem die Hydrolyse verlangsamt abläuft. Dabei muss jedoch sichergestellt sein, dass das Enzym *LbADH* weiterhin unter optimalen Bedingungen arbeiten kann. Eine weitere Option ist die Integration einer *in situ* Produktabtrennung.

Die Etablierung eines Zweiphasensystems wurde von Kara et al. (2013) diskutiert. Dieses überführt δ -Valerolacton kontinuierlich aus der wässrigen Phase in eine organische Phase und schützt so vor weiterer Hydrolyse. Voraussetzung dafür ist die Wahl einer geeigneten organischen Phase, die sowohl gute Extraktionseigenschaften aufweist als auch die enzymatische Aktivität der *LbADH* nicht beeinträchtigt.

Das bislang verwendete Ethylacetat zeigte zwar eine hohe Extraktionsleistung für δ -Valerolacton, erwies sich jedoch als ungeeignet, da es selbst hydrolysiert und zur Ansäuerung der Reaktionslösung führen kann [30]. Für die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels müssen daher mehrere Kriterien berücksichtigt werden: Es sollte mit Wasser nicht mischbar sein und eine ausgeprägte Mischungslücke aufweisen, um eine klare Phasentrennung zu ermöglichen. Darüber hinaus sind ein hoher Verteilungskoeffizient für δ -Valerolacton, geringer Verteilungskoeffizient für Substrate und Zwischenprodukte, chemische Inertheit gegenüber dem Produkt sowie eine geringe Flüchtigkeit für nachgeschaltete Verarbeitungsschritte geeignet.

Die von Kara et al. (2013) diskutierten Lösungsmittel, wie Diisopropylether, stellen eine gute Grundlage für weiterführende Tests dar. Ein wesentlicher Vorteil der *LbADH* gegenüber der *horse liver ADH* besteht in ihrer erhöhten Lösungsmitteltoleranz. Dadurch eröffnen sich für dieses Reaktionssystem potenziell weitere Möglichkeiten zur Integration eines Zweiphasensystems, ohne die Enzymaktivität wesentlich zu beeinträchtigen.

5.5 Modellbasierte Optimierung und Sensitivitätsanalyse als Grundlage für die Systemverbesserung

Ein Aspekt, der in dieser Arbeit bislang nicht ausreichend diskutiert wurde, ist der konkrete Nutzen des entwickelten Modells. Dieser lässt sich in zwei wesentliche Anwendungsbereiche unterteilen.

Zum einen ermöglicht das Modell die Optimierung der Startbedingungen, ohne dass hierfür zusätzliche experimentelle Versuche notwendig sind. Dies ist insbesondere für die Planung ressourcenschonender und effizienter Experimente von großer Bedeutung. Während das Modell in seiner aktuellen Version ohne Cofaktorregenerierung noch eine begrenzte Aussagekraft besitzt, würde eine Erweiterung um diesen Mechanismus interessante Einblicke in das kinetische Verhalten des Gesamtsystems ermöglichen. So könnten gezielte Vorhersagen zu Umsatz und Ausbeute unter verschiedenen Bedingungen getroffen werden. Bei einer zukünftigen Modellanpassung an einen kontinuierlichen Prozess ließen sich zudem geeignete Betriebsfenster identifizieren, was insbesondere für die Prozessentwicklung und das Scale-up von praktischer Relevanz ist.

Zum anderen erlaubt das Modell die Durchführung von Sensitivitätsanalysen, bei denen systematisch untersucht wird, welche Startbedingungen oder kinetischen Parameter den größten Einfluss auf das Systemverhalten ausüben. Schroer et al. (2009) konnten beispielsweise zeigen,

dass bei der in ihrer Arbeit untersuchten Ganzzellkatalyse die intrazelluläre Enzymkonzentration den dominierenden Einfluss auf den Reaktionsverlauf hatte.

Auch für das in dieser Arbeit betrachtete Reaktionssystem könnten entsprechende Sensitivitätsanalysen wertvolle Erkenntnisse liefern. So ließe sich beispielsweise untersuchen, in Bezug auf welche kinetischen Parameter die G37D-Variante der *Lb*ADH noch Entwicklungspotenzial aufweist. Eine solche Analyse könnte gezielte Ansatzpunkte für das Protein Engineering liefern und damit langfristig zur Effizienzsteigerung des Gesamtsystems beitragen.

5.6 G37D vielversprechend für andere Katalysatorformen

Da in dieser Arbeit ausschließlich das isolierte Enzym untersucht wurde, konnte die Variante G37D aufgrund ihrer vergleichsweise hohen Aktivität sowie ihrer NAD^+ -Abhängigkeit als die geeignetste selektiert werden. Es bleibt jedoch zu klären, inwieweit diese Bewertung durch die jeweilige Katalysatorform beeinflusst wird. Die Mutante R38P wird in dieser Diskussion nicht berücksichtigt, da die ermittelten Aktivitäten deutlich niedriger waren als die des Wildtyps und der Variante G37D.

Bei einer Ganzzellkatalyse lässt sich der pH-Wert nur eingeschränkt kontrollieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *E. coli* trotz variierender extrazellulärer Bedingungen den intrazellulären pH-Wert in einem Bereich von pH 7,4 bis 7,9 konstant hält [68]. Obwohl das pH-Optimum des Wildtyps etwas unter dem der Variante G37D liegt, zeigen beide Enzyme keine signifikanten Unterschiede in ihrer pH-abhängigen Aktivität, die eine klare Selektion rechtfertigen würden.

Von größerem Interesse sind daher die intrazellulären Konzentrationen der Cofaktoren. Laut Schroer et al. (2009) liegt die Konzentration von NAD^+ mit $566 \mu\text{mol L}^{-1}$ um ein Vielfaches über der von NADP^+ ($48 \mu\text{mol L}^{-1}$). Auch die reduzierten Formen sind jeweils niedriger konzentriert: $3,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ für NADH und $0,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ für NADPH. Diese Verteilung erscheint insgesamt günstig für die in dieser Arbeit untersuchte oxidative Lactonisierung. Besonders die deutlich höhere Verfügbarkeit von NAD^+ gegenüber NADP^+ spricht für den Einsatz der Variante G37D. Diese Einschätzung basiert jedoch lediglich auf theoretischen Überlegungen und muss experimentell bestätigt werden.

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist die Stabilität der Cofaktoren. Schroer et al. (2009) berichteten, dass NAD^+ in ihrem Reaktionssystem deutlich instabiler war als das phosphorylierte Äquivalent NADP^+ . In der vorliegenden Arbeit wurden erste Versuche zur chemischen Stabilität der Cofaktoren unter Verwendung der eingesetzten Substrate durchgeführt, indem diese inkubiert und die Restaktivität im Aktivitätsassay bestimmt wurde. Die Ergebnisse waren jedoch nicht aussagekräftig und wurden daher nicht in die Arbeit aufgenommen. Eine genauere

Untersuchung, zum Beispiel mittels Flüssigkeitschromatographie zur quantitativen Bestimmung der Cofaktorkonzentrationen, könnte hier weiterführende Erkenntnisse liefern.

Zusammenfassend erscheint die Variante G37D auch für den Einsatz in einer Ganzzellkatalyse vielversprechend. Eine Simulation unter *in vivo* Cofaktor-Konzentrationen könnte weitere Einblicke in ihre Eignung für biokatalytische Anwendungen liefern. Für eine abschließende Bewertung sind jedoch weiterführende experimentelle Untersuchungen erforderlich.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Auflistung der verwendeten Medien und Lösungen	12
Tabelle 3.2	Auflistung der verwendeten Stämme	13
Tabelle 3.3	Auflistung der verwendeten Plasmide	13
Tabelle 3.4	Zusammensetzung der Puffer zur Proteinaufreinigung	15
Tabelle 3.5	Zusammensetzung des KPi-Puffers zur Lagerung der Proteinlösung . .	16
Tabelle 3.6	Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE	17
Tabelle 3.7	Zusammensetzung der Lauf- und Ladepuffer für die SDS-PAGE	17
Tabelle 3.8	Zusammensetzung der Färbelösung für die SDS-PAGE	18
Tabelle 3.9	Zusammensetzung der Bradford-Reagenz	18
Tabelle 3.10	Einstellungen des FLUOstar® Plate Readers	19
Tabelle 3.11	Einstellungen der Eppendorf Xplorer® Plus Pipettierhilfe	20
Tabelle 3.12	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für den Aktivitätsassay . .	20
Tabelle 3.13	GC-Ofenprogramm	23
Tabelle 3.14	Ionenübersicht der analysierten Komponenten im SIM-Modus	23
Tabelle 3.15	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Biotransformationen	24
Tabelle 3.16	Zusammensetzung der Puffer zum Test der Hydrolyse	25
Tabelle 4.1	Katalytische Effizienz der Varianten mit NAD^+	33
Tabelle 4.2	Kinetische Parameter von r_1 – r_3	36
Tabelle 4.3	Startkonzentrationen der eingesetzten Substrate und Cofaktoren in den Teilreaktionen R_1 bis R_3	38
Tabelle 4.4	Ermittelte Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten der Lacton- Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen	50
Tabelle 4.5	Kinetische Parameter der Reaktionen R_1 – R_3 , R_5 und R_6	53
Tabelle 5.1	Vergleich kinetischer Parameter zwischen eigener Arbeit und Literatur- angaben	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Klassifikation von Kunststoffen nach Herkunft und Abbaubarkeit [7] . . .	2
Abbildung 1.2	Übersicht der ROP on ϵ -Caprolacton, δ -Valerolacton und γ -Butyrolacton zu PCL, PVL und PBL	3
Abbildung 1.3	Oxidative Lactonisierung von Diolen	5
Abbildung 1.4	Quartär und tertiär Struktur der <i>Lb</i> ADH	6
Abbildung 1.5	Vergleich der Kofaktorbindung zwischen Wildtyp und der Variante G37D	7
Abbildung 1.6	Substratspektrum der <i>Lb</i> ADH	8
Abbildung 1.7	Theorell-Chance-Mechanismus bei Zwei-Substrat-Reaktionen	10
Abbildung 2.1	Erweiterte Reaktionsgleichung mit Cofaktorregenerierungssystem . . .	11
Abbildung 4.1	SDS-PAGE der Lysate und der isolierten Enzyme	28
Abbildung 4.2	Vergleich der Aktivität aller Varianten bei unterschiedlichen pH-Werten unter Betrachtung der Modellreaktion	30
Abbildung 4.3	Vergleich kinetischer Parameter und Aktivitätsverläufe der Varianten unter Betrachtung der Modellreaktion	31
Abbildung 4.4	Darstellung der betrachteten „Black Box“	33
Abbildung 4.5	Vergleich der kinetischen Parameter für wt, G37D und R38P unter Berücksichtigung der Zielreaktion	34
Abbildung 4.6	Reaktionsweg von 1,5-Pentandiol zu δ -Valerolacton	35
Abbildung 4.7	Vergleich der Parameter für r_1 , r_2 und r_3	37
Abbildung 4.8	Vergleich der gemessenen und berechneten Aktivitäten	39
Abbildung 4.9	Simulierter zeitlicher Verlauf von Konzentrationen und Reaktionsraten .	41
Abbildung 4.10	Vergleich von Simulation und Messdaten des zeitlichen Verlaufs der 1,5-Pentandiol Konzentration bei variierender 1,5-Pentandiol- Startkonzentration	43
Abbildung 4.11	Vergleich von simulierten und gemessenen Konzentrationen von Lactol und δ -Valerolacton bei variierender 1,5-Pentandiol-Konzentration	44
Abbildung 4.12	Bestimmung der Inaktivierungskinetik des Enzyms	46
Abbildung 4.13	Bestimmung der Hydrolysekinetik von δ -Valerolacton	47

Abbildung 4.14	Simulierte und gemessene Konzentrationen von Lactol und δ -Valerolacton unter Berücksichtigung von Enzyminaktivierung und Hydrolyse	49
Abbildung 4.15	Simulierte und gemessene Konzentrationen von Lactol und δ -Valerolacton unter Berücksichtigung optimierter Modellparameter	51
Abbildung 4.16	Erweiterte Reaktionsgleichung mit Cofaktorregenerierungssystem . . .	52
Abbildung 4.17	Vergleich von Simulation und Messdaten bei variierender Aceton-Konzentration	57
Abbildung 4.18	Gemessener Konzentrationsverlauf von Lactol und δ -Valerolacton bei variierender Aceton-Konzentration	59
Abbildung 4.19	Gemessener Konzentrationsverlauf von Lactol und δ -Valerolacton mit G37D und Wildtyp	60
Abbildung 4.20	Aktivitätsvergleich in KPI- und GlycinNaOH-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten	61
Abbildung 4.21	Gemessener Konzentrationsverlauf von Lactol (A) und δ -Valerolacton (B) bei pH 8 (KPi) und pH 9 (GlycinNaOH)	62
Abbildung A.1	Kalibriergeraden zur photometrischen Bestimmung von NADH und NADPH bei 340 nm	x
Abbildung A.2	GC-MS-Kalibriergeraden für 1,5-Pentandiol, δ -Valerolacton und Lactol .	xi
Abbildung A.3	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps in Bezug auf NAD	xi
Abbildung A.4	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps in Bezug auf NADP	xii
Abbildung A.5	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante G37D in Bezug auf NAD	xii
Abbildung A.6	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante G37D in Bezug auf NADP	xiii
Abbildung A.7	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante R38P in Bezug auf NAD	xiii
Abbildung A.8	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante R38P in Bezug auf NADP	xiv
Abbildung A.9	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Wildtyp in Bezug auf die Zielreaktion	xiv

Abbildung A.10	Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante R38P in Bezug auf die Zielreaktion	xv
Abbildung A.11	Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_1 mittels globalem Fit	xvi
Abbildung A.12	Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_2 mittels iterativem Fit	xvii
Abbildung A.13	Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_3 mittels globalem Fit mit Aceton-Inhibition	xviii
Abbildung A.14	Zeitlicher Zerfall von δ -Valerolacton unter Reaktionsbedingungen	xix
Abbildung A.15	Zeitlicher Zerfall von δ -Valerolacton in GlycinNaOH-Puffer	xx
Abbildung A.16	Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_5 mittels globalem Fit mit multipler Inhibition	xxi
Abbildung A.17	Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_6 mittels iterativem Fitmodell	xxii

Literaturverzeichnis

- [1] Saxena, R., Siddique, S., Gupta, T., Sharma, R. K. und Chaudhary, S. „Impact resistance and energy absorption capacity of concrete containing plastic waste“. In: *Construction and Building Materials* 176 (2018), S. 415–421. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2018.05.019.
- [2] Kumar Jha, K. und Kannan, T. „Recycling of plastic waste into fuel by pyrolysis - a review“. In: *Materials Today: Proceedings* 37 (2020), S. 3718–3720. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.10.181.
- [3] Kim, M., Chang, H., Zheng, L., Yan, Q., Pfleger, B., Klier, J., Nelson, K., Majumder, E. und Huber, G. „A Review of Biodegradable Plastics: Chemistry, Applications, Properties, and Future Research Needs“. In: *Chemical reviews* 123 (2023), S. 9915–9939. DOI: 10.1021/acs.chemrev.2c00876.
- [4] OECD. *Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options*. Report. Zugriff am 6. April 2025. Paris: OECD Publishing, 2022. DOI: 10.1787/de747aef-en.
- [5] Plastics Europe DE. *Plastics – the fast Facts 2024*. Zugriff am 5. April 2025. 2024. URL: <https://plasticseurope.org/de/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2024/>.
- [6] Sidek, I., Syed draman, S. f., Abdullah, S. und Anuar, N. „CURRENT DEVELOPMENT ON BIOPLASTICS AND ITS FUTURE PROSPECTS: AN INTRODUCTORY REVIEW“. In: *INWASCON Technology Magazine* (2019), S. 3–8. DOI: 10.26480/itechmag.01.2019.03.08.
- [7] Ross, G., Ross, S. und Tighe, B. „Chapter 23 - Bioplastics: New Routes, New Products“. In: *Brydson's Plastics Materials (Eighth Edition)*. Hrsg. von Gilbert, M. Eighth Edition. Butterworth-Heinemann, 2017, S. 631–652. ISBN: 9780323358248.
- [8] Narancic, T., Verstichel, S., Srinivasa Reddy, C., Morales-Gamez, L., Kenny, S., Wilde, B., Babu, R. und O Connor, K. „Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution“. In: *Environmental Science and Technology* 52 (2018), S. 10441–10452. DOI: 10.1021/acs.est.8b02963.
- [9] Chen, Y. „Advantages of Bioplastics and Global Sustainability“. In: *Applied Mechanics and Materials* 420 (2013), S. 209–214. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.420.209.
- [10] Narayan, R. „Carbon footprint of bioplastics using biocarbon content analysis and life-cycle assessment“. In: *MRS Bulletin* 36 (2011), S. 716–721. DOI: 10.1557/mrs.2011.210.
- [11] Getahun, M. J., Kassie, B. B. und Alemu, T. S. „Recent advances in biopolymer synthesis, properties and commercial applications: a review“. In: *Process Biochemistry* 145 (2024), S. 261–287. DOI: 10.1016/j.procbio.2024.06.034.
- [12] Van de Velde, K. und Kiekens, P. „Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications“. In: *Polymer Testing* 21.4 (2002), S. 433–442. DOI: 10.1016/S0142-9418(01)00107-6.
- [13] Bioplastics, E. *Bioplastics Market Development Update 2024*. Zugriff am 5. April 2025. 2024. URL: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics-market-development-update-2024/>.
- [14] Magistrali, P., Garcia, S. und Milizia, T. „Biodegradable Polyesters“. In: *Handbook of Biodegradable Polymers*. De Gruyter, 2020, S. 261–298. ISBN: 9781501511967.
- [15] Penczek, S., Pretula, J. und Slomkowski, S. „Ring-opening polymerization“. In: *Chemistry Teacher International* 3 (2021), S. 33–57. DOI: 10.1515/cti-2020-0028.

- [16] Mishra, G., Kinser, R., Wierzbicki, I., Alany, R. und Alani, A. „In Situ Gelling Polyvalerolactone-Based Thermosensitive Hydrogel for Sustained Drug Delivery.“ In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 88 (2014), S. 397–405. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.06.004.
- [17] Moore, T., Adhikari, R. und Gunatillake, T. „Chemosynthesis of bioresorbable poly(γ -butyrolactone) by ring-opening polymerisation: a review“. In: *Biomaterials* 26 (2005), S. 3771–3782. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.002.
- [18] Labet, M. und Thielemans, W. „Synthesis of polycaprolactone: A review“. In: *Chemical Society reviews* 38 (2009), S. 3484–3504. DOI: 10.1039/b820162p.
- [19] Song, Q., Zhao, J., Zhang, G., Peruch, F. und Carlotti, S. „Ring-opening (co)polymerization of γ -butyrolactone: a review“. In: *Polymer Journal* 52 (2019), S. 1–9. DOI: 10.1038/s41428-019-0265-5.
- [20] Dastidar, R. G., Chavarrio, J. E., Jiang, Z., McClelland, D. J., Mavrikakis, M. und Huber, G. W. „Catalytic production of δ -valerolactone (DVL) from biobased 2-hydroxytetrahydropyran (HTHP) – Combined experimental and modeling study“. In: *Applied Catalysis B: Environment and Energy* 360 (2025), S. 124519. DOI: 10.1016/j.apcatb.2024.124519.
- [21] Tokiwa, Y. und Calabia, B. „Biodegradability and biodegradation of poly(lactide)“. In: *Applied microbiology and biotechnology* 72 (2006), S. 244–251. DOI: 10.1007/s00253-006-0488-1.
- [22] Woodruff, M. und Hutmacher, D. „The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century“. In: *Progress in Polymer Science* 35 (2010), S. 1217–1256. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [23] Hu, Q., Jie, S.-Y., Braunstein, P. und Li, B.-G. „Ring-opening Copolymerization of ϵ -Caprolactone and δ -Valerolactone Catalyzed by a 2,6-Bis(amino)phenol Zinc Complex“. In: *Chinese Journal of Polymer Science* 38 (2019), S. 240–247. DOI: 10.1007/s10118-020-2347-4.
- [24] Kurcok, P., Dubois, P., Sikorska, W., Jedliński, Z. und Jérôme, R. „Macromolecular Engineering of Lactones and Lactides. 24. Controlled Synthesis of (R,S)- β -Butyrolactone-*b*- ϵ -Caprolactone Block Copolymers by Anionic and Coordination Polymerization“. In: *Macromolecules* 30.19 (1997), S. 5591–5595. DOI: 10.1021/ma970212p.
- [25] Faÿ, F., Renard, E., Langlois, V., LINOSSIER, I. und Vallée-Rehel, K. „Development of poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone-co-delta-valerolactone) as new degradable binder used for antifouling paint“. In: *European Polymer Journal* 43 (2007), S. 4800–4813. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.07.045.
- [26] Brückner, R. *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2004. ISBN: 978-3-662-45683-5.
- [27] Cavani, F., Raabova, K., Bigi, F. und Quarantelli, C. „A Rationale of the Baeyer-Villiger Oxidation of Cyclohexanone to ϵ -Caprolactone with Hydrogen Peroxide: Unprecedented Evidence for a Radical Mechanism Controlling Reactivity“. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 16 (2010), S. 12962–12969. DOI: 10.1002/chem.201001777.
- [28] Tang, D., Shen, Z., Lechler, S., Lu, G., Yao, L., Hu, Y., Huang, X., Muhler, M., Zhao, G. und Peng, B. „Aerobic oxidative lactonization of diols at room temperature over defective titanium-based oxides in water“. In: *Journal of Catalysis* 418 (2023), S. 237–246. DOI: 10.1016/j.jcat.2023.01.025.

- [29] Makita, A., Nihira, T. und Yamada, Y. „Lipase catalyzed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvents“. In: *Tetrahedron Letters* 28.7 (1987), S. 805–808. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)80995-3.
- [30] Kara, S., Spickermann, D., Schrittwieser, J., Weckbecker, A., Leggewie, C., Arends, I. und Hollmann, F. „Access to Lactone Building Blocks via Horse Liver Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Oxidative Lactonization“. In: *ACS Catalysis* 3 (2013), S. 2436–2439. DOI: 10.1021/cs400535c.
- [31] Dithugoe, C., Marwijk, J., Smit, M. und Opperman, D. „An Alcohol Dehydrogenase from the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Family of Enzymes for the Lactonization of Hexane-1,6-diol“. In: *ChemBioChem* 20 (2018), S. 96–102. DOI: 10.1002/cbic.201800533.
- [32] Rodríguez, C., Borzęcka, W., Sattler, J., Kroutil, W., Lavandera, I. und Gotor, V. „Steric vs. electronic effects in the *Lactobacillus brevis* ADH-catalyzed bioreduction of ketones“. In: *Organic and biomolecular chemistry* 12 (2013), S. 673–681. DOI: 10.1039/c3ob42057d.
- [33] Staudt, S., Bornscheuer, U. T., Menyes, U., Hummel, W. und Gröger, H. „Direct biocatalytic one-pot-transformation of cyclohexanol with molecular oxygen into ϵ -caprolactone“. In: *Enzyme and Microbial Technology* 53.4 (2013), S. 288–292. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.03.011.
- [34] Nakagawa, Y. und Tomishige, K. „Production of 1,5-pentanediol from biomass via furfural and tetrahydrofurfuryl alcohol“. In: *Catalysis Today* 195 (2012), S. 136–143. DOI: 10.1016/j.cattod.2012.04.048.
- [35] Wang, C., Lee, J., Ji, Y., Onn, T., Luo, J., Murray, C. und Gorte, R. „A Study of Tetrahydrofurfuryl Alcohol to 1,5-Pentanediol Over Pt-WO_x/C“. In: *Catalysis Letters* 148 (2018), S. 1047–1054. DOI: 10.1007/s10562-018-2323-6.
- [36] Chen, S., Wojcieszak, R., Dumeignil, F., Marceau, E. und Royer, S. „How Catalysts and Experimental Conditions Determine the Selective Hydroconversion of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural“. In: *Chemical Reviews* 118 (2018), S. 11023–11117. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00134.
- [37] Han, T., Kim, G. und Lee, S. Y. „Glutaric acid production by systems metabolic engineering of an L-lysine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2020), S. 30328–30334. DOI: 10.1073/pnas.2017483117.
- [38] Hildebrand, F. und Lütz, S. „Immobilisation of alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* and its application in a plug-flow reactor“. In: *Tetrahedron-asymmetry* 17 (2006), S. 3219–3225. DOI: 10.1016/j.tetasy.2006.11.013.
- [39] Schlieben, N., Niefind, K., Mueller, J., Riebel, B., Hummel, W. und Schomburg, D. „Atomic Resolution Structures of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Provide the Structural Bases of its Substrate and Cosubstrate Specificity“. In: *Journal of molecular biology* 349 (2005), S. 801–813. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.04.029.
- [40] Halloum, I., Thompson, B., Pugh, S. und Nielsen, D. „Activity of *Lactobacillus brevis* Alcohol Dehydrogenase on Primary and Secondary Alcohol Biofuel Precursors“. In: *Fermentation* 1 (2015), S. 24–37. DOI: 10.3390/fermentation1010024.
- [41] Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W. und Schomburg, D. „The Crystal Structure of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Suggests the Structural Basis of its Metal Dependency“. In: *Journal of Molecular Biology* 327.2 (2003), S. 317–328. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00081-0.

- [42] Machielsen, R., Looger, L. L., Raedts, J., Dijkhuizen, S., Hummel, W., Hennemann, H.-G., Dausmann, T. und Oost, J. van der. „Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design“. In: *Engineering in Life Sciences* 9.1 (2009), S. 38–44. DOI: 10.1002/elsc.200800046.
- [43] Hermann, J., Nowotny, P., Schrader, T. E., Biggel, P., Hekmat, D. und Weuster-Botz, D. „Neutron and X-ray crystal structures of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase reveal new insights into hydrogen-bonding pathways“. In: *Acta Crystallographica Section F* 74.12 (2018), S. 754–764. DOI: 10.1107/S2053230X18015273.
- [44] Leuchs, S. und Greiner, L. „Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: A Versatile Robust Catalyst for Enantioselective Transformations“. In: *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25 (2011), S. 267–281.
- [45] Bornadel, A., Hatti-Kaul, R., Hollmann, F. und Kara, S. „A Bi-enzymatic Convergent Cascade for ϵ -Caprolactone Synthesis Employing 1,6-Hexanediol as a ‘Double-Smart Cosubstrate’“. In: *ChemCatChem* (2015), S. 2442–2445. DOI: 10.1002/cctc.201500511.
- [46] Ulusu, N. „Evolution of Enzyme Kinetic Mechanisms“. In: *Journal of molecular evolution* 80 (2015), S. 251–257. DOI: 10.1007/s00239-015-9681-0.
- [47] Jaeger, K.-E., Liese, A. und Syldatk, C. „Kapitel 4: [Enzymkinetik]“. In: *Einführung in die Enzymtechnologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2018, [53–69]. ISBN: 978-3-662-57618-2.
- [48] Segel, I. H. „Steady-State Kinetics of Multireactant Enzyme Systems“. In: *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New York: Wiley-Interscience, 1975. Kap. 9, S. 505–845. ISBN: 978-0-471-77463-6.
- [49] Ulusu, N. und Sengezer, C. „Kinetic mechanism and some properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from sheep brain cortex“. In: *Turkish Journal of Biochemistry* 37 (2012), S. 340–347. DOI: 10.5505/tjb.2012.83007.
- [50] Bertani, G. „STUDIES ON LYSOGENESIS I“. In: *Journal of Bacteriology* 62.3 (1951), S. 293–300. DOI: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
- [51] William Studier, F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. „[6] Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes“. In: *Gene Expression Technology*. Bd. 185. Methods in Enzymology. Academic Press, 1990, S. 60–89.
- [52] Hanahan, D. „Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids“. In: *Journal of Molecular Biology* 166.4 (1983), S. 557–580. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [53] Laemmli, U. K. „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4“. eng. In: *Nature (London)* 227.5259 (1970), S. 680–685.
- [54] Bradford, M. M. „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [55] Eden, K. und Gebhard, H. *Dokumentation in der Mess- und Prüftechnik: Messen – Auswerten – Darstellen – Protokolle – Berichte – Präsentationen*. 3. Aufl. Wiesbaden: Springer Vieweg, 2024. ISBN: 978-3-658-44778-6.
- [56] Olson, A. R. und Hyde, J. L. „The Mechanism of Lactone Hydrolysis“. In: *Journal of the American Chemical Society* 63.9 (1941), S. 2459–2461. DOI: 10.1021/ja01854a042.
- [57] Gómez-Bombarelli, R., Calle, E. und Casado, J. „Mechanisms of Lactone Hydrolysis in Neutral and Alkaline Conditions“. In: *The Journal of Organic Chemistry* 78.14 (2013), S. 6868–6879. DOI: 10.1021/jo400258w.

- [58] Zhang, Z., Xue, J., Sun, Z., Wang, J., Xu, G. und Ni, Y. „Development and Comparison of Substrate-Supplied and Product-Convergent Redox-Neutral Cascade Reactions for the Sustainable Synthesis of Lactones“. In: *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 11.28 (2023), S. 10380–10390.
- [59] Xu, G., Zhu, C., Li, A., Ni, Y., Han, R., Zhou, J. und Ni, Y. „Engineering an Alcohol Dehydrogenase for Balancing Kinetics in NADPH Regeneration with 1,4-Butanediol as a Cosubstrate“. In: *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 7.18 (2019), S. 15706–15714. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b03879.
- [60] Velasco-Lozano, S., Santiago-Arcos, J., Grazia Rubanu, M. und López-Gallego, F. „Cell-Free Biosynthesis of ω -Hydroxy Acids Boosted by a Synergistic Combination of Alcohol Dehydrogenases“. In: *ChemSusChem* 15.9 (2022), e202200397. DOI: 10.1002/cssc.202200397.
- [61] Ferreira, P., Fernandes, P. A. und Ramos, M. J. „Modern computational methods for rational enzyme engineering“. In: *Chem Catalysis* 2.10 (2022), S. 2481–2498. DOI: 10.1016/j.checat.2022.09.036.
- [62] Kano, K., Shirai, O., Kitazumi, Y., Sakai, K. und Xia, H.-Q. *Enzymatic Bioelectrocatalysis*. 1. Aufl. SpringerBriefs in Molecular Science. Singapore: Springer Nature Singapore, 2020. ISBN: 978-981-15-8959-1.
- [63] Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Lütz, S., Daußmann, T. und Wandrey, C. „Kinetic Modeling of Acetophenone Reduction Catalyzed by Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp.“ In: *Biotechnology Letters* 27 (2005), S. 1087–1095. DOI: 10.1007/s10529-005-8455-y.
- [64] Schroer, K., Zelic, B., Oldiges, M. und Lütz, S. „Metabolomics for biotransformations: Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 104.2 (2009), S. 251–260. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.22390>.
- [65] Brandt, R. B. „[6] Determination of d-lactate in plasma“. In: *Carbohydrate Metabolism - Part D*. Bd. 89. Methods in Enzymology. Academic Press, 1982, S. 35–40.
- [66] Šťávková, J., Beránek, J., Nelson, E. P., Diep, B. A. und Kubátová, A. „Limits of detection for the determination of mono- and dicarboxylic acids using gas and liquid chromatographic methods coupled with mass spectrometry“. In: *Journal of Chromatography B* 879.17 (2011), S. 1429–1438. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.11.027.
- [67] Bal, D. und Gryff-Keller, A. „ ^1H and ^{13}C NMR study of 2-hydroxyglutaric acid and its lactone“. In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 40.8 (2002), S. 533–536. DOI: 10.1002/mrc.1053.
- [68] Xu, Y., Zhao, Z., Tong, W., Zhang, C., Liu, B., Shen, X. und Lu, X. „An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*“. In: *Nature Communications* 20 (2020), 11(1):1496. DOI: 10.1038/s41467-020-15350-5.

A Appendix

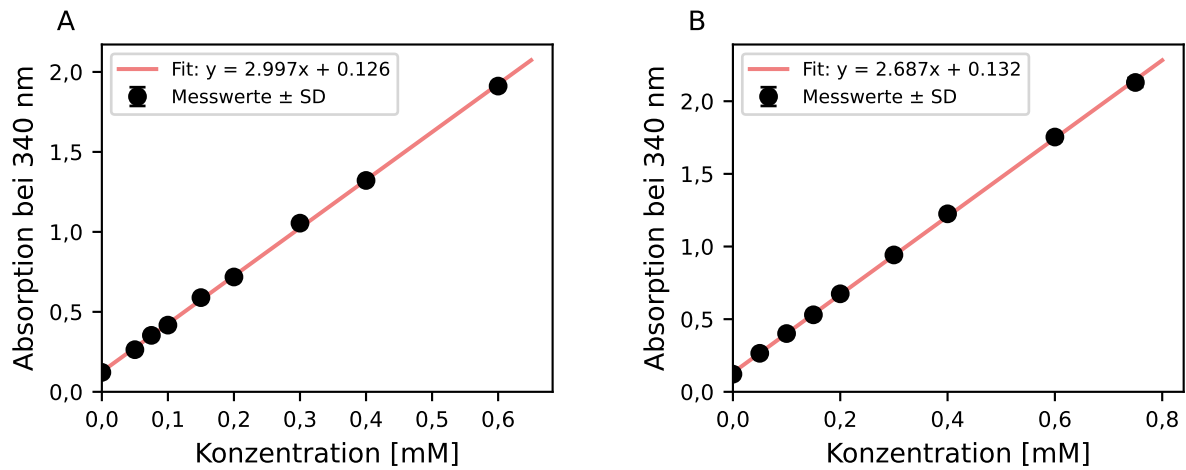


Abbildung A.1: Kalibriergeraden zur photometrischen Bestimmung von NADH und NADPH bei 340 nm.

Die Abbildung zeigt die Kalibriergerade für NADH (A) und die Kalibriergerade für NADPH (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Fehlerbalken (Standardabweichung). Die linearen Regressionsgleichungen wurden für die Umrechnung der enzymatischen Aktivität verwendet.

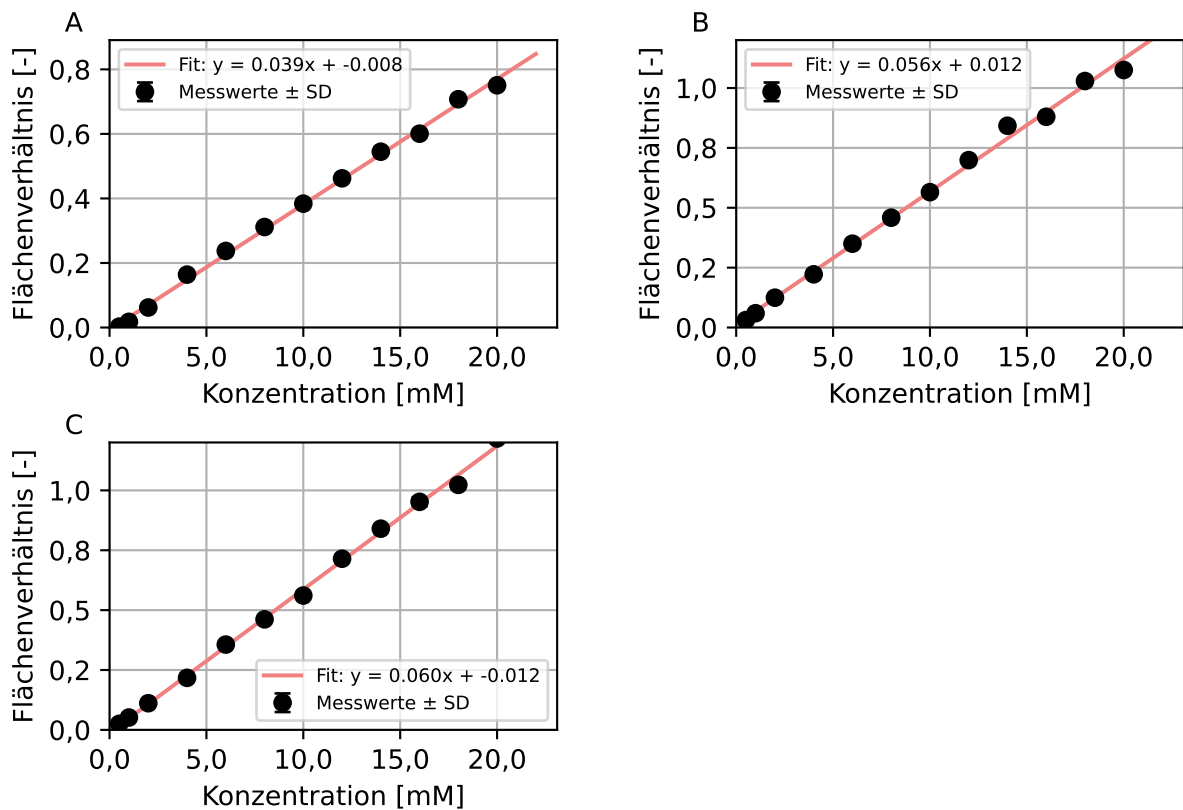


Abbildung A.2: GC-MS-Kalibriergeraden für 1,5-Pentandiol, δ-Valerolacton und Lactol.

Die Abbildung zeigt die Kalibriergerade für 1,5-Pentandiol (A), Kalibriergerade für δ-Valerolacton (B) und die Kalibriergerade für Lactol (C). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Fehlerbalken (Standardabweichung). Die linearen Regressionsgleichungen wurden zur quantitativen Auswertung der GC-MS-Messungen verwendet.

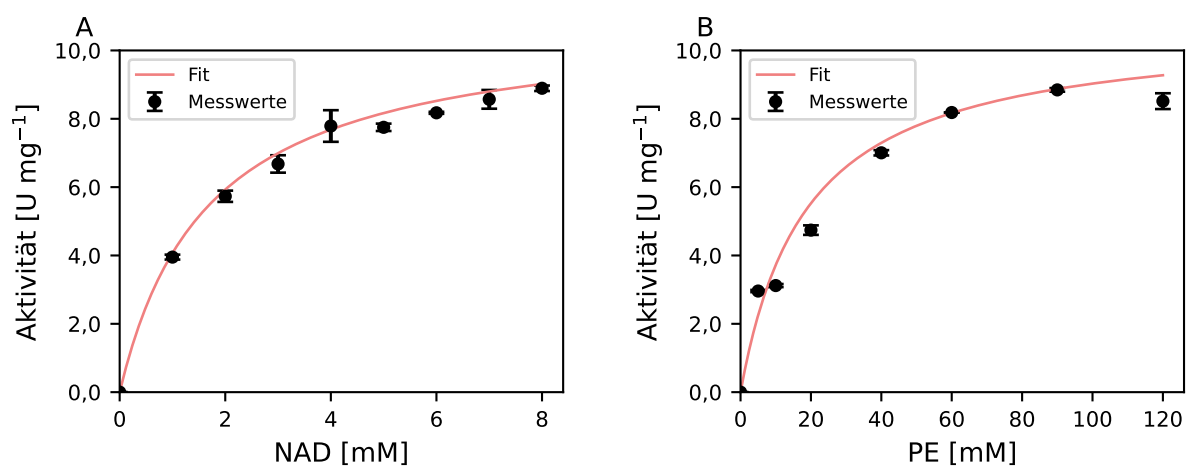


Abbildung A.3: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps in Bezug auf NAD.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem Phenylethanol (90 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Phenylethanol-Konzentration bei konstantem NAD (8 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

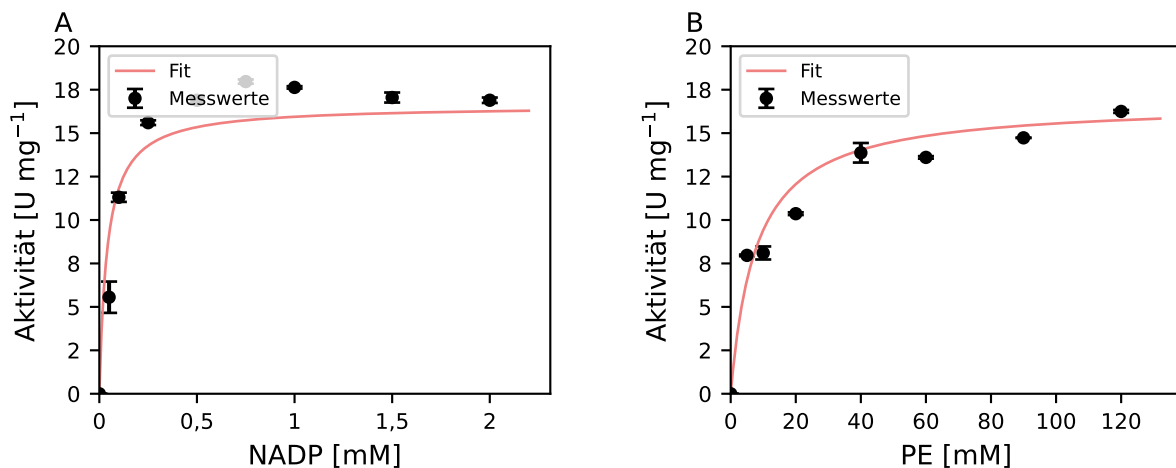


Abbildung A.4: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps in Bezug auf NADP.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NADP-Konzentration bei konstantem Phenylethanol (60 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Phenylethanol-Konzentration bei konstantem NADP (2 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

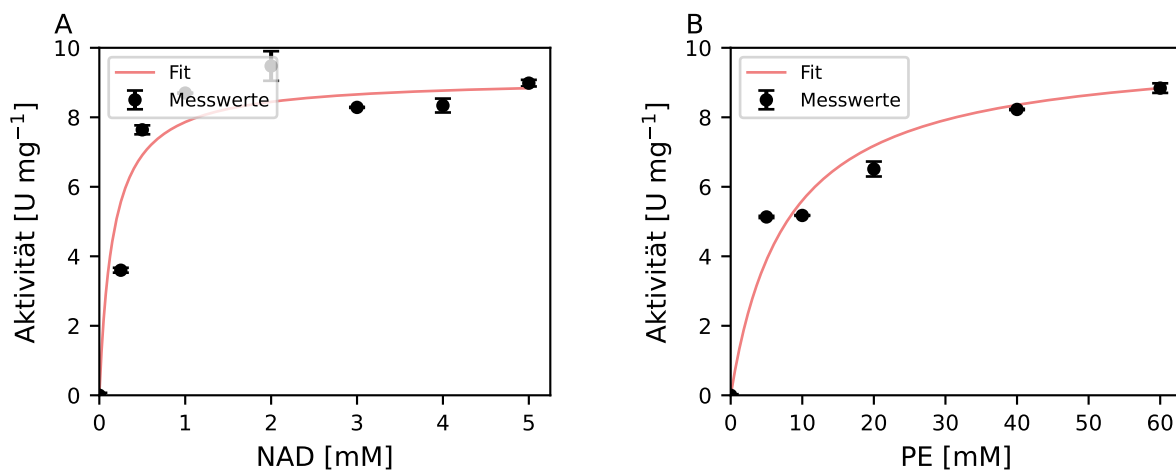


Abbildung A.5: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante G37D in Bezug auf NAD.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem Phenylethanol (60 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Phenylethanol-Konzentration bei konstantem NAD (3 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

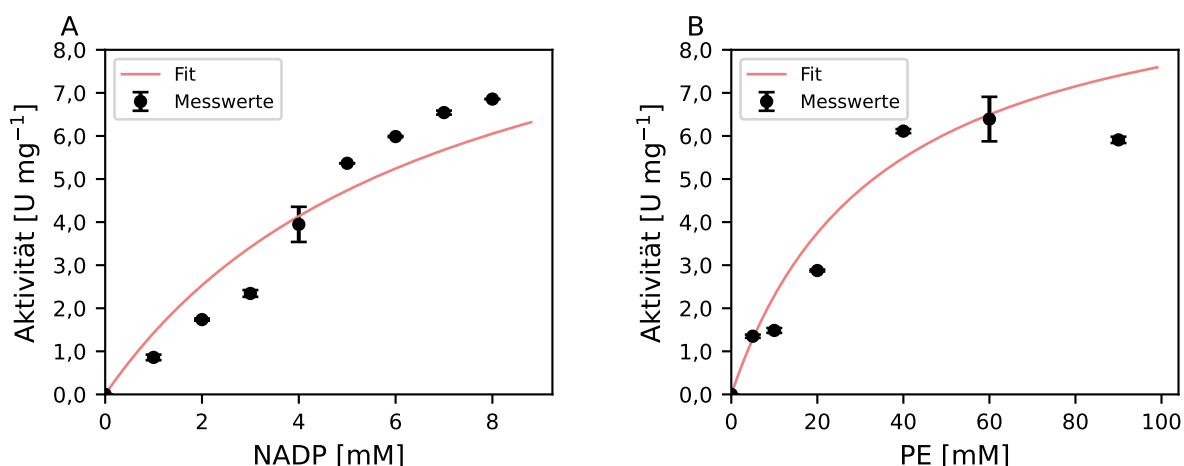


Abbildung A.6: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante G37D in Bezug auf NADP.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NADP-Konzentration bei konstantem Phenylethanol (60 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Phenylethanol-Konzentration bei konstantem NADP (8 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

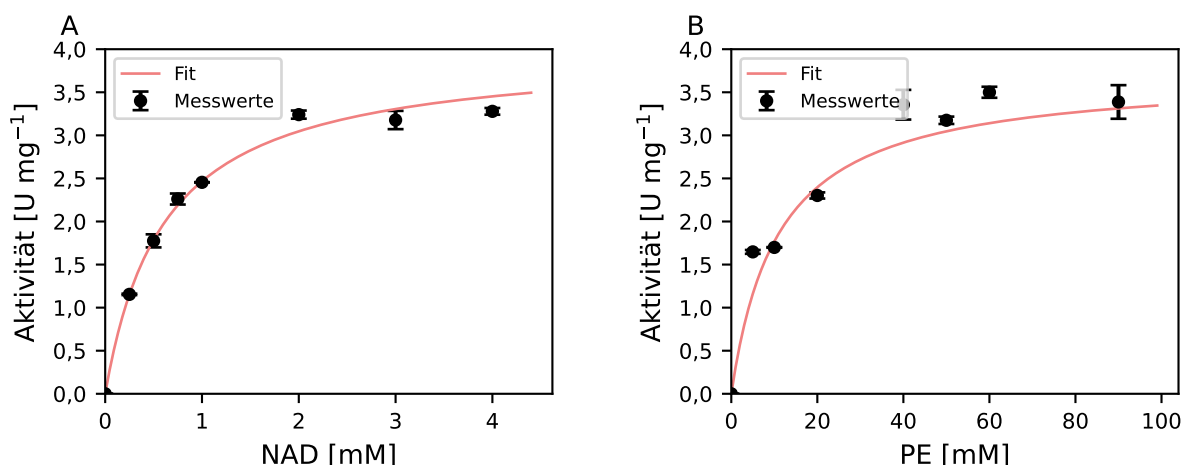


Abbildung A.7: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante R38P in Bezug auf NAD.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem Phenylethanol (90 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Phenylethanol-Konzentration bei konstantem NAD (3 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

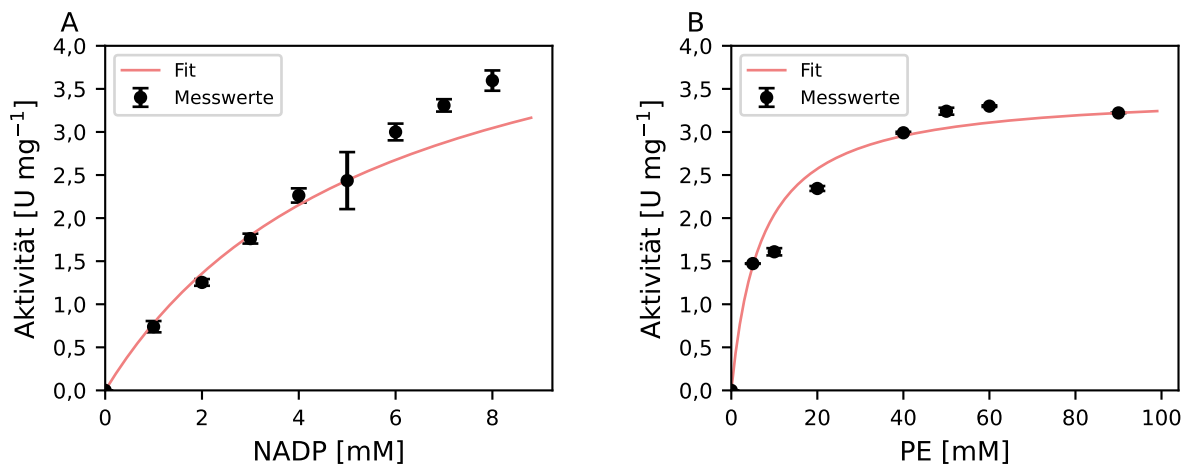


Abbildung A.8: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante R38P in Bezug auf NADP.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NADP-Konzentration bei konstantem Phenylethanol (60 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Phenylethanol-Konzentration bei konstantem NADP (8 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

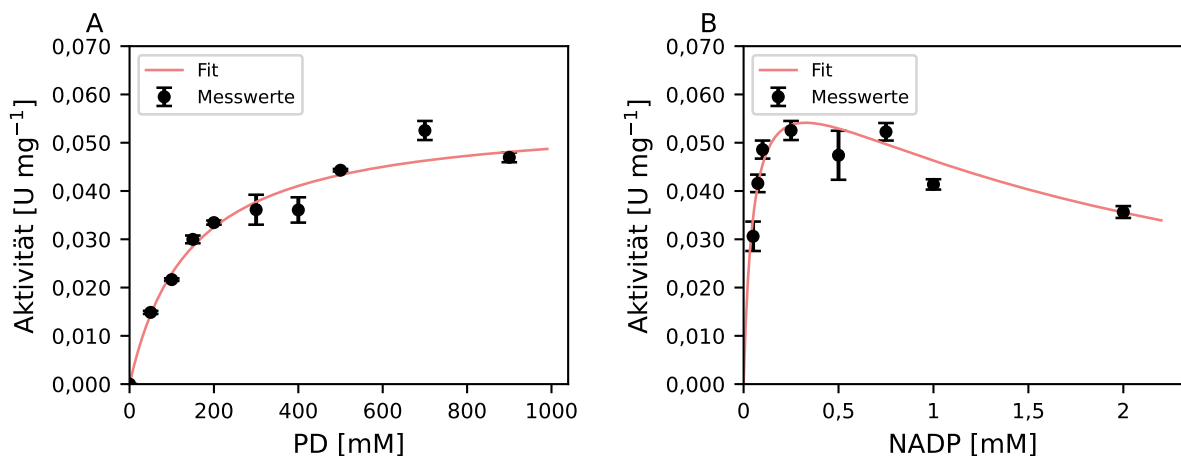


Abbildung A.9: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Wildtyp in Bezug auf die Zielreaktion.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NADP-Konzentration bei konstantem 1,5-Pentandiol (PD) (700 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der 1,5-Pentandiol-Konzentration bei konstantem NADP (0,25 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

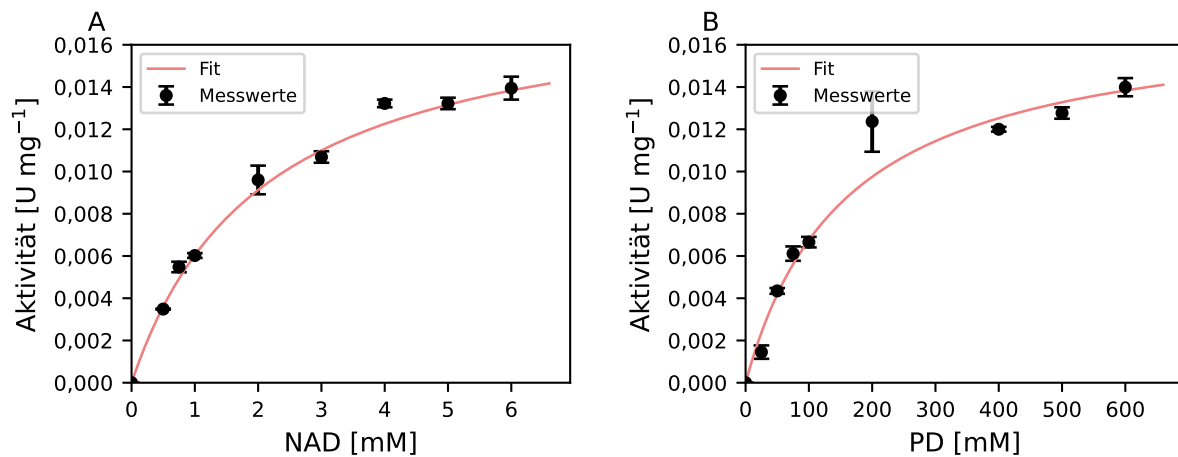


Abbildung A.10: Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Variante R38P in Bezug auf die Zielreaktion.

(A) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem 1,5-Pentandiol (PD) (600 mM). (B) Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der 1,5-Pentandiol-Konzentration bei konstantem NAD (5 mM). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

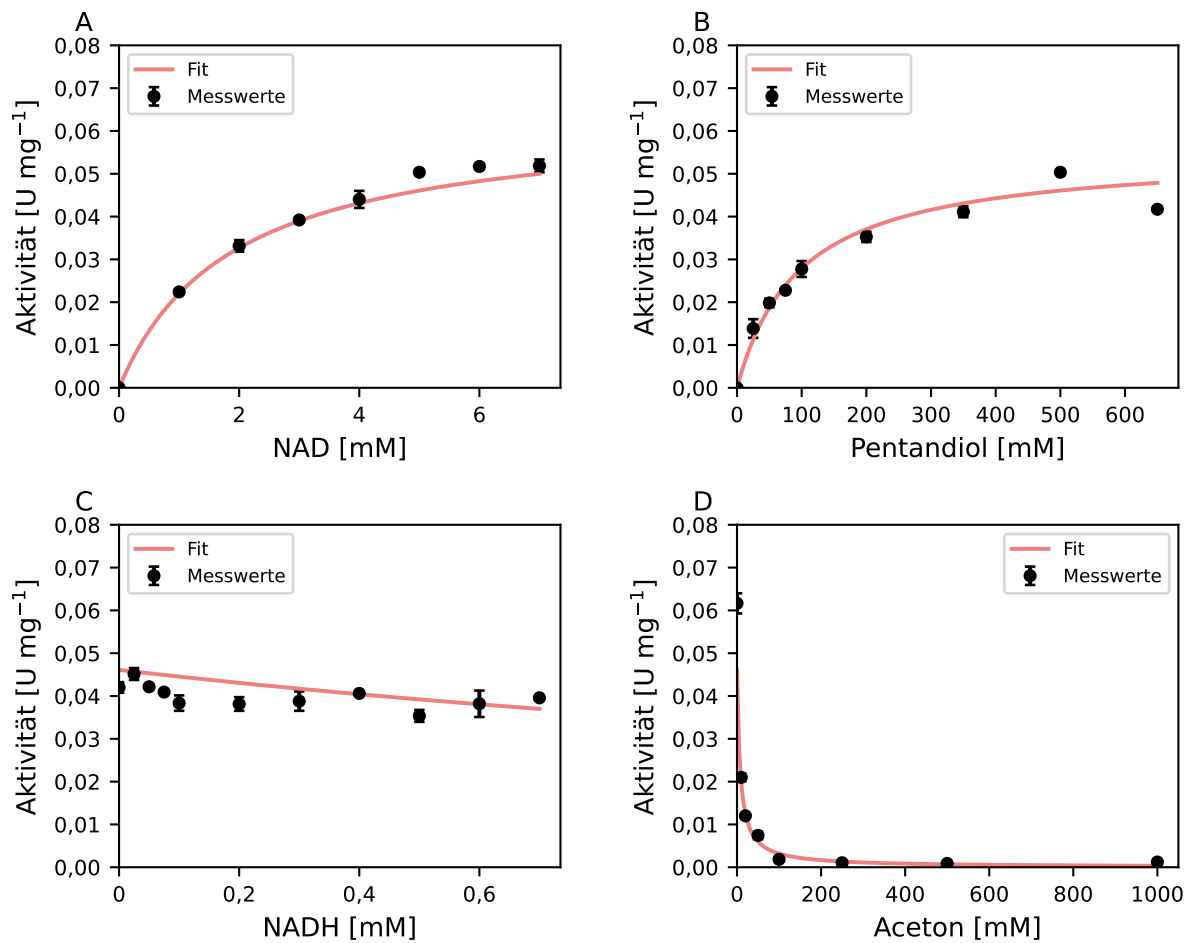


Abbildung A.11: Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_1 mittels globalem Fit.

(A) Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem 1,5-Pentandiol (500 mM).
 (B) Aktivität in Abhängigkeit der 1,5-Pentandiol-Konzentration (PD) bei konstantem NAD (5 mM).
 (C) Aktivität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration bei konstantem NAD (5 mM) und PD (500 mM).
 (D) Aktivität in Abhängigkeit der Aceton-Konzentration bei konstantem NAD (5 mM) und PD (500 mM).
 Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten mit Standardabweichung. Die Linien repräsentieren eine globale Modellanpassung gemäß einer erweiterten Mehrsubstrat-Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung.

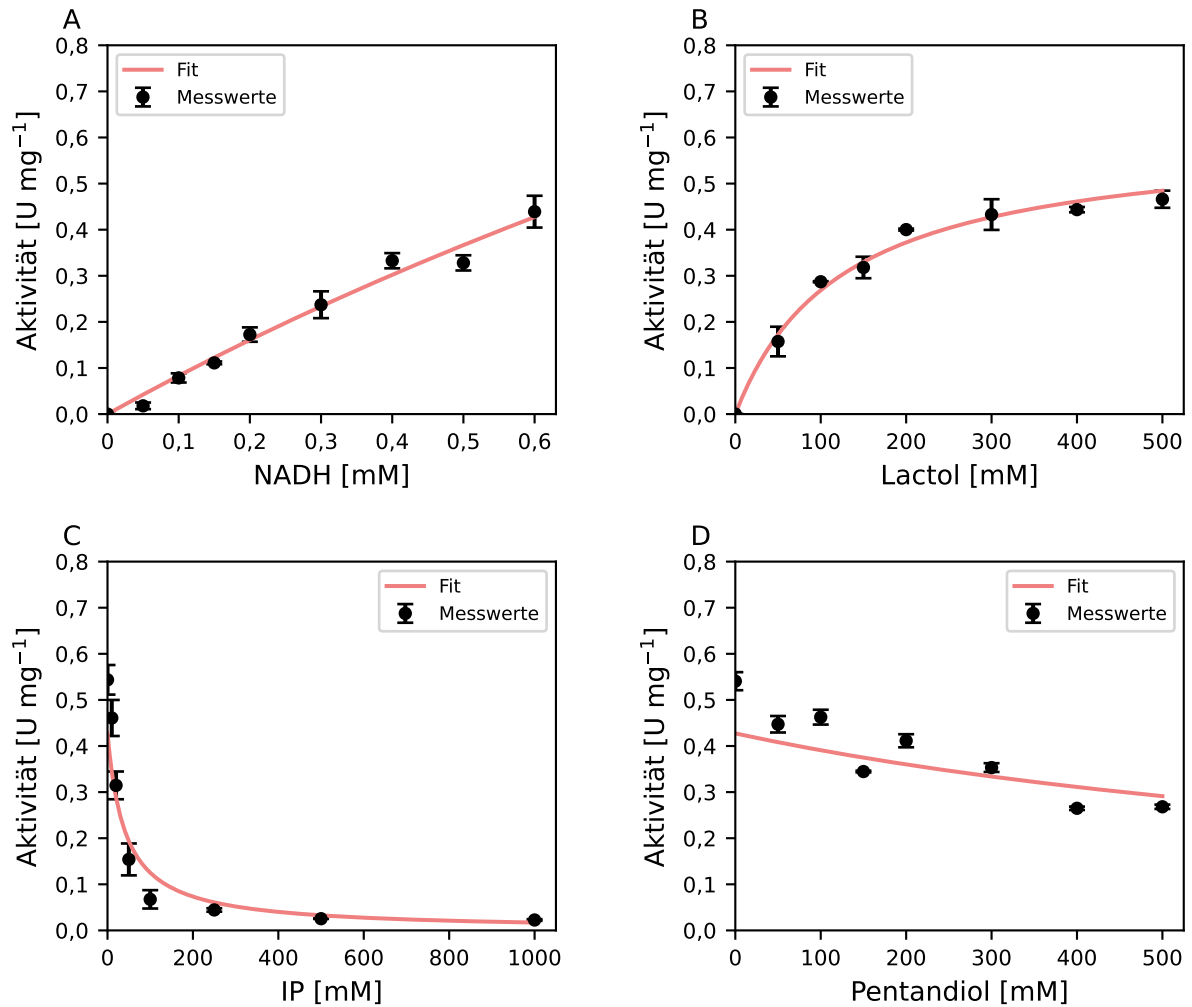


Abbildung A.12: Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_2 mittels iterativem Fit.

(A) Aktivität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration bei konstantem Lactol (300 mM), IP (0 mM) und 1,5-Pentandiol (PD) (0 mM).

(B) Aktivität in Abhängigkeit der Lactol-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), IP (0 mM) und PD (0 mM).

(C) Aktivität in Abhängigkeit der IP-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), Lactol (300 mM) und PD (0 mM).

(D) Aktivität in Abhängigkeit der PD-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), Lactol (300 mM) und IP (0 mM).

Die Linien zeigen die Modellanpassung anhand eines erweiterten Mehrsubstrat-Modells mit kompetitiver Inhibition. Die Parameter V_{\max}^{app} , K_m^{app} und K_i^{app} wurden iterativ über **37 Iterationen** bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

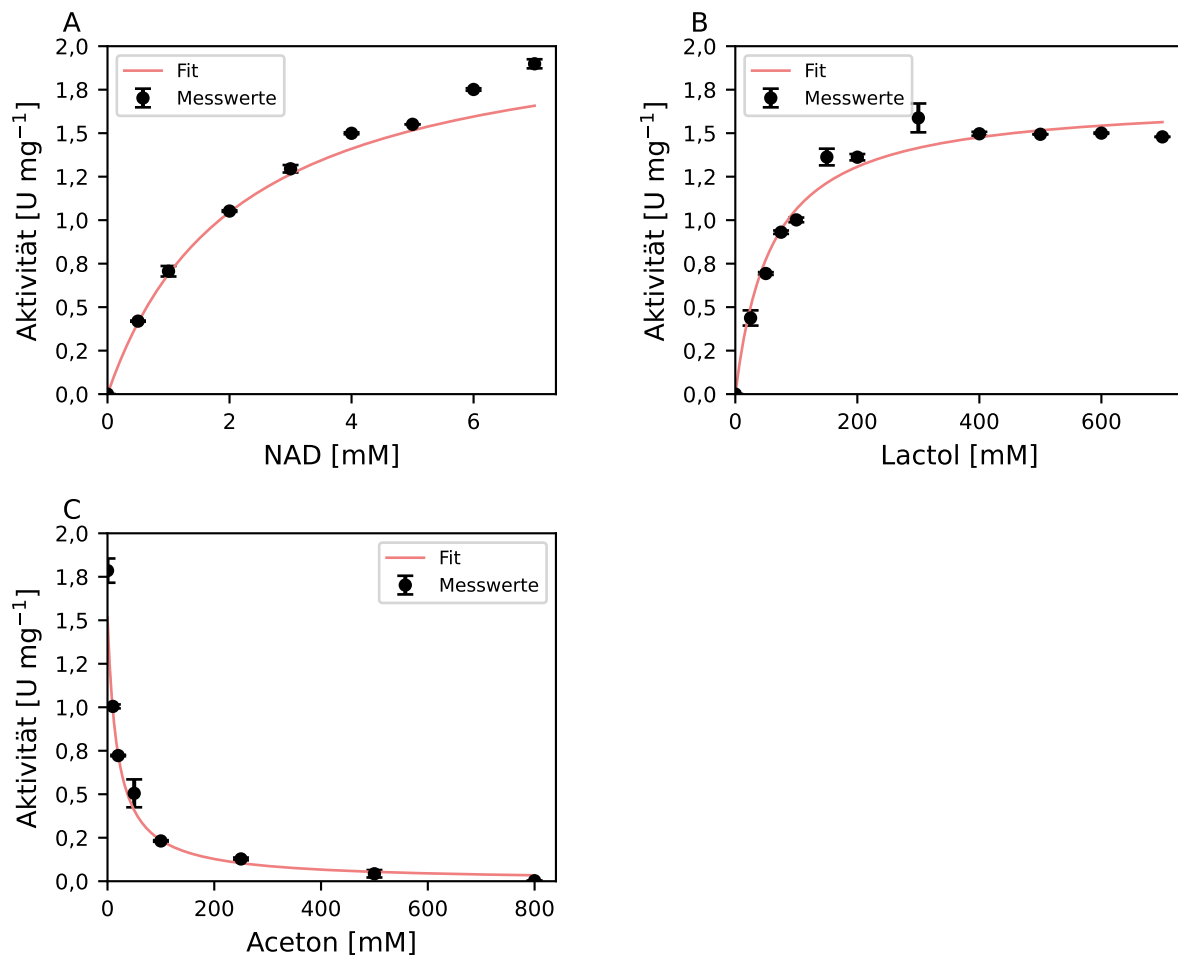


Abbildung A.13: Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_3 mittels globalem Fit mit Aceton-Inhibition.

(A) Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem Lactol (500 mM) und Aceton (0 mM).

(B) Aktivität in Abhängigkeit der Lactol-Konzentration bei konstantem NAD (8 mM) und Aceton (0 mM).

(C) Aktivität in Abhängigkeit der Aceton-Konzentration bei konstantem NAD (8 mM) und Lactol (500 mM).

Die Modellanpassung basiert auf einer erweiterten Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Inhibition durch Aceton. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

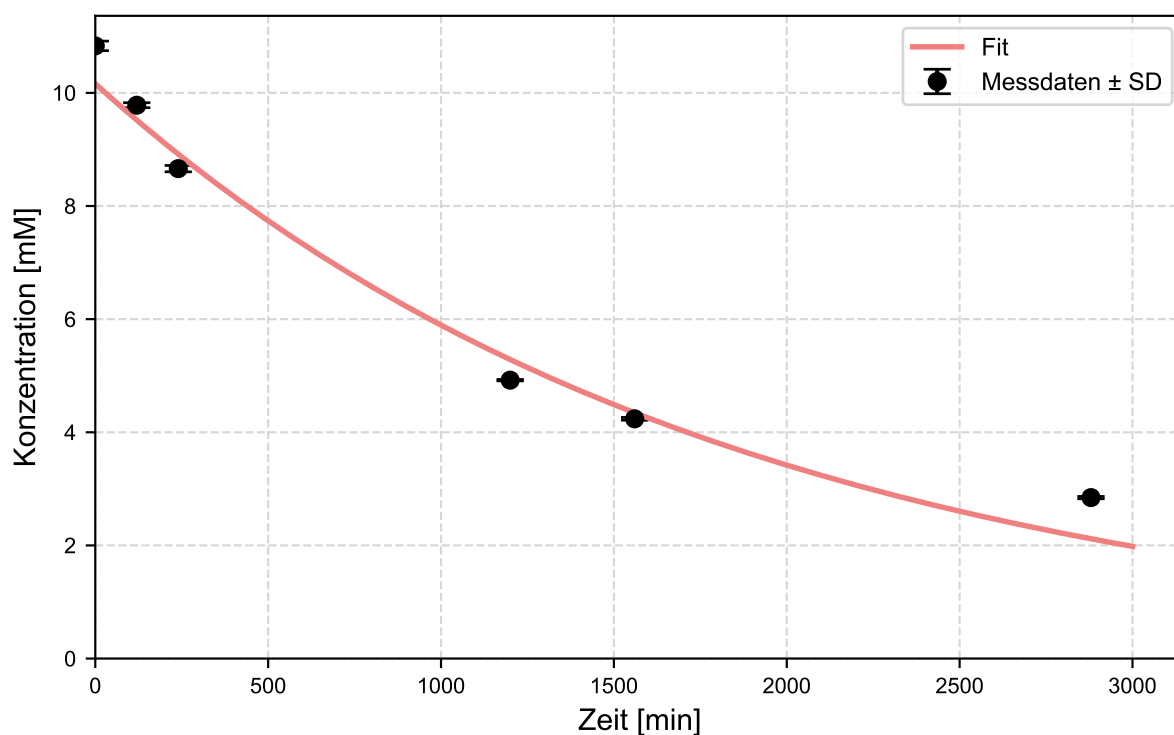


Abbildung A.14: Zeitlicher Zerfall von δ -Valerolacton unter Reaktionsbedingungen.

Dargestellt ist der Zerfall von δ -Valerolacton (dVL) bei 30 °C unter Reaktionsbedingungen. Die roten Linien zeigen einen Fit erster Ordnung. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus Dublikaten an.

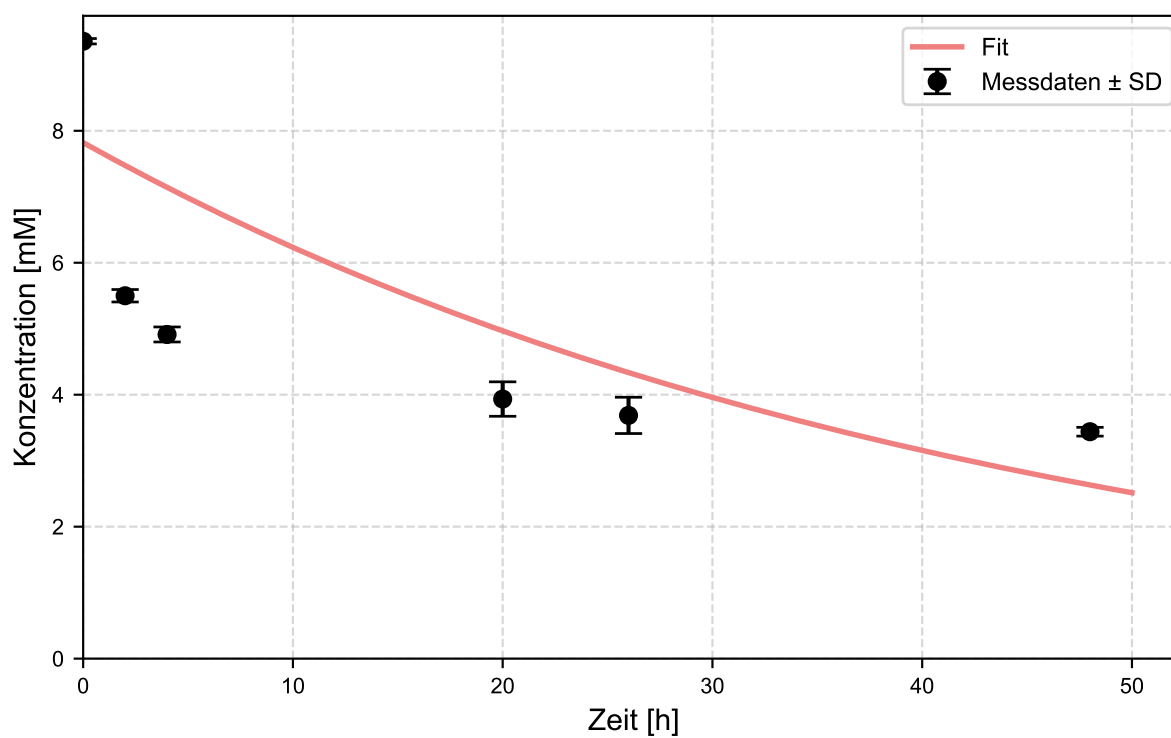


Abbildung A.15: Zeitlicher Zerfall von δ -Valerolacton in GlycinNaOH-Puffer.

Dargestellt ist der Zerfall von δ -Valerolacton bei 30°C in GlycinNaOH-Puffer. Die roten Linien zeigen einen Fit erster Ordnung. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus Dublikaten an.

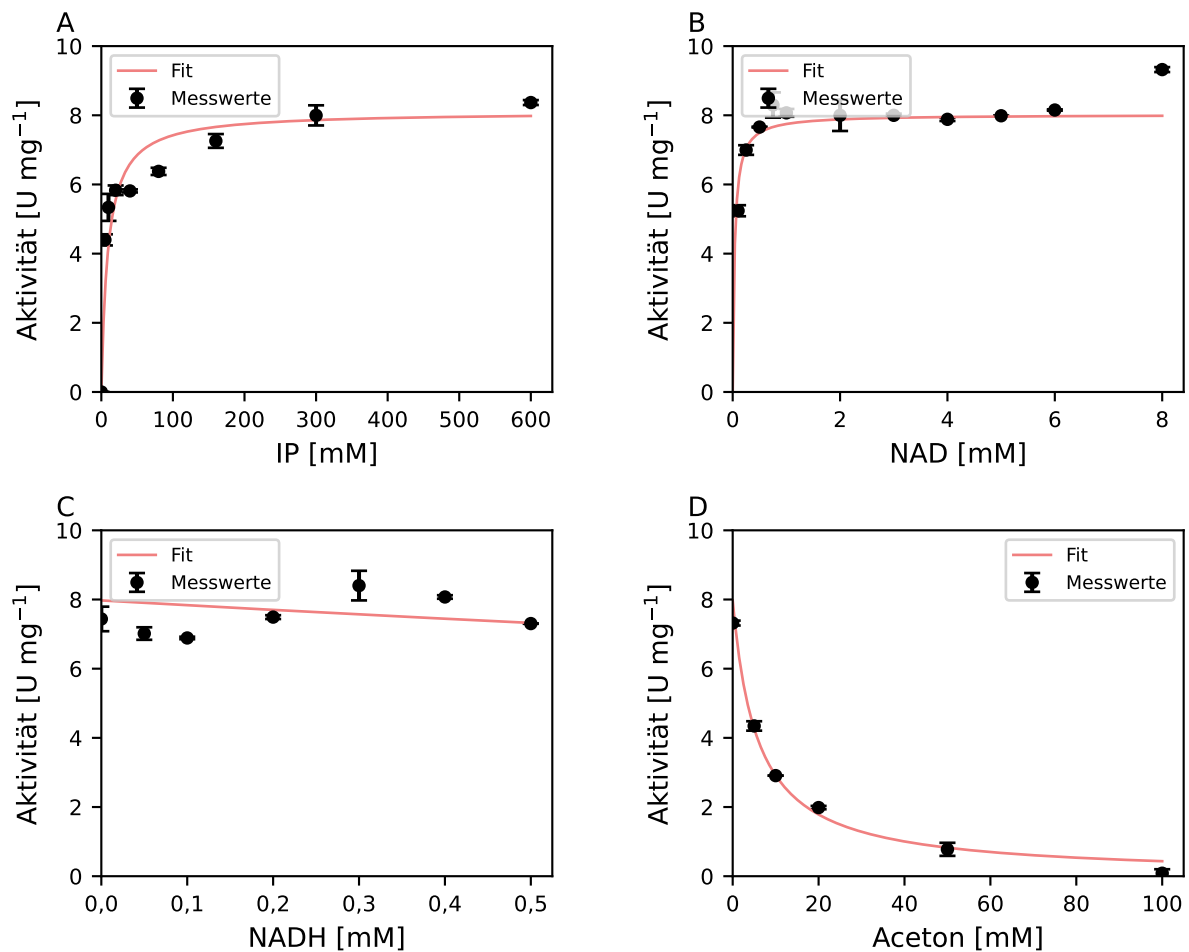


Abbildung A.16: Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_5 mittels globalem Fit.

(A) Aktivität in Abhängigkeit der IP-Konzentration bei konstantem NAD (2 mM), NADH (0 mM) und Aceton (0 mM).

(B) Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem IP (600 mM), NADH (0 mM) und Aceton (0 mM).

(C) Aktivität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration bei konstantem NAD (2 mM), IP (600 mM) und Aceton (0 mM).

(D) Aktivität in Abhängigkeit der Aceton-Konzentration bei konstantem NAD (2 mM), IP (600 mM) und NADH (0 mM).

Die Modellanpassung basiert auf einer erweiterten Michaelis-Menten-Kinetik mit Inhibierung durch NADH und Aceton. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

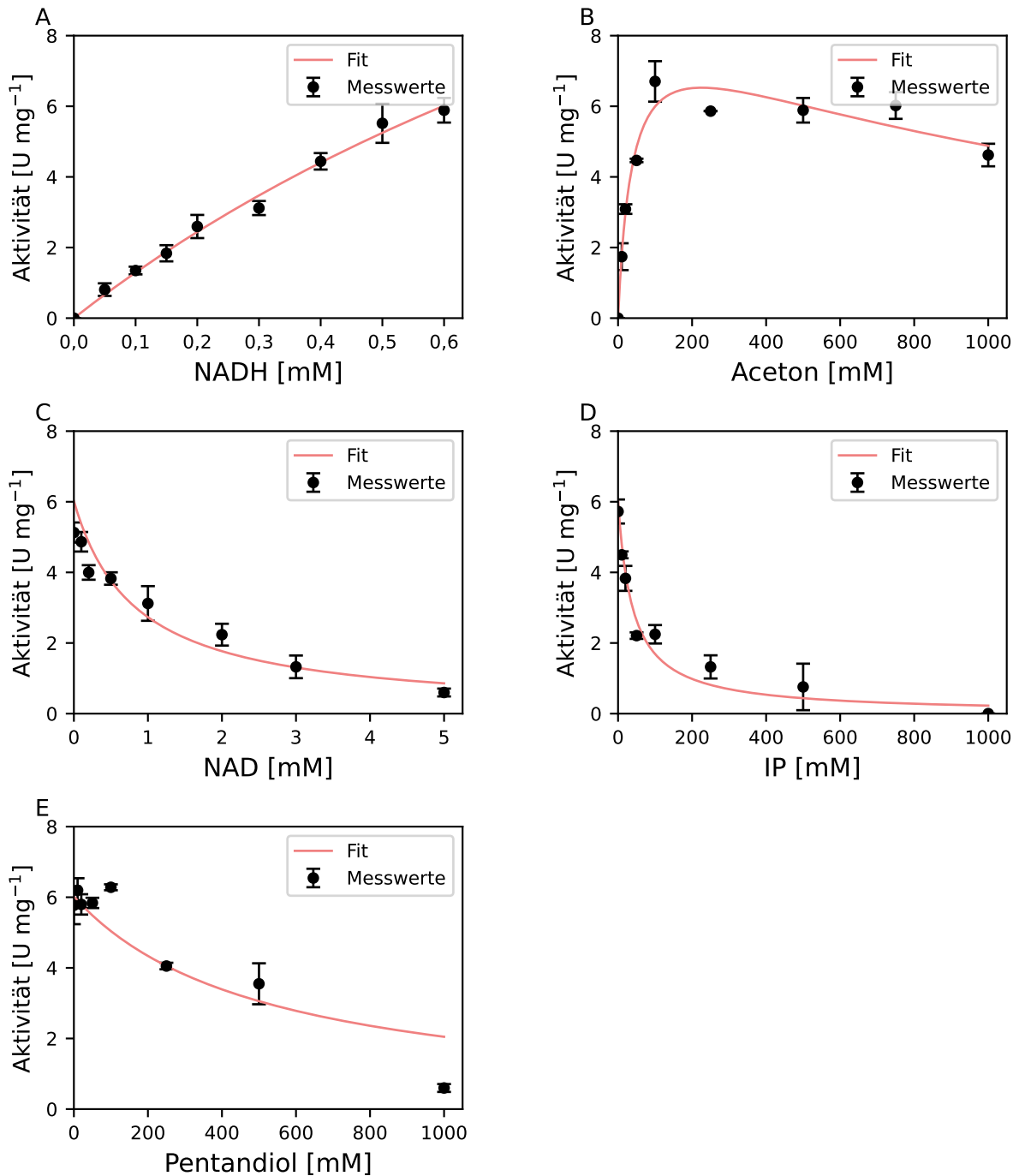


Abbildung A.17: Parameterbestimmung der Reaktionsrate r_6 mittels iterativem Fitmodell.

(A) Aktivität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration bei konstantem Aceton (500 mM), NAD, IP und 1,5-Pentandiol (PD) = 0 mM.

(B) Aktivität in Abhängigkeit der Aceton-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), NAD, IP und PD = 0 mM.

(C) Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), Aceton (500 mM), IP und PD = 0 mM.

(D) Aktivität in Abhängigkeit der IP-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), Aceton (500 mM), NAD und PD = 0 mM.

(E) Aktivität in Abhängigkeit der Pentandiol-Konzentration bei konstantem NADH (0,6 mM), Aceton (500 mM), NAD und IP = 0 mM.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) sowie Modellanpassungen gemäß der erweiterten Kinetik. Die Parameter wurden iterativ bestimmt; Konvergenz wurde nach **129 Iterationen** erreicht.

Programmcode A.1: Python-Skript zur Parameterbestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik mit globalem Fit

```

1 import numpy as np
2 import matplotlib.pyplot as plt
3 from scipy.optimize import least_squares
4 from matplotlib.gridspec import GridSpec
5 import matplotlib.ticker as ticker
6
7 # Erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung
8 def inhibited_kinetics(NAD, PD, NADH, Aceton, Vmax, KmNAD, KmPD, KiNADH, KiAceton):
9     numerator = Vmax * NAD * PD
10    denominator = (NAD + KmNAD * (1 + NADH / KiNADH)) * (PD + KmPD * (1 + Aceton /
11        KiAceton))
12    return numerator / denominator
13
14 # Messdaten
15 # NAD-Reihe
16 NAD_vals = np.array([0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7])
17 v_NAD_vals = np.array([0, 0.02241474, 0.03314665, 0.03921448, 0.0440144, 0.05035392,
18    0.05171239, 0.05184824])
19 std_NAD_vals = np.array([0, 0.00049811, 0.00135847, 0.00045282, 0.00199242, 0.00027169,
20    0.00072452, 0.00149432])
21 PD_NAD = np.full_like(NAD_vals, 500)
22 NADH_NAD = np.zeros_like(NAD_vals)
23 Aceton_NAD = np.zeros_like(NAD_vals)
24
25 # PD-Reihe
26 PD_vals = np.array([0, 25, 50, 75, 100, 200, 350, 500, 650])
27 v_PD_vals = np.array([0, 0.01385639, 0.01983365, 0.022777, 0.02775805, 0.03527492,
28    0.04111633, 0.05035392, 0.041705])
29 std_PD_vals = np.array([0, 0.00217355, 0.00099621, 0.00040754, 0.00185658, 0.00122262,
30    0.0012679, 0.00027169, 0.00040754])
31 NAD_PD = np.full_like(PD_vals, 5)
32 NADH_PD = np.zeros_like(PD_vals)
33 Aceton_PD = np.zeros_like(PD_vals)
34
35 # NADH-Reihe
36 NADH_vals = np.array([0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7])
37 v_NADH_vals = np.array([0.04199993, 0.04513963, 0.04215434, 0.04091905, 0.03834552,
38    0.03813964, 0.03880876, 0.04061022, 0.03536023, 0.03819111, 0.03958081])
39 std_NADH_vals = np.array([0.00123529, 0.0013897, 0.00036029, 0.00036029, 0.00180145,
40    0.00159559, 0.0022647, 0.00046323, 0.0013897, 0.00308823, 0.00036029])
41 NAD_NADH = np.full_like(NADH_vals, 5)
42 PD_NADH = np.full_like(NADH_vals, 500)
43 Aceton_NADH = np.zeros_like(NADH_vals)
44
45 # Aceton-Reihe
46 Aceton_vals = np.array([0, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000])
47 v_Aceton_vals = np.array([0.06164499, 0.02099625, 0.01200986, 0.00743267, 0.00184767,
48    0.00104981, 0.00088184, 0.00121778])
49 std_Aceton_vals = np.array([0.00235158, 0.00092384, 0.00016797, 0.00088184, 0.0005879,
50    0.00020996, 0.00012598, 4.1993e-05])
51 NAD_Aceton = np.full_like(Aceton_vals, 5)
52 PD_Aceton = np.full_like(Aceton_vals, 500)
53 NADH_Aceton = np.zeros_like(Aceton_vals)
54
55 # Kombinieren

```

```

47 NAD_all = np.concatenate([NAD_vals, NAD_PD, NAD_NADH, NAD_Aceton])
48 PD_all = np.concatenate([PD_NAD, PD_vals, PD_NADH, PD_Aceton])
49 NADH_all = np.concatenate([NADH_NAD, NADH_PD, NADH_vals, NADH_Aceton])
50 Aceton_all = np.concatenate([Aceton_NAD, Aceton_PD, Aceton_NADH, Aceton_vals])
51 v_all = np.concatenate([v_NAD_vals, v_PD_vals, v_NADH_vals, v_Aceton_vals])
52 std_all = np.concatenate([std_NAD_vals, std_PD_vals, std_NADH_vals, std_Aceton_vals])
53 std_all[std_all == 0] = 1e-6 # Division durch 0 vermeiden
54
55 # Fehlerfunktion
56 def residuals(params, NAD, PD, NADH, Aceton, v_obs, std):
57     Vmax, KmNAD, KmPD, KiNADH, KiAceton = params
58     v_pred = inhibited_kinetics(NAD, PD, NADH, Aceton, Vmax, KmNAD, KmPD, KiNADH,
59                                KiAceton)
60     return (v_pred - v_obs) / np.sqrt(std)
61
62 # Startwerte & Fit
63 initial_guess = [0.06, 1, 100, 0.1, 10]
64 bounds = ([0, 0, 0, 0, 0], [1, 100, 1000, 100, 10000])
65 result = least_squares(residuals, initial_guess, bounds=bounds,
66                        args=(NAD_all, PD_all, NADH_all, Aceton_all, v_all, std_all))
67 Vmax_fit, KmNAD_fit, KmPD_fit, KiNADH_fit, KiAceton_fit = result.x
68
69 # Fit-Ergebnisse mit Unsicherheit
70 def calculate_std_errors(result):
71     J = result.jac
72     residuals = result.fun
73     n, p = len(residuals), len(result.x)
74     sigma2 = np.sum(residuals**2) / (n - p)
75     cov = np.linalg.inv(J.T @ J) * sigma2
76     return np.sqrt(np.diag(cov))
77
78 std_errors = calculate_std_errors(result)
79
80 # Ergebnisse drucken
81 param_names = ["Vmax", "KmNAD", "KmPD", "KiNADH", "KiAceton"]
82 for name, val, err in zip(param_names, result.x, std_errors):
83     print(f"{name}: {val:.6f} ± {err:.6f}")
84
85 # Gemeinsamer 2x2-Plot
86 fig = plt.figure(figsize=(6.3, 5))
87 gs = GridSpec(2, 2, wspace=0.4, hspace=0.4)
88
89 # Subplot A: NAD
90 axA = fig.add_subplot(gs[0, 0])
91 x_fit = np.linspace(0, max(NAD_vals), 200)
92 v_fit = inhibited_kinetics(x_fit, 500, 0, 0, Vmax_fit, KmNAD_fit, KmPD_fit, KiNADH_fit,
93                            KiAceton_fit)
94 axA.errorbar(NAD_vals, v_NAD_vals, yerr=std_NAD_vals, fmt='o', capsize=2, markersize=4,
95              color='black')
96 axA.plot(x_fit, v_fit, '-', color='lightcoral')
97 axA.set_xlabel("NAD [mM]")
98 axA.set_ylabel("Aktivität [U mg-1 s-1]")
99 axA.set_ylim(0, 0.08)
100 axA.set_xlim(left=0)
101 axA.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.2f}".replace(".",
102 " ")))

```



```

100 axA.tick_params(labelsize=8)
101 axA.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper left')
102 axA.text(-0.1, 1.1, "A", transform=axA.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
103
104 # Subplot B: PD
105 axB = fig.add_subplot(gs[0, 1])
106 x_fit = np.linspace(0, max(PD_vals), 200)
107 v_fit = inhibited_kinetics(5, x_fit, 0, 0, Vmax_fit, KmNAD_fit, KmPD_fit, KiNADH_fit,
    KiAceton_fit)
108 axB.errorbar(PD_vals, v_PD_vals, yerr=std_PD_vals, fmt='o', capsize=2, markersize=4,
    color='black')
109 axB.plot(x_fit, v_fit, '-', color='lightcoral')
110 axB.set_xlabel("Pentandiol [mM]")
111 axB.set_ylabel("Aktivität [U mg$^{-1}$]")
112 axB.set_ylim(0, 0.08)
113 axB.set_xlim(left=0)
114 axB.tick_params(labelsize=8)
115 axB.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.2f}".replace(".",
    ",")))
116 axB.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper left')
117 axB.text(-0.1, 1.1, "B", transform=axB.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
118
119 # Subplot C: NADH
120 axC = fig.add_subplot(gs[1, 0])
121 x_fit = np.linspace(0, max(NADH_vals), 200)
122 v_fit = inhibited_kinetics(5, 500, x_fit, 0, Vmax_fit, KmNAD_fit, KmPD_fit, KiNADH_fit,
    KiAceton_fit)
123 axC.errorbar(NADH_vals, v_NADH_vals, yerr=std_NADH_vals, fmt='o', capsize=2,
    markersize=4, color='black')
124 axC.plot(x_fit, v_fit, '-', color='lightcoral')
125 axC.set_xlabel("NADH [mM]")
126 axC.set_ylabel("Aktivität [U mg$^{-1}$]")
127 axC.set_ylim(0, 0.08)
128 axC.set_xlim(left=0)
129 axC.tick_params(labelsize=8)
130 axC.xaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.1g}".replace(".",
    ",")))
131 axC.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.2f}".replace(".",
    ",")))
132 axC.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper left')
133 axC.text(-0.1, 1.1, "C", transform=axC.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
134
135 # Subplot D: Aceton
136 axD = fig.add_subplot(gs[1, 1])
137 x_fit = np.linspace(0, max(Aceton_vals), 200)
138 v_fit = inhibited_kinetics(5, 500, 0, x_fit, Vmax_fit, KmNAD_fit, KmPD_fit, KiNADH_fit,
    KiAceton_fit)
139 axD.errorbar(Aceton_vals, v_Aceton_vals, yerr=std_Aceton_vals, fmt='o', capsize=2,
    markersize=4, color='black')
140 axD.plot(x_fit, v_fit, '-', color='lightcoral')
141 axD.set_xlabel("Aceton [mM]")
142 axD.set_ylabel("Aktivität [U mg$^{-1}$]")
143 axD.set_ylim(0, 0.08)
144 axD.set_xlim(left=0)
145 axD.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.2f}".replace(".",
    ",")))
146 axD.tick_params(labelsize=8)

```

```

147 axD.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper right')
148 axD.text(-0.1, 1.1, "D", transform=axD.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
149 plt.show()

```

Programmcode A.2: Python-Skript zur Parameterbestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik mit iterativem Fit

```

1
2 import numpy as np
3 import matplotlib.pyplot as plt
4 from scipy.optimize import curve_fit
5 from matplotlib.gridspec import GridSpec
6 import matplotlib.ticker as ticker
7
8
9 # Kinetische Gleichung
10 def inhibited_kinetics(NADH, Lactol, IP, PD, Vmax, KmNADH, KmLactol, KiIP, KiPD):
11     numerator = Vmax * NADH * Lactol
12     denominator = (NADH + KmNADH) * (Lactol + KmLactol * (1 + IP / KiIP) * (1 + PD /
13         KiPD))
14     return numerator / denominator
15
16 # Daten
17 # IP-Variation
18 IP_vals = np.array([0, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000])
19 v_IP_vals = np.array([0.5436, 0.4608, 0.3146, 0.1540, 0.0674, 0.0444, 0.0254, 0.0226])
20 std_IP_vals = np.array([0.0321, 0.0391, 0.0301, 0.0346, 0.0199, 0.0037, 0.0004,
21     0.0018])
22 NADH_const, Lactol_const, PD_const = 0.6, 300, 0
23
24 # Lactol-Variation
25 Lactol_vals = np.array([0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500])
26 v_Lactol_vals = np.array([0, 0.1574, 0.2871, 0.3180, 0.4002, 0.4328, 0.4435, 0.4661])
27 std_Lactol_vals = np.array([0.000001, 0.0321, 0.0012, 0.0233, 0.0021, 0.0333, 0.0058,
28     0.0186])
29 NADH_const2, IP_const, PD_const2 = 0.6, 0, 0
30
31 # NADH-Variation
32 NADH_vals = np.array([0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6])
33 v_NADH_vals = np.array([0, 0.0179, 0.0785, 0.1111, 0.1725, 0.2372, 0.3327, 0.3280,
34     0.4391])
35 std_NADH_vals = np.array([0.000001, 0.0072, 0.0100, 0.0030, 0.0156, 0.0291, 0.0165,
36     0.0165, 0.0345])
37 Lactol_const3, IP_const3, PD_const3 = 300, 0, 0
38
39 # PD-Variation
40 PD_vals = np.array([0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500])
41 v_PD_vals = np.array([0.5406, 0.4472, 0.4626, 0.3446, 0.4114, 0.3532, 0.2649, 0.2682])
42 std_PD_vals = np.array([0.0196, 0.0179, 0.0161, 0.0019, 0.0142, 0.0095, 0.0037,
43     0.0047])
44 NADH_const4, Lactol_const4, IP_const4 = 0.6, 300, 0
45
46 # Initialwerte & Einstellungen
47 Vmax_iter, KmNADH_iter, KmLactol_iter, KiIP_iter, KiPD_iter = 0.6, 0.1, 100, 50, 50
48 tolerance, max_iterations = 1e-6, 100
49 prev_params = np.array([Vmax_iter, KmNADH_iter, KmLactol_iter, KiIP_iter, KiPD_iter])
50
51 # Iterativer Fit

```

```

46 for iteration in range(max_iterations):
47     def fit_Vmax_KmNADH(NADH, Vmax, KmNADH):
48         return inhibited_kinetics(NADH, Lactol_const3, IP_const3, PD_const3, Vmax,
49                                   KmNADH, KmLactol_iter, KiIP_iter, KiPD_iter)
49     popt, _ = curve_fit(fit_Vmax_KmNADH, NADH_vals, v_NADH_vals, p0=[Vmax_iter,
50                               KmNADH_iter], bounds=(0, np.inf))
51     Vmax_iter, KmNADH_iter = popt
52
53     def fit_KmLactol(Lactol, KmLactol):
54         return inhibited_kinetics(NADH_const2, Lactol, IP_const, PD_const2, Vmax_iter,
55                                   KmNADH_iter, KmLactol, KiIP_iter, KiPD_iter)
56     popt, _ = curve_fit(fit_KmLactol, Lactol_vals, v_Lactol_vals, p0=[KmLactol_iter],
57                               bounds=(0, np.inf))
58     KmLactol_iter = popt[0]
59
60     def fit_KiIP(IP, KiIP):
61         return inhibited_kinetics(NADH_const, Lactol_const, IP, PD_const, Vmax_iter,
62                                   KmNADH_iter, KmLactol_iter, KiIP, KiPD_iter)
63     popt, _ = curve_fit(fit_KiIP, IP_vals, v_IP_vals, p0=[KiIP_iter], bounds=(0, np.inf
64                               ))
65     KiIP_iter = popt[0]
66
67     def fit_KiPD(PD, KiPD):
68         return inhibited_kinetics(NADH_const4, Lactol_const4, IP_const4, PD, Vmax_iter,
69                                   KmNADH_iter, KmLactol_iter, KiIP_iter, KiPD)
70     popt, _ = curve_fit(fit_KiPD, PD_vals, v_PD_vals, p0=[KiPD_iter], bounds=(0, np.inf
71                               ))
72     KiPD_iter = popt[0]
73
74     new_params = np.array([Vmax_iter, KmNADH_iter, KmLactol_iter, KiIP_iter, KiPD_iter
75                               ])
76     if np.all(np.abs(new_params - prev_params) < tolerance):
77         break
78     prev_params = new_params
79
80 # Fehlerabschätzung
81 def calculate_std(fit_func, x_vals, y_vals, p0):
82     popt, pcov = curve_fit(fit_func, x_vals, y_vals, p0=p0, bounds=(0, np.inf))
83     return np.sqrt(np.diag(pcov)) if len(popt) > 1 else np.sqrt(pcov[0, 0])
84
85 Vmax_std, KmNADH_std = calculate_std(fit_Vmax_KmNADH, NADH_vals, v_NADH_vals, [
86     Vmax_iter, KmNADH_iter])
87 KmLactol_std = calculate_std(fit_KmLactol, Lactol_vals, v_Lactol_vals, [KmLactol_iter
88     ])
89 KiIP_std = calculate_std(fit_KiIP, IP_vals, v_IP_vals, [KiIP_iter])
90 KiPD_std = calculate_std(fit_KiPD, PD_vals, v_PD_vals, [KiPD_iter])
91
92 # Ausgabe der Parameter
93 params_std = {
94     "Vmax": (Vmax_iter, Vmax_std[0] if isinstance(Vmax_std, np.ndarray) else Vmax_std),
95     "KmNADH": (KmNADH_iter, KmNADH_std[0] if isinstance(KmNADH_std, np.ndarray) else
96               KmNADH_std),
97     "KmLactol": (KmLactol_iter, KmLactol_std),
98     "KiIP": (KiIP_iter, KiIP_std),
99     "KiPD": (KiPD_iter, KiPD_std),
100 }

```

```

91 print("\n".join([f"{key}: {val[0]:.6f} ± {val[1]:.6f}" for key, val in params_std.
92     items()])))
93
94 # Gemeinsamer 2x2-Plot
95 fig = plt.figure(figsize=(6.3, 5.3))
96 gs = GridSpec(2, 2, wspace=0.4, hspace=0.4)
97
98 # Subplot A: NADH
99 axA = fig.add_subplot(gs[0, 0])
100 x_fit = np.linspace(0, max(NADH_vals), 200)
101 axA.errorbar(NADH_vals, v_NADH_vals, yerr=std_NADH_vals, fmt='o', color='black',
102     capsize=3, markersize=4)
103 axA.plot(x_fit, fit_Vmax_KmNADH(x_fit, Vmax_iter, KmNADH_iter), '-', color='lightcoral')
104 axA.set_xlabel("NADH [mM]")
105 axA.set_ylabel("Aktivität [U mg-1 s-1]")
106 axA.set_xlim(left=0)
107 axA.set_ylim(0, 0.8)
108 axA.xaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.1g}".replace(".",
109     ", ")))
109 axA.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.1f}".replace(".",
110     ", ")))
111 axA.tick_params(labelsize=8)
112 axA.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper left')
113 axA.text(-0.1, 1.1, "A", transform=axA.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
114
115 # Subplot B: Lactol
116 axB = fig.add_subplot(gs[0, 1])
117 x_fit = np.linspace(0, max(Lactol_vals), 200)
118 axB.errorbar(Lactol_vals, v_Lactol_vals, yerr=std_Lactol_vals, fmt='o', color='black',
119     capsize=3, markersize=4)
120 axB.plot(x_fit, fit_KmLactol(x_fit, KmLactol_iter), '-', color='lightcoral')
121 axB.set_xlabel("Lactol [mM]")
122 axB.set_ylabel("Aktivität [U mg-1 s-1]")
123 axB.set_xlim(left=0)
124 axB.set_ylim(0, 0.8)
125 axB.tick_params(labelsize=8)
126 axB.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.1f}".replace(".",
127     ", ")))
128 axB.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper left')
129 axB.text(-0.1, 1.1, "B", transform=axB.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
130
131 # Subplot C: IP
132 axC = fig.add_subplot(gs[1, 0])
133 x_fit = np.linspace(0, max(IP_vals), 200)
134 axC.errorbar(IP_vals, v_IP_vals, yerr=std_IP_vals, fmt='o', color='black', capsize=3,
135     markersize=4)
136 axC.plot(x_fit, fit_KiIP(x_fit, KiIP_iter), '-', color='lightcoral')
137 axC.set_xlabel("IP [mM]")
138 axC.set_ylabel("Aktivität [U mg-1 s-1]")
139 axC.set_xlim(left=0)
140 axC.set_ylim(0, 0.8)
141 axC.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.1f}".replace(".",
142     ", ")))
143 axC.tick_params(labelsize=8)
144 axC.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper right')

```

```

139 axC.text(-0.1, 1.1, "C", transform=axC.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
140
141 # Subplot D: PD
142 axD = fig.add_subplot(gs[1, 1])
143 x_fit = np.linspace(0, max(PD_vals), 200)
144 axD.errorbar(PD_vals, v_PD_vals, yerr=std_PD_vals, fmt='o', color='black', capsize=3,
145             markersize=4)
146 axD.plot(x_fit, fit_KiPD(x_fit, KiPD_iter), '-', color='lightcoral')
147 axD.set_xlabel("Pentandiol [mM]")
148 axD.set_ylabel("Aktivität [U mg-1 s-1]")
149 axD.set_xlim(left=0)
150 axD.set_ylim(0, 0.8)
151 axD.tick_params(labelsize=8)
152 axD.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.1f}".replace(".",
153             ",")))
154 axD.legend(["Fit", "Messwerte"], fontsize=7, loc='upper right')
155 axD.text(-0.1, 1.1, "D", transform=axD.transAxes, fontsize=10, va='top', ha='left')
156
157 plt.show()

```

Programmcode A.3: Python-Skript zur Simulation des Konzentration-Zeit Verlaufs.

```

1
2 import numpy as np
3 import matplotlib.pyplot as plt
4 import matplotlib.ticker as ticker
5 from scipy.integrate import solve_ivp
6
7 # Enzymkonzentration in mg/L
8 enzyme_conc = 1
9
10 # Parameterwerte mit Mittelwert und Standardabweichung
11 params_mean_std = {
12     # r1
13     "vmax1": (0.075684, 0.007885),
14     "Km_NAD1": (1.877605, 0.533239),
15     "Km_PD": (96.913426, 20.236880),
16     "Ki_NADH1": (0.777100, 0.266498),
17     "Ki_Aceton1": (1.204716, 0.281929),
18
19     # r2
20     "vmax2": (3.538511, 2.557920),
21     "Km_Lactol2": (125.631385, 6.436436),
22     "Km_NADH2": (2.901807, 2.426632),
23     "Ki_PD2": (315.878024, 115.470856),
24     "Ki_IP2": (12.224671, 4.414105),
25
26     # r3
27     "vmax3": (2.421196, 0.140857),
28     "Km_Lactol3": (59.586678, 9.323135),
29     "Km_NAD3": (2.134585, 0.379872),
30     "Ki_Aceton3": (1.953785, 0.370287),
31
32     # r4
33     "vmax4": (8.142314, 0.120318),
34     "Km_IP4": (9.146475, 2.175386),
35     "Km_NAD4": (0.035089, 0.013489),
36     "Ki_Aceton4": (0.086478, 0.020412),

```

```

37     "Ki_NADH4": (0.032731, 0.014394),
38
39     # r5
40     "vmax5": (32.5695, 8.4862),
41     "Km_Aceton5": (38.3559, 5.0602),
42     "Km_NADH5": (1.6346, 0.5408),
43     "Ki_Aceton5": (1327.3401, 190.8918),
44     "Ki_IP5": (2.0587, 0.3057),
45     "Ki_PD5": (27.2441, 8.0535),
46     "Ki_NAD5": (0.6081, 0.1167)
47 }
48
49 # Anfangskonzentrationen [PD, NAD, Lactol, NADH, Lacton, Aceton, IP]
50 y0 = [100, 10, 0.0, 0.0, 0.0, 0, 0.0]
51
52 # Zeitbereich und Abtastung
53 t_span = (0, 3000)
54 t_eval = np.linspace(*t_span, 200)
55
56 # Anzahl der Simulationen
57 n_sim = 10000
58
59 # Ergebnisse vorbereiten
60 concentration_results = [[] for _ in range(7)]
61 rate_results = [[] for _ in range(5)]
62
63 # Parameter-Sampling
64 def draw_parameter_set():
65     return [
66         max(1e-6, np.random.normal(params_mean_std[key][0], params_mean_std[key][1])) *
67             (enzyme_conc if "vmax" in key else 1)
68         for key in params_mean_std
69     ]
70
71 # Reaktionsraten
72 def reaction_rates(y, p):
73     c_PD, c_NAD, c_Lactol, c_NADH, c_Lacton, c_Aceton, c_IP = [max(1e-6, val) for val
74         in y]
75     (vmax1, Km_NAD1, Km_PD, Ki_NADH1, Ki_Aceton1,
76      vmax2, Km_Lactol2, Km_NADH2, Ki_PD2, Ki_IP2,
77      vmax3, Km_Lactol3, Km_NAD3, Ki_Aceton3,
78      vmax4, Km_IP4, Km_NAD4, Ki_Aceton4, Ki_NADH4,
79      vmax5, Km_Aceton5, Km_NADH5, Ki_Aceton5, Ki_IP5, Ki_PD5, Ki_NAD5) = p
80
81     r1 = (vmax1 * c_PD * c_NAD) / ((c_PD + Km_PD * (1 + c_Aceton / Ki_Aceton1)) * (
82         c_NAD + Km_NAD1 * (1 + c_NADH / Ki_NADH1)))
83     r2 = (vmax2 * c_Lactol * c_NADH) / ((c_Lactol + Km_Lactol2 * (1 + c_PD / Ki_PD2) *
84         (1 + c_IP / Ki_IP2)) * (c_NADH + Km_NADH2))
85     r3 = (vmax3 * c_Lactol * c_NAD) / ((c_Lactol + Km_Lactol3 * (1 + c_Lacton /
86         Ki_Aceton3)) * (c_NAD + Km_NAD3))
87     r4 = (vmax4 * c_IP * c_NAD) / ((c_IP + Km_IP4 * (1 + c_Aceton / Ki_Aceton4)) * (
88         c_NAD + Km_NAD4 * (1 + c_NADH / Ki_NADH4)))
89     r5 = (vmax5 * c_Aceton * c_NADH) / (((c_Aceton + (c_Aceton**2 / Ki_Aceton5)) +
90         Km_Aceton5 * (1 + c_IP / Ki_IP5) * (1 + c_PD / Ki_PD5)) * (c_NADH + Km_NADH5 *
91         (1 + c_NAD / Ki_NAD5)))
92
93     return [r1, r2, r3, r4, r5]

```

```

86
87 # DGL-System
88 def ode_system(t, y, p):
89     r1, r2, r3, r4, r5 = reaction_rates(y, p)
90     dc_PD = -r1 + r2
91     dc_NAD = -r1 + r2 - r3 + r5 - r4
92     dc_Lactol = r1 - r2 - r3
93     dc_NADH = r1 - r2 + r3 - r5 + r4
94     dc_Lacton = r3
95     dc_Aceton = -r5 + r4
96     dc_IP = -r4 + r5
97     return [dc_PD, dc_NAD, dc_Lactol, dc_NADH, dc_Lacton, dc_Aceton, dc_IP]
98
99 # Simulationen
100 for _ in range(n_sim):
101     p = draw_parameter_set()
102     sol = solve_ivp(lambda t, y: ode_system(t, y, p), t_span, y0, t_eval=t_eval, method
103                     = 'LSODA')
104
105     for i in range(7):
106         concentration_results[i].append(sol.y[i])
107
108     rates_over_time = [[] for _ in range(5)]
109     for j in range(len(sol.t)):
110         r_vals = reaction_rates([sol.y[i][j] for i in range(7)], p)
111         for k in range(5):
112             rates_over_time[k].append(r_vals[k])
113     for k in range(5):
114         rate_results[k].append(rates_over_time[k])
115
116 # Konfidenzintervalle berechnen
117 def mean_and_ci(data):
118     return np.mean(data, axis=0), np.percentile(data, 2.5, axis=0), np.percentile(data,
119                                         97.5, axis=0)
120
121 c_PD_mean, c_PD_lower, c_PD_upper = mean_and_ci(concentration_results[0])
122 c_NAD_mean, c_NAD_lower, c_NAD_upper = mean_and_ci(concentration_results[1])
123 c_Lactol_mean, c_Lactol_lower, c_Lactol_upper = mean_and_ci(concentration_results[2])
124 c_NADH_mean, c_NADH_lower, c_NADH_upper = mean_and_ci(concentration_results[3])
125 c_Lacton_mean, c_Lacton_lower, c_Lacton_upper = mean_and_ci(concentration_results[4])
126 c_Aceton_mean, c_Aceton_lower, c_Aceton_upper = mean_and_ci(concentration_results[5])
127 c_IP_mean, c_IP_lower, c_IP_upper = mean_and_ci(concentration_results[6])
128
129 r_means, r_lowers, r_uppers = [], [], []
130 for r in rate_results:
131     r_mean, r_lower, r_upper = mean_and_ci(r)
132     r_means.append(r_mean)
133     r_lowers.append(r_lower)
134     r_uppers.append(r_upper)
135
136 # Plot-Stil
137 def deutsche_ticks(ax):
138     ax.xaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda x, _: f"{x:.0f}".replace(
139         ".", ",")))
140     ax.yaxis.set_major_formatter(ticker.FuncFormatter(lambda y, _: f"{y:.2f}".replace(
141         ".", ",")))

```

```

139 plt.rcParams.update({
140     'axes.titlesize': 14,
141     'axes.labelsize': 12,
142     'xtick.labelsize': 11,
143     'ytick.labelsize': 11,
144     'legend.fontsize': 11,
145     'axes.grid': True,
146     'grid.linestyle': '--',
147     'grid.alpha': 0.5
148 })
149
150 # Konzentrationen
151 fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
152 ax.plot(t_eval, c_NAD_mean, label=r"$c_{\text{NAD}}$", color="red")
153 ax.fill_between(t_eval, c_NAD_lower, c_NAD_upper, color="red", alpha=0.3)
154 ax.plot(t_eval, c_Lactol_mean, label=r"$c_{\text{Lactol}}$", color="green")
155 ax.fill_between(t_eval, c_Lactol_lower, c_Lactol_upper, color="green", alpha=0.3)
156 ax.plot(t_eval, c_NADH_mean, label=r"$c_{\text{NADH}}$", color="purple")
157 ax.fill_between(t_eval, c_NADH_lower, c_NADH_upper, color="purple", alpha=0.3)
158 ax.plot(t_eval, c_Lacton_mean, label=r"$c_{\text{Lacton}}$", color="orange")
159 ax.fill_between(t_eval, c_Lacton_lower, c_Lacton_upper, color="orange", alpha=0.3)
160 ax.plot(t_eval, c_Aceton_mean, label=r"$c_{\text{Aceton}}$", color="brown")
161 ax.fill_between(t_eval, c_Aceton_lower, c_Aceton_upper, color="brown", alpha=0.3)
162 ax.plot(t_eval, c_IP_mean, label=r"$c_{\text{IP}}$", color="gray")
163 ax.fill_between(t_eval, c_IP_lower, c_IP_upper, color="gray", alpha=0.3)
164 ax.set_xlabel("Zeit [min]")
165 ax.set_ylabel("Konzentration [mM]")
166 ax.set_xlim(0, t_eval[-1])
167 ax.set_ylim(0, max(np.max(c_NAD_upper), np.max(c_Lactol_upper), np.max(c_NADH_upper),
168     np.max(c_Lacton_upper), np.max(c_Aceton_upper), np.max(c_IP_upper)) * 1.1)
169 ax.legend(loc='upper right', bbox_to_anchor=(1, 0.75))
170 deutsche_ticks(ax)
171 plt.show()
172
173 # Reaktionsraten
174 fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
175 labels = [r"$r_1$", r"$r_2$", r"$r_3$", r"$r_4$", r"$r_5$"]
176 colors = ["blue", "red", "green", "orange", "purple"]
177 for i in range(5):
178     ax.plot(t_eval, r_means[i], label=labels[i], color=colors[i])
179     ax.fill_between(t_eval, r_lowers[i], r_uppers[i], color=colors[i], alpha=0.3)
180 ax.set_xlabel("Zeit [min]")
181 ax.set_ylabel("Reaktionsrate [U]")
182 ax.set_xlim(0, t_eval[-1])
183 ax.set_ylim(0, max([np.max(upper) for upper in r_uppers]) * 1.1)
184 ax.legend(loc='upper right', bbox_to_anchor=(1, 0.75))
185 ax.yaxis.set_major_formatter(ticker.StrMethodFormatter("{x:.3f}"))
186 deutsche_ticks(ax)
187 plt.show()
188
189 # Einzelplot: Pentandiol (PD)
190 fig, ax = plt.subplots(figsize=(8, 5))
191 ax.plot(t_eval, c_PD_mean, label=r"$c_{\text{PD}}$", color="blue")
192 ax.fill_between(t_eval, c_PD_lower, c_PD_upper, color="blue", alpha=0.3)
193 ax.set_xlabel("Zeit [min]")
194 ax.set_ylabel("Konzentration [mM]")
195 ax.set_title("Konzentrationsverlauf von Pentandiol (PD)")

```



```
195 ax.set_xlim(0, t_eval[-1])
196 ax.set_ylim(50,70)
197 ax.legend()
198 deutsche_ticks(ax)
199 plt.tight_layout()
200 plt.show()
```

Eidesstattliche Versicherung

(Affidavit)

Gerfen, Jonas

Name, Vorname
(surname, first name)

212855

Matrikelnummer
(student ID number)

☐ Bachelorarbeit
(Bachelor's thesis)

☒ Masterarbeit
(Master's thesis)

Titel
(Title)

Optimierung der LbADH-katalysierten oxidativen Lactonisierung zur Synthese von δ -Valerolacton

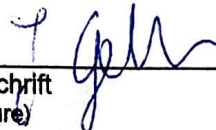
Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Abschlussarbeit mit dem oben genannten Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

I declare in lieu of oath that I have completed the present thesis with the above-mentioned title independently and without any unauthorized assistance. I have not used any other sources or aids than the ones listed and have documented quotations and paraphrases as such. The thesis in its current or similar version has not been submitted to an auditing institution before.

Dortmund, 29.05.2025

Ort, Datum
(place, date)

Unterschrift
(signature)



Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden. (§ 63 Abs. 5 Hochschulgesetz - HG -).

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt wird mit Freiheitsstrafe bis zu 3 Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

Die Technische Universität Dortmund wird ggf. elektronische Vergleichswerkzeuge (wie z.B. die Software „turnitin“) zur Überprüfung von Ordnungswidrigkeiten in Prüfungsverfahren nutzen.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offense can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offenses of this type is the Chancellor of TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the examinee can also be unenrolled, Section 63 (5) North Rhine-Westphalia Higher Education Act (*Hochschulgesetz, HG*).

The submission of a false affidavit will be punished with a prison sentence of up to three years or a fine.

As may be necessary, TU Dortmund University will make use of electronic plagiarism-prevention tools (e.g. the "turnitin" service) in order to monitor violations during the examination procedures.

I have taken note of the above official notification:*

Dortmund, 29.05.2025

Ort, Datum
(place, date)

Unterschrift
(signature)



*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the Bachelor's/ Master's thesis is the official and legally binding version.