

Multiskalensimulation eines Bio-Mikroreaktors mit immobilisierten Enzymkaskaden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (DR.-ING.)

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Philip Pietrek

aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2024

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Roland Dittmeyer

Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Dittmeyer, Leiter des Instituts für Mikroverfahrenstechnik des Karlsruher Instituts für Technologie, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Ich bedanke mich für die herausfordernde und interessante Themenstellung, die mich anregte, eine Dissertation in Betracht zu ziehen. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine Betreuung und Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Christof M. Niemeyer, Leiter des Instituts für Biologische Grenzflächen und der Arbeitsgruppe von Dr. Kersten S. Raabe, hier speziell Teresa Burgahn und Sandra Kröll, für die vorbildliche und freundliche Zusammenarbeit danken. Viele spannende Diskussionen und der regelmäßige Austausch haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Mikroverfahrenstechnik für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Herrn Manfred Kraut für seine offene, persönliche und fachliche Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden herzlich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation danken. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Kurzfassung

Die Optimierung von mechanischen, chemischen und biologischen Systemen stellt eine essenzielle Aufgabe für Ingenieure dar. Um diese Systeme zu verbessern, sind effiziente Methoden und ein tiefes Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse erforderlich, da sie wesentlich zur Funktionalität und Effizienz beitragen. Die modellhafte Darstellung und Berechnung solcher Systeme wecken großes Interesse in Wissenschaft und Wirtschaft. Die Anwendung von computerbasierten Optimierungsmethoden ermöglicht eine wirtschaftliche und effiziente Verbesserung dieser Systeme durch Variation der Parameter. Die Gestaltung von produktiven und ressourcenschonenden Prozessen kann in verschiedenen Größenordnungen erfolgen. Neben den üblichen makroskopischen Größen, wie beispielsweise den Reaktordimensionen, können auch mikroskopische Größen (wie Partikelgröße und -anordnung) sowie Nanostrukturen (wie Molekülanordnung) optimiert werden. Um die Optimierung auf verschiedenen Größenebenen durchzuführen, sind verschiedene Modelle erforderlich, die die Abläufe von Strömungskräften bis hin zu elementaren Reaktionsvorgängen beschreiben.

Die Bionik, also die technische Anpassung natürlicher Phänomene, wird seit Jahrhunderten zur Entwicklung neuer Technologien und Systeme genutzt. Ein komplexes Beispiel für Optimierung ist die menschliche Zelle. Durch Evolution wurde eine selektive und effiziente Methode zur Regulation komplexer Prozesse in der menschlichen Zelle ermöglicht. Die Kompartimentierung in der Zelle ermöglicht die Anordnung von Enzymen in Reaktionsnetzwerken in Volumina oder auf Oberflächen, wodurch die Selektivität und Produktivität des gesamten Reaktionsnetzwerks erhöht und unerwünschte Nebenprodukte vermieden werden können. Dieses Prinzip wird in der Technik mit der DNA-Origami-Technologie adaptiert. Mit Hilfe der japanischen Falte Kunst können DNA-Stränge synthetisiert und funktionalisiert werden, um automatisch eine bestimmte Geometrie zu bilden. Durch genetische Manipulation können Enzyme spezifisch markiert und auf den DNA-Nanostrukturen immobilisiert werden, um sie in technischen Prozessen zu nutzen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, ein biochemisches Reaktorsystem auf verschiedenen Größenordnungen modellhaft zu betrachten. Das untersuchte Reaktorsystem ist ein Mikroreaktor mit einem überströmten Partikelbett am Boden, wobei die Partikel einen Durchmesser von $2,8 \mu\text{m}$ haben. Die Partikel sind superparamagnetisch und werden mittels acht alternierenden Neodym-Magneten im Reaktor gehalten. Als biologisches Beispiel wird die zweistufige Reduktion von 5-Nitrononan-2,8-Dion mit einer Kettoreduktase untersucht. Ein zusätzliches Regenerationssystem mit einer Dehydrogenase wird verwendet, um den teuren Kofaktor NADPH für diese Reduktionen zu regenerieren. Neben der Entwicklung einzelner Modelle untersucht diese Arbeit auch die Übertragbarkeit von Ergebnissen zwischen den verschiedenen Ebenen und resultiert schließlich in einer makroskopischen Systemoptimierung unter Berücksichtigung

ökonomischer Aspekte. Die untersuchten Modelle auf den unterschiedlichen Skalenebenen sind wie folgt: Auf makroskopischer Ebene werden mehrdimensionale Berechnungen des Reaktorumsatzes durchgeführt, auf mikroskopischer Ebene wird die Bildung des Partikelbetts und die Partikelanordnung betrachtet, und auf molekularer Ebene werden Diffusionsprozesse von Substraten und die Auswirkungen der Enzymanordnung analysiert.

Auf molekularer Ebene wird eine Brown'sche Dynamik-Modellierung (GeomBD) eingesetzt, um die Auswirkungen der Enzymkonfiguration (Abstand und Orientierung) sowie das Vorhandensein einer flachen DON (5-Nitrononan-2,8-Dion) zu untersuchen. Geringe Abstände und die Beeinträchtigung der Molekularbewegung durch die DON führen zu Verbesserungen der Assoziationsgeschwindigkeiten und somit zu einer Erhöhung des Umsatzes. Dies zeigt das Potenzial der DNA-Nanotechnologie.

Die optische Analyse und Partikelsimulationen mit der Lattice-Boltzmann-Software OpenLB liefern charakteristische Größen des Partikelbetts, wie die durchschnittliche Höhe und Porosität, die für die makroskopische Simulation benötigt werden. Durch die Verwendung von Magneten unter dem Reaktorchip werden die Partikel im Reaktorkanal gehalten und bilden ein Partikelbett mit Erhebungen an den Enden und Anfängen der Magneten. Untersuchungen des Anfangs und der Mitte des Partikelbetts ergaben eine durchschnittliche Partikelbetthöhe von 94,8 μm und eine durchschnittliche Porosität von 0,309.

Die makroskopische Betrachtung des Reaktors wurde in verschiedenen Modellen umgesetzt. Diese Arbeit vergleicht ein pseudo2D-Modell in Matlab mit Strömungssimulationen in Fluent für den 2D- und 3D-Fall hinsichtlich ihrer Ergebnisse, Genauigkeit und des numerischen Aufwands. Das pseudo2D-Modell erwies sich als effizienteste Methode und wurde anschließend im Rahmen einer systematischen Optimierung nach der Multi-Level-Reactor-Design-Methode angewendet. Dafür wurde die Techno-ökonomische Leistung (engl.: *Techno-Economic Performance*, TEP), eine Kombination aus Raumzeitausbeute, Produktivität der Reduktionsenzyme sowie einmaligen und laufenden Kosten, definiert und mit Hilfe eines genetischen Algorithmus optimiert. Im Vergleich zum Ausgangsfall konnte die Raumzeitausbeute verdoppelt und die Produktivität um den Faktor 3,5 verbessert werden. Gleichzeitig ergab sich bei der Optimierungsmethode eine Reduktion der Kosten und letztlich eine Verbesserung der TEP auf einen Faktor von 15.

Diese Arbeit verdeutlicht die Möglichkeiten und Herausforderungen der computergestützten Optimierung. Insbesondere für komplexe Reaktorsysteme können dabei erstaunliche und unvorhergesehene Optimierungsmöglichkeiten aufgedeckt werden, die mit herkömmlichen Methoden nicht realisierbar sind.

Abstract

The optimization of mechanical, chemical, and biological systems is a central task for engineers. Improving these systems requires not only an efficient methodology but also a deep understanding of the underlying processes that significantly contribute to the functionality and efficiency of the system. The modeling and calculation of such systems are of great interest to science and industry. Determining the theoretical behavior through parameter variations enables cost-effective and efficient computer-assisted system optimization. Adapting the design of productive and resource-efficient processes can be conducted on different scales. In addition to the usual macroscopic scale (e.g., reactor dimensions), it is also possible to optimize on a microscopic scale (e.g., particle size and arrangement) and even down on the nanometer scale (e.g., molecular arrangements). Applying computer-assisted methods for optimization across multiple scales requires different models, which serve to describe the processes involved, from fluid dynamics to elementary reaction processes.

The method of bionics, which involves the technical adaptation of naturally occurring phenomena, has been used for centuries to develop innovative technologies and systems. One of the most complex and interesting biological system is the mammal cell. Evolution has enabled a selective and efficient method of regulating complex processes within the cell. The principle of compartmentalization can be observed in these cells, which results in arranging enzymes, which are dependent on each other in reaction networks, within volumes or on surfaces. This increases the selectivity and productivity of the entire reaction network and avoids unwanted by-products. The adaptation of this principle in technology is achieved through DNA origami technology. Inspired by the Japanese art of paper folding, DNA strands can be synthesized and functionalized to automatically form a tailored geometry. By genetically manipulating enzymes, they can be specifically labeled and immobilized on DNA nanostructures for use in technical processes.

This goal of this work is to investigate a biochemical reactor system at different scales with computational methods, elaborate on fundamental behavior and improve it with regards to these. The investigated reactor system is a microreactor with a stationary bed of particles with a diameter of $2.8\ \mu\text{m}$ at the bottom of the reactor. The particles are superparamagnetic and are held in the reactor by eight alternating neodymium magnets. As an exemplary reaction system, the two-stage reduction of 5-nitrononan-2,8-dione with a ketoreductase is studied. An additional regeneration system with a dehydrogenase is used to regenerate the expensive cofactor (NADPH) for these reductions. Besides the definition and application of the individual models, this work also addresses the transfer of essential results between the different scales, resulting in a macroscopic system optimization regarding performance and economic considerations. The investigated models on different scales are as follows: macroscopic scale – overall reactor

conversion and behavior; microscopic scale - formation of the particle bed and particle arrangement; molecular scale – reaction kinetics and diffusion processes of substrates and the influence of enzyme arrangements.

At the molecular scale, a Brownian dynamics software (GeomBD) is used to investigate the effects of enzyme configuration (distance and orientation) as well as the presence of a flat DON. Small distances and the hindrance of molecular movement by the DON show improvements in association rates and thus an increase in conversion, demonstrating the potential of DNA nanotechnology.

Optical analysis and particle simulations using the Lattice-Boltzmann software OpenLB provide characteristic parameters of the particle bed, such as average height and porosity. These are essential for the macroscopic simulation. The magnets underneath the reactor chip hold the particles in the reactor channel and form a particle bed with elevations at the ends and beginnings of the magnets. Investigations of the distinct parts of the particle bed (beginning and middle) concluded in an average particle bed height of 94.8 μm , corresponding to an average porosity of 0,309.

The macroscopic consideration of the reactor was implemented in different models. This work compares a pseudo-2D model in Matlab with numerical fluid dynamics simulations in Fluent in 2D and 3D regarding their accuracy and numerical efficiency. The pseudo-2D model proves to be the most efficient and is subsequently applied in a systematic optimization using the Multi-Level Reactor Design method (MLRD). For this purpose, the Techno-Economic Performance (TEP), a combination of space-time yield, productivity of the reduction enzymes, capital and operation costs, is introduced and calculated and optimized with a genetic algorithm. Compared to the initial case, the space-time yield was doubled and the productivity improved by a factor of 3.5. With lower costs the optimized reactor design results in a 15-fold improvement in TEP.

This work demonstrates the possibilities and challenges of computer-assisted optimization. Especially for complex reactor systems, it reveals remarkable and unforeseen optimization opportunities that are not achievable with conventional methods.

Veröffentlichungen

Abschnitte aus dieser Arbeit wurden vom Verfasser in Zusammenarbeit mit Kollegen und Kolleginnen des Instituts für Mikroverfahrenstechnik (IMVT, Karlsruher Institut für Technologie) und Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1, Karlsruher Institut für Technologie) bereits in Fachzeitschriften und auf wissenschaftlichen Tagungen veröffentlicht:

Fachzeitschriften

1. Burgahn, T.; Pietrek, P.; Dittmeyer, R.; Rabe, K. S.; Niemeyer, C. M. . Optimization of a Microreactor for Flow Biocatalysis by Combined Theory and Experiment. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2452 – 2460.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cctc.202000145>
2. Pietrek, P.; Kraut, M.; Dittmeyer, R. . Towards a Novel Computer-Aided Optimization of Microreactors: Techno-Economic Evaluation of an Immobilized Enzyme System. *Symmetry* **2021**, *13*, 524.
DOI: <https://doi.org/10.3390/sym13030524> (Kapitel 4.6, 4.7, 5)

Poster

1. **P. Pietrek**, T. Burgahn, K.S. Rabe, C.M. Niemeyer, R. Dittmeyer. *DNA-Flow: Multiscale flow biocatalysis – preparation and simulation (Poster)*, Helmholtz Programm, Science and Technology of Nanosystems (STN) Day 2018, 26. April 2018, Karlsruhe, Germany
2. **P. Pietrek**, T. Burgahn, K.S. Rabe, C.M. Niemeyer, R. Dittmeyer. *Modeling and multiscale Optimization of Micro Bioreactors with immobilized Enzyme Cascades (Poster)*, International Conference on Micro Reaction Technology (IMRET), 21 - 24 Oktober 2018, Karlsruhe, Germany
3. **P. Pietrek**, T. Burgahn, K.S. Rabe, C.M. Niemeyer, R. Dittmeyer *Multiscale-optimization of a micro-bio-reactor for chiral reduction (Poster spotlight)*, Implementation of microreactor technology in biotechnology (IMTB), 19 - 22 Mai 2019, Cavtat, Kroatien

Inhalte aus diesen Veröffentlichungen sind in die vorliegende Arbeit eingeflossen. Im Folgenden sind die Kapitel, Abbildungen und Tabellen aufgelistet, die in ähnlicher Form in dieser Arbeit aufgeführt sind. Das Zitieren dieser Quellen ist im Weiteren dann verzichtet.

Kapitel: Kapitel 4.4, Kapitel 4.5 ; **Abbildungen:** Abbildung 4.3, Abbildung 4.4, Abbildung 4.5 und **Tabellen:** Tabelle 2.5, Tabelle 2.6, Tabelle 4.15 wurden aus (Burgahn et al. 2020) adaptiert.

Kapitel: Kapitel 4.6 , Kapitel 4.7, Kapitel 5; **Abbildungen:** Abbildung 5.1, Abbildung 5.2, Abbildung 5.3, Abbildung 5.4, Abbildung 5.5, Abbildung 5.6, Abbildung 5.7, Abbildung 5.8, Abbildung 5.9 und

Tabellen: Tabelle 4.17, Tabelle 5.1, Tabelle 5.2, Tabelle 5.3 wurden aus (Pietrek et al. 2021) adaptiert und eingefügt.

Studentische Arbeiten

Der Verfasser hat während der Erarbeitung dieser Arbeit zwei studentische Arbeiten betreut. Einige Erkenntnisse und Ergebnisse aus diesen Arbeiten sind in der vorliegenden Dissertation wiedergegeben.

1. Hanisch, K. *Entwicklung eines CFD-Modells zur Beschreibung eines kontinuierlichen Biomikroreaktors mit immobilisierten Enzymkaskaden*, **2019** (CIW)
2. Zdravkov, D. *Erweiterung eines zweidimensionalen CFD-Modells zur Beschreibung eines kontinuierlichen Bio-Mikroreaktors mit immobilisierten Enzymkaskaden*, **2020** (CIW)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	i
Kurzfassung.....	ii
Abstract	iv
Veröffentlichungen	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
Symbolverzeichnis.....	xiii
Lateinische Symbole	xiii
Griechische Symbole	xiv
1 Einleitung.....	16
1.1 Enzymkatalytische Bionik - Enzymkaskaden in Flussreaktoren	16
1.2 Multiskalensimulation von enzymatischen Reaktorsystemen	22
1.3 Forschungsfrage	24
1.4 Struktur der Arbeit	26
2 Kinetik und Transport auf Nahebene	28
2.1 Reaktionssystem.....	28
2.2 Enzymimmobilisierung	30
2.2.1 Enzymkaskaden auf DNA-Origami-Nanostrukturen (DONs)	31
2.3 Enzymatisch katalysierte Reaktionen.....	34
2.3.1 Inhibierung und Aktivierung.....	36
2.3.2 Mathematische Beschreibung.....	37
2.3.3 Bestimmung intrinsischer kinetischer Parameterschätzwerte	41
2.3.4 Sensitivitätsanalyse der intrinsischen Parameterschätzwerte.....	45
2.4 Simulation von Enzymkaskaden auf DONs.....	47
2.4.1 Molekülmechanik.....	47
2.4.2 Brown'sche-Dynamik (BD) Simulations-Software	52
2.4.3 Berechnung von Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten	56
2.4.4 Indirekte Assoziation.....	59
2.4.5 DNA-Origami-Nanostrukturen (DON) mit Enzymkaskaden.....	61
2.4.6 Einflüsse von Nahordnungen	64

2.5	Zusammenfassung	66
3	Geometrische Reaktoreigenschaften	68
3.1	Reaktorbeschreibung	68
3.2	Magnetfeld	69
3.3	Superparamagnetische Partikel	71
3.3.1	Kräfte auf superparamagnetische Partikel	73
3.4	Das Partikelbett	76
3.4.1	Physikalische Betteigenschaften	76
3.4.2	Optische Partikelbettuntersuchung	77
3.5	Simulation magnetischer Partikel in einem Mikrokanal	80
3.5.1	Berechnung des Magnetfeldes	80
3.5.2	Partikelsimulation	82
3.5.3	Lattice-Boltzmann Methode (LBM)	82
3.5.4	Simulation der Befüllung des Reaktorkanals	86
3.5.5	Partikelbetteigenschaften	91
3.6	Zusammenfassung	94
4	Reaktormodellierung	96
4.1	Modellierung der physikalischen Prozesse	96
4.1.1	Erhaltungssätze	96
4.1.2	Diffusion in Flüssigkeiten	97
4.1.3	Diffusion in porösen Medien	99
4.2	Kinetische Hemmung im Partikelbett	99
4.3	Reaktorkenngrößen	100
4.4	Pseudo 2D-Modell	101
4.4.1	Systembedingungen	103
4.4.2	Bestimmung gehemmter kinetischer Parameter	106
4.5	Modellvalidierung	110
4.6	Numerische FVM-Modelle	113
4.6.1	Numerisches Setup	114
4.7	Modellvergleich	116
4.8	Zusammenfassung	121
5	Systemoptimierung	122
5.1	Optimierungsmethode	122
5.1.1	Optimierungsparameter	125

5.1.2	Randbedingungen	126
5.1.3	Ökonomisches Modell.....	127
5.1.4	Techno-Ökonomische Leistung	129
5.2	Immobilisierung Cofaktor-Regeneration	129
5.3	Systematische Optimierung	131
5.3.1	Ebene 1 – Unbegrenzte Stoffstromdichten.....	131
5.3.2	Ebene 2 und 3 – (Technisches) Reaktorkonzept	134
5.4	Zusammenfassung.....	139
6	Zusammenfassung und Ausblick	142
6.1	Zusammenfassung.....	142
6.2	Ausblick	145
7	Literaturverzeichnis	147
8	Abbildungsverzeichnis	162
9	Tabellenverzeichnis	169
Anhang	172

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AGK	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\text{mol}^{-1}\text{L s}^{-1}$
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	kubisch raumzentrierte Packung, engl.: <i>body centered cubic</i>
BD	Brown'sche Dynamik
BG	Boltzmann-Gleichung
BGK	Bhatnagar, Gross und Krook-Kollisionsoperator
Bo	Bodenstein-Zahl, dimensionslos
BR	Partikelverhältnis, engl.: <i>bead ratio</i>
CM	Gewöhnlich modular, engl.: <i>common modular</i>
DM	Direktes Binden modular, engl.: <i>direct binding modular</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DoE	Design of Experiments
DON	DNA-Origami Nanostrukturen
DVBE	Boltzmann Gleichung mit diskreter Geschwindigkeit, engl.: <i>discrete velocity Boltzmann equation</i>
E	Enzym
EPF	Elementare Prozessfunktionen
ES	Elektrostatisch
EU	Enzym-Nutzungsgrad, engl.: <i>enzyme utilization</i> ,
EX	Exklusion
FCC	Kubisch dichteste Packung, engl.: <i>face centered cubic</i>
FDM	Finite-Differenzen-Methode
FEM	Finite-Elemente-Methode
FLLEX	Zwei Phasen Extraktion, engl.: <i>Flow Liquid Liquid Extraction</i>
FM	Kraft-abhängig modular, engl.: <i>force-dependend modular</i>
FVM	Finite-Volumen-Methode
GDH	Glucose 1-Dehydrogenase aus <i>Bacillus subtilis</i>
GluAcid	D-Glucono-1,5-lacton
Gre2	Methylglyoxal Reduktase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HCP	Hexagonal dichteste Packung, engl.: <i>hexagonal close-packed</i>
HK	Hydroxyketon
KRED	Ketoreduktase
LBM	Lattice-Boltzmann-Methoden
LJ	Lennard-Jones
MB	Magnetisches Partikel, engl.: <i>magnetic bead</i>

MLRD	Multi-Level-Reactor-Design
MM	Molekülmechanik
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAM	Northrup-Allison-McCammon
NDK	5-Nitrononan-2,8-Dion
OT	Betriebszeit, engl. <i>operation time</i> , <i>s</i>
PM	Potenzgesetz modular, eng.: <i>power-law modular</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
QM	Quantenmechanik
Re	Reynolds-Zahl, dimensionslos
REM	Rasterelektronenmikroskop
SC	Spy-Catcher aus dem Bakterium <i>Streptococcus pyogenes</i> (Kapitel 2)
SC	Kubisch reguläre Packung, engl.: <i>simple cubic packing</i> (Kapitel 3 - 5)
Sc	Schmidt-Zahl, dimensionslos
SDA	Simulation der Assoziation durch Diffusion, engl.: <i>Simulation of Diffusional Association</i>
SM	Simultanes Binden, engl.: <i>Simultaneous binding</i>
SP	Startposition
ST	Spy-Tag aus dem Bakterium <i>Streptococcus pyogenes</i>
TON	Reaktionen pro Sekunde , engl.: <i>turnover number</i> , s^{-1}
TGK	Transfargeschwindigkeitskonstante, s^{-1}
TKM	thermokinetic Modellierungsformalismus, engl.: <i>Thermodynamic-Kinetic Modelling formalism</i>
UDF	Benutzerfunktion, engl.: User-Defined-Function
VdW	Van-der-Waals

Symbolverzeichnis

Lateinische Symbole

Symbol	Bedeutung, Einheit
A_r	Thermodynamische Aktivität, $J mol^{-1}$
B	Magnetische Flussdichte, T (Kapitel 3)
B	Breite, m (Kapitel 4)
c_i	Konzentration vom Stoff i , $mol L^{-1}$
$CapEx$	Kapitalkosten engl.: capital expenditure, €
d	Durchmesser, m
d_h	Hydraulischer Durchmesser, m
D_i	Diffusionskoeffizient, $m^2 s^{-1}$
D_{ij}	Dissoziationsenergie, °
D_r	Mechanismus spezifischer Nenner der Reaktion r , -
D_r^{Reg}	Regulierungsterm der Reaktion r , -
E	Potential, Nm
EL	Enzymbelastung, $mol kg^{-1}$
F	Kraft, N
f_r	Regulierungsfaktor der Reaktion r , -
g	Gravitationsbeschleunigung, $9,81 m s^{-2}$
H	Magnetische Feldstärke, $A m^{-1}$
k	Schwingungskonstante, $N m^{-1}$
k^\pm	Geschwindigkeitskonstante, s^{-1}
K_A^i	Aktivierungskonstante vom Stoff i , $mol L^{-1}$
k_b	Boltzmann Konstante, $1,38 \cdot 10^{-23} J K^{-1}$
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante, -
K_f	Forchheimer Koeffizient, -
K_I^i	Inhibierungskonstante vom Stoff i , $mol L^{-1}$
K_M^i	Assoziationskonstante vom Stoff i , $mol L^{-1}$
L	Länge, m
M	Magnetisierung, $A m^{-1}$
m	Masse, kg
m_{ri}^\pm	Stöchiometriefaktor des Stoffs i in der Reaktion r , -
\tilde{M}_i	Molmasse des Stoffs i , $g mol^{-1}$
N	Stoffmenge, mol
$OpEx$	Betriebskosten engl.: operating expenditure, € s^{-1}

p	Druck, <i>bar</i>
$prod_{cat}$	katalytische Produktivität aus dem Massenverhältnis aus Produkt und Enzym $prod_{cat} = \frac{m_P}{m_E}$, -
q	Ladung, <i>C</i>
r	Radius, <i>m</i>
r	Ort, <i>m</i> (Kapitel 2.4)
R_g	Allgemeine Gaskonstante, $8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
R_{ij}	Abstand zwischen Atom <i>i</i> und <i>j</i> , <i>m</i>
R_r	Reaktionsrate der Reaktion <i>r</i> , $\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
STY	Raumzeitausbeute engl.: space-time-yield, $\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
T	Temperatur, <i>K</i>
t	Zeit, <i>s</i>
T_m	Drehmoment, <i>Nm</i>
T_r	Zähler der Reaktion <i>r</i>
TEP	Techno-ökonomische-Leistung engl.: techno-economic-performance, -
u	Geschwindigkeit, m s^{-2}
V	Volumen, m^3
\dot{V}	Volumenstrom, $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit, $\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
W	Breite, engl. <i>width</i> , <i>m</i>
Y	Ausbeute, -

Griechische Symbole

Symbol	Bedeutung, Einheit
α	Permeabilität, m^2
β	Assoziationsverhältnis, - (Kapitel 2)
β	Stofftransportkoeffizient, m s^{-1} (Kapitel 4, 5)
ε	Porosität, -
ϵ	Potentialmulde, <i>Nm</i>
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante, $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ As V}^{-1} \text{ m}^{-1}$
η	Winkel der Beugeschwingung, $^\circ$
η	Dynamische Viskosität, <i>Pa s</i>
η_{ij}	Dämpfungskonstante zwischen den Partikeln <i>i</i> und <i>j</i> , kg s^{-1}
η_R	Enzym Wirkungsgrad des Reaktors, -
κ	Inverse Debye Länge, m^{-1}
λ_D	Debye Länge, <i>m</i>
μ	Magnetische Permeabilität, $\text{Vs A}^{-1} \text{ m}^{-1}$

μ_0	Magnetische Feldkonstante, $1,257 \cdot 10^{-6} \text{ N A}^{-2}$
μ_i	Chemisches Potential, J mol^{-1}
ν	Reaktionsrate, $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
ν	Kinematische Viskosität, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
ξ	Reibungsfaktor, - (Kapitel 3)
ξ	Teilchengeschwindigkeit, ms^{-1} (Kapitel 2)
ρ	Dichte, kg m^{-3}
σ	Atomradius, m
τ	Tortuosität, -
θ	Diederwinkel, $^\circ$
ϕ	Torsionswinkel, $^\circ$
χ_v	Magnetische Suszeptibilität, -
Ω	Kollisionsoperator, -

1 Einleitung

1.1 Enzymkatalytische Bionik - Enzymkaskaden in Flussreaktoren

Der britische Naturforscher Sir David Attenborough beschreibt die Natur als „größte Quelle der Begeisterung, [...] Schönheit und [...] des intellektuellen Interesses. Sie ist die größte Quelle für so vieles im Leben, was das Leben lebenswert macht.“

„It seems to me that the natural world is the greatest source of excitement; the greatest source of visual beauty; the greatest source of intellectual interest. It is the greatest source of so much in life that makes life worth living.“ – Sir David Attenborough.

Wissenschaftler lernen schon seit Jahrhunderten von der Vielseitigkeit, Komplexität und Spezifität der Natur. Leonardo da Vinci war einer der ersten, der aus der Wissensquelle „Natur“ schöpfte. Durch die Beobachtung, Abstraktion und technische Umsetzung des Flügelschlags von Vögeln entwickelte er eine Flugmaschine, die durch die Bewegung der Tragflächen Auf- und Vortrieb erzeugt (Da Vinci 1505). Damit legte Leonardo da Vinci den Grundstein für die bemannte Luftfahrt. Seither sind zahlreiche neue Erfindungen und Innovationen durch die Beobachtung der Natur entstanden unter anderem in Bereichen der Formgestaltung, Robotik, Verfahrensentwicklung aber auch der Systemik und der biomedizinischen Technik (Nachtigall 2013). Die Entwicklung technischer Innovationen durch die Beobachtung der Natur wird als Bionik bezeichnet, einer Kombination aus den Wörtern „Biologie“ und „Technik“. Die Bionik teilt sich in drei Teilschritte auf: Die Analyse der Natur, die Abstraktion der Befunde und die technische Umsetzung (Nachtigall 2010). Durch Beobachtung, Beschreibung und Beurteilen der Natur entwickelt sich ein Verständnis über Funktionen von Objekten, Materien und Verhalten. Daraus werden abstrakte Befunde als allgemeine Prinzipien herausgearbeitet und in einem letzten Schritt konzeptualisiert bzw. technisch umgesetzt.

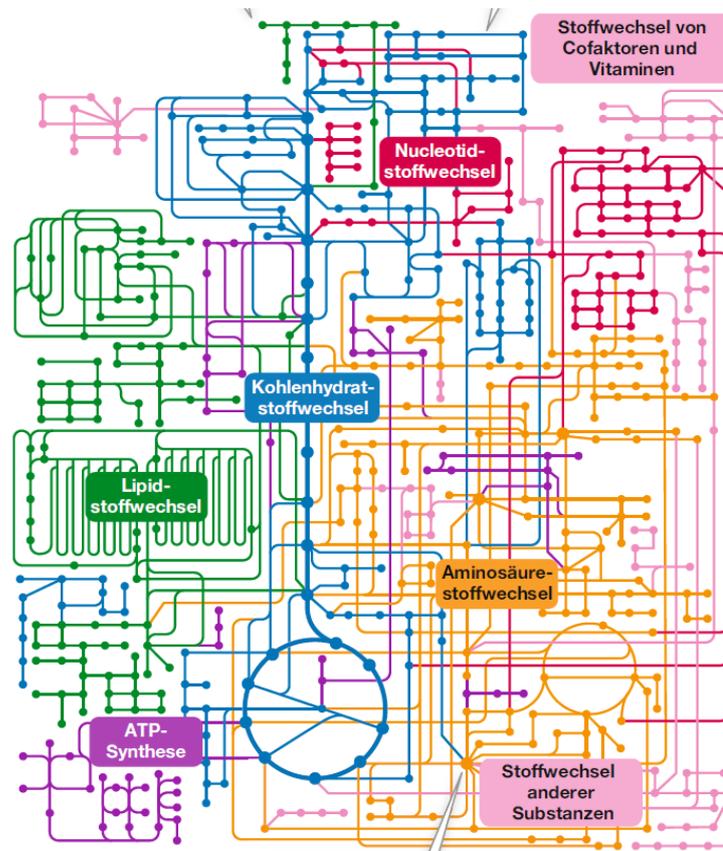


Abbildung 1.1 Stoffwechselsystem in einer menschlichen Zelle. Jeder Punkt steht für eine Komponente (Metabolit) und jede Bindung für eine Reaktion, katalysiert von einem Enzym (Sadava et al. 2019, S. 215–244).

Die Vorbilder aus der Natur wirken aufgrund ihrer Komplexität teilweise erschlagend und verlangen in der technischen Umsetzung nach Vereinfachung. Ein Paradebeispiel hierbei ist die menschliche Zelle. Dort gibt es tausende unterschiedliche von Proteinen mit verschiedenen Funktionen, die zum Stoffwechsel in der Zelle beitragen (Milo et al. 2010). Die Komplexität macht sich in der Veranschaulichung der Reaktionswege und Komponenten des Stoffwechselsystems bemerkbar (Abbildung 1.1) (Sadava et al. 2019, S. 215–244). Das Stoffwechselsystem einer Zelle ist essenziell für die Umwandlung von Stoffen im menschlichen Körper. Bestehend aus verschiedenen Teilprozessen bzw. Zyklen, die unterschiedliche Aufgaben in der Zelle erfüllen, ist die Kontrolle über die Reaktionsbedingungen und der Reaktionsschritte essenziell. Diese Teilsysteme ermöglichen beispielsweise die Umsetzung der Nahrungsmittel zu vitalen Stoffen. Dazu zählt die Produktion von organischen Grundbaustoffen und Energiebausteinen in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die Reaktionen und Stoffwechselwege der einzelnen Teilsysteme sind miteinander verbunden und durch Enzyme reguliert, die Reaktionswege in einem Teilsystem beschleunigen und ermöglichen. Ein Enzym ist ein Protein, das mit spezifischen Substanzen Komplexe bildet und somit eine koordinierte Reaktion bestimmter funktionalen Gruppen ermöglicht.

Aufgrund der Anzahl der beteiligten Moleküle, der ablaufenden Reaktionen und der Vernetzung der Teilsysteme in menschlichen Zellen ist es beeindruckend, wie schnell, flexibel und effizient diese funktionieren. Die Optimierung eines solch komplexen Systems ist in der Biotechnologie utopisch. Jedoch ist eine Orientierung an diesem System und wie es durch Anordnung verschiedenster Enzyme die Optimierung umsetzt von großem Interesse. Dadurch wird eine erhöhte Ausbeute, geringerer Nebenproduktabfall und eine erhöhte Wirtschaftlichkeit der Prozesse ermöglicht (Wang und Hou 2011). Die Erstellung einer künstlichen Zelle mit allen zugehörigen Stoffwechselsystemen ist mit dem heutigen Wissen und der heutigen Technik nicht möglich. Dennoch ermöglicht uns die Untersuchung von Teilsystemen oder Teilreaktionen einer Zelle, Erkenntnisse zu gewinnen und Nutzungspotentiale zu erkennen. Mit den nötigen Teilschritten der Bionik kann dabei ein Teil zum Verständnis der Zellprozesse beigesteuert werden.

Um das Prinzip der Bionik auf ein Teilsystem in einer menschlichen Zelle anzuwenden, kann beispielhaft die Umwandlung eines Substrats zu einem Produkt beobachtet werden. Der Reaktionsweg dieses Teilsystems bezieht sich auf unterschiedliche enzymatisch katalysierte Redoxreaktionen, da unterschiedliche, funktionelle Gruppen verändert werden müssen. Oft werden in den einzelnen Reaktionsschritten unterschiedliche Enzyme genutzt. Eine sequenziell ablaufende Umsetzung mit verschiedenen Enzymen zum Endprodukt wird als Enzymkaskade bezeichnet und beschreibe die Syntheseroute. Solche Synthesen ermöglichen eine gezielte Umsetzung von funktionellen Gruppen. Bei diesen Syntheserouten ist neben der örtlichen Nähe auch die Anordnung der Enzymkaskade von großer Bedeutung. Die Anordnung der Enzyme kann somit neben dem Umsatz auch die Selektivität des Systems verbessern (Ke et al. 2016). Um die Effizienz und die Funktionsweise der Enzymkaskade zu garantieren, werden die Enzyme in einer Zelle räumlich gruppiert (Rabe et al. 2017). Dieses Prinzip wird Kompartimentierung genannt und kann in echten Zellen beobachtet werden (Abbildung 1.2 A). Die Kompartimentierung einer Enzymkaskade kann in einer Zelle in drei verschiedenen Varianten beobachtet werden: Eine Gruppierung der Enzyme in einem begrenzten Volumen (Kompartiment), an der Zellwand oder auf molekularen Gerüsten. Alle diese Methoden basieren auf dem Einschluss oder der Immobilisierung der notwendigen Enzyme. Für ein Substrat, das mit zwei oder mehreren Enzymen umgesetzt wird, verkürzen sich durch diese Gruppierung die zurückzulegenden Wege (Diffusionswege). Dadurch erfolgt eine Beschleunigung der gesamten Reaktion in allen drei Varianten der Kompartimentierung. Die unterschiedlichen Varianten unterscheiden sich aber in der möglichen Anordnung der Enzymkaskade.

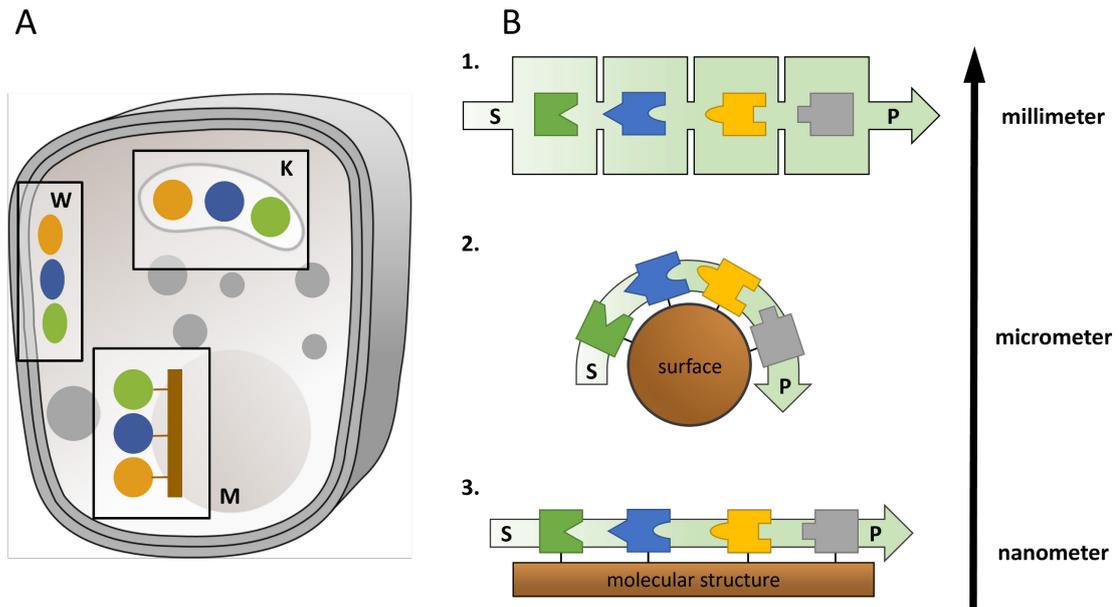


Abbildung 1.2 A: Enzymkaskaden in natürlichen Zellen mit räumlichen Nahordnungen W: an der Zellwand; K: in einem Kompartiment; M: auf einem molekularen Gerüst (Design nach Good et al. (Good et al. 2011)). B: Kompartimentierung in der Biotechnologie mit geordneter Orientierung und Positionierung von Enzymen auf unterschiedlichen Größenordnungen: 1. Begrenzte Volumen mit unterschiedlichen Enzymen (mm); 2. Immobilisierung auf Oberflächen (μm) und 3. Immobilisierung auf molekularen Strukturen (nm) (Design nach Rabe et al. (Rabe et al. 2017)).

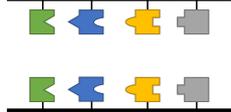
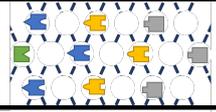
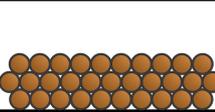
In einem begrenzten Volumen (Kompartiment) bewegen sich die Enzyme frei und können sich somit zufällig anordnen. Bei der Kompartimentierung an der Zellwand bzw. anderen Oberflächen sind die Enzyme an diese Flächen gebunden, was zu einer festen, aber ungerichteten Anordnung führt. Die Fixierung auf einer Oberfläche ermöglicht hierbei eine zufällige Gruppierung der Enzyme mit Abständen in einer Mikrometer-Größenordnung (ca. 20-facher Durchmesser eines Enzyms). Noch kürzere Diffusionswege ermöglicht die Anordnung der Enzymkaskade auf einer molekularen Struktur. Die Immobilisierung der Enzyme kann an spezifischen Stellen erfolgen, wodurch individuelle, vorausgeplante Anordnungen im Nanometerbereich (wenige Durchmesser eines Enzyms) erreicht werden können. Wenn die Enzyme nach der Reaktionsreihenfolge angeordnet sind, erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit, da die Moleküle „nur“ zu einem benachbarten, nahen Enzym diffundieren müssen. Mit Hilfe dieser Kompartimentierung werden Reaktionen bzw. Reaktionssysteme in einer Zelle in ihrer Produktivität, Selektivität und Robustheit optimiert (Rabe et al. 2017).

Die Anwendung der Kompartimentierung für biotechnologische Anwendungen verspricht eine Leistungssteigerung durch eine Anordnung der Enzyme (vgl. Abbildung 1.2 B) (Ke et al. 2016; Agapakis et al. 2012). Wie beim biologischen Vorbild kann die Gruppierung der Enzyme technisch unterschiedlich umgesetzt werden, was eine Kompartimentierung auf unterschiedlichen Größenskalen ermöglicht. Die serielle Verkettung von Reaktorvolumina mit einzelnen Enzymen ordnet die Enzymkaskade im Millimeterbereich an. Dies kann durch serielle Satzreaktoren oder einem kontinuierlichen Reaktor mit abgegrenzten,

durchströmten Reaktorvolumina umgesetzt werden. Die Vorteile durch die Kompartimentierung sind hierbei jedoch gering, da die Diffusionswege verhältnismäßig groß sind.

Die Kompartimentierung durch die Enzymimmobilisierung auf Trägern wie z.B. magnetischen Partikeln, ermöglicht eine Anordnung der Enzyme im Mikro- und Nanometermaßstab (Sheldon und Brady 2018; Hartmann und Jung 2010). Viele dieser Methoden finden in der Forschung ihre Anwendung vor allem in Kombination mit kontinuierlichen Reaktoren (Žnidaršič-Plazl 2019; Kim und Herr 2013). Bei der Auswahl des richtigen Trägermaterials in einem kontinuierlichen Reaktor gibt es zwei wichtige Kriterien: i) die technische Umsetzung der Enzymimmobilisierung (nicht Teil dieser Arbeit) und ii) das Rückhalten des Trägermaterials im Reaktorvolumen. Für die Rückhaltung werden in der Wissenschaft hauptsächlich Enzyme an der Reaktorwand (Miložič et al. 2018; Ender et al. 2016), auf Partikeln (Peschke et al. 2017b; Burgahn et al. 2020) und in Hydrogelen (Bitterwolf et al. 2019; Peschke et al. 2018) immobilisiert. Die einzelnen Trägermaterialien der immobilisierten Enzyme im Reaktorvolumen unterscheiden sich in ihrer reaktortechnischen Charakteristik und sind von Zhu et al. (Zhu et al. 2020) in Tabelle 1.1 gut zusammengefasst worden. Diese Tabelle wurde um die letzte Spalte, dem Partikelbett ergänzt. Das überströmte Partikelbett wird in dieser Arbeit als eine Kombination der Immobilisierung auf der Reaktorwand und auf Partikeln untersucht.

Tabelle 1.1 Vergleich unterschiedlicher Optionen zur Kompartimentierung: spezifische Oberfläche, Druckverlust, Diffusionslänge, Wärmetransport und mechanische Stabilität. Die einzelnen Methoden werden untereinander verglichen. Pfeile zeigen den Trend und das anschließende Zeichen wertet den Trend (Zhu et al. 2020). Die letzte Spalte bezieht sich auf das Reaktorsystem, das in dieser Arbeit untersucht wurde.

Methode	Wand-Immobilisierung	Durchströmtes Partikelbett	Durchströmtes Hydrogel	Überströmtes Partikelbett
Skizze				
Spez. Oberfläche	↓ -	↑ +	↑ +	↑ +
Druckverlust	↓ +	↑ -	↑ -	→ 0
Diffusionslänge	↑ -	↓ +	↑ -	→ 0
Wärmetransport	↑ +	↓ -	→ 0	→ 0
Mech. Stabilität	↑ +	↓ -	→ 0	→ 0

Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile, weshalb bei der Auswahl des Trägermaterials der Immobilisierung der Nutzen und der Aufwand für das jeweilige System und das jeweilige technische Ziel abgewogen werden muss. Beispielsweise sticht die Immobilisierung auf Partikeln aufgrund der Anzahl und der Größe der Partikel ($\mu\text{m} - \text{nm}$) und der damit verbundenen großen spezifischen Oberfläche heraus. Dadurch kann eine große Anzahl an Enzymen immobilisiert werden. Gleichzeitig erhöhen sich dadurch der

Durchströmungswiderstand und der Druckverlust. Da die Partikel und damit auch die Enzyme im gesamten Reaktorvolumen verteilt und überströmt sind, reduzieren sich die Diffusionswege der Komponenten. Gleichzeitig ist der Wärmetransport für diese Immobilisierungsmethode gering, da die Partikel in Punkt-kontakt stehen und somit die Wärmeübertragungsfläche sehr klein ist. Der Wärmetransport erfolgt hauptsächlich durch das strömende Medium, was eine schlechtere Wärmeleitfähigkeit aufweist. Letztlich werden die Partikel mechanisch im Reaktor gehalten. Das kann jedoch bei hohen Volumenströmen zum Austrag von Partikeln führen.

In dieser Arbeit wird eine Kombination aus der Immobilisierung auf der Reaktorwand und auf Partikeln untersucht, die eine hohe spezifische Oberfläche mit einem geringen Druckverlust vereint. Mit Hilfe von magnetischen Partikeln wird eine Partikelschicht am Boden des Reaktors gebildet, die überströmt wird (Burgahn et al. 2020; Peschke et al. 2017b). Dadurch wird eine verbesserte, mechanische Stabilität gewährleistet. Diese Form eines kontinuierlichen Reaktors mit immobilisierten Enzymen ist einzigartig und bislang wenig erforscht, weshalb die Auswirkungen auf die Diffusionswege und potenzielle Stofftransport-hemmungen für ein solches Reaktordesign noch unklar sind.

Für alle Methoden der Enzymimmobilisierung lassen sich mehrere Enzyme auf den Oberflächen halten. Bei der Immobilisierung mehrerer Enzyme auf einer Oberfläche ordnen sich die Enzyme zufällig an, da kein Einfluss auf die Immobilisierungsposition genommen werden kann. Für eine exakte Positionierung der Enzyme und Enzymabstände von wenigen nm kann eine molekulare Hilfsstruktur genutzt werden. Solche Hilfsstrukturen lassen sich wiederum auf Trägern immobilisieren, die die Applikation in einem kontinuierlichen Reaktor ermöglicht.

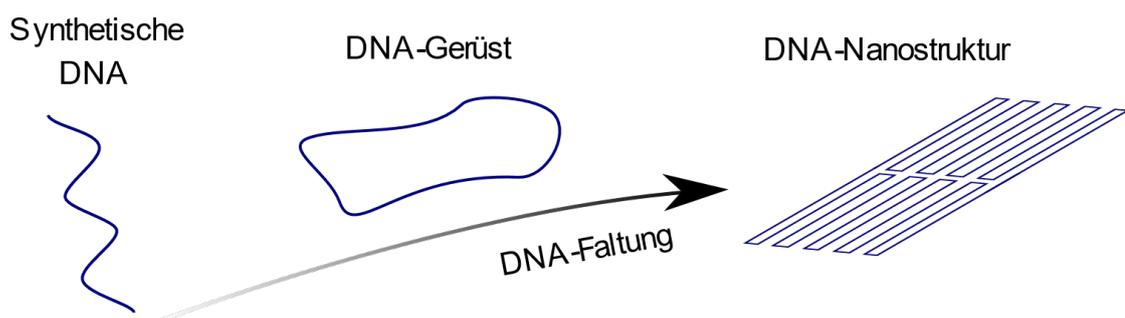


Abbildung 1.3 Prinzip der DNA-Nanotechnologie von der Synthese eines DNA-Strangs zur DNA-Nanostruktur

Mit Hilfe der sogenannten DNA-Nanotechnologie können maßgeschneiderte Strukturen aus Desoxyribonukleinsäuren (DNA, engl.: *deoxyribonucleic acid*) mit spezifischen Bindestellen für die Enzyme erstellt werden (Saccà und Niemeyer 2011). Bei dieser Technologie faltet sich ein chemisch und mechanisch robuster DNA-Strang, der sich selbständig mit Faltungssträngen (engl.: *staple strands*) zu einer dreidimensionalen Struktur verbindet. Angelehnt an die japanischen Faltekunst werden diese Strukturen „DNA-Origami Nanostrukturen“ (DON) genannt. Durch die maßgeschneiderte DNA-Sequenzierung können

unterschiedliche, geometrische Formen mit funktionellen Segmenten für die Enzymimmobilisierung gebildet werden. Mit Hilfe der DNA-Nanotechnologie lassen sich somit vorberechnete Enzymanordnungen erstellen und untersuchen.

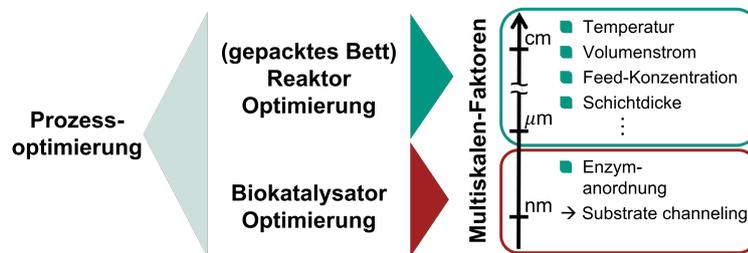


Abbildung 1.4 Optimierungsgrößen unterschiedlicher Größenordnungen, aufgeteilt in Optimierungen der Reaktordimensionen und des Biokatalysators. Die Faktoren der Optimierungen sind dargestellt.

Mit der DNA-Nanotechnologie werden die Optimierungsmöglichkeiten eines Reaktorsystem in einem kontinuierlichen Reaktor erweitert (Abbildung 1.4). Neben den herkömmlichen Optimierungsgrößen im Reaktormaßstab (zwischen μm und cm) wie z.B. der Geometrie der Partikel, des Kanals oder Feed-Zusammensetzung kommen Optimierungsmöglichkeiten auf der molekularen Ebene durch Enzymanordnungen hinzu.

Experimentell lassen sich DONs aufwändig realisieren und untersuchen (Burgahn et al. 2019). Diese Technologie ist noch sehr neu und mit sehr großem Aufwand und hohen Kosten verbunden. Somit stellen sich bei der Erforschung und Optimierung solcher Systeme große finanzielle und zeitliche Herausforderungen. Ein Ansatz, um den experimentellen Aufwand zu verringern und somit Zeit und Kosten zu sparen, ist die Verwendung von computergestützten Methoden (engl.: *computer-aided methods*). Mit Hilfe von Modellierung und Simulation lassen sich Experimente nachstellen bzw. vorhersagen. Die Simulationsergebnisse können Aufschluss über mögliche Prozessoptimierungen der Parameter geben (Szymkuć et al. 2016). Die computergestützten Methoden greifen auf Simulationen und Modellierungen des Prozesses zurück und müssen aufgrund unterschiedlicher Größenordnungen der Prozesse im System separat in Multiskalensimulationen betrachtet werden.

1.2 Multiskalensimulation von enzymatischen Reaktorsystemen

Die Simulation eines gesamten Systems ist rechentechnisch aufgrund der Größen- und Zeitordnung unmöglich. Um dennoch Effekte aus unterschiedlichen Größenordnungen zu untersuchen, werden mit Hilfe von Multiskalensimulationen einzelne Teilsysteme berechnet und miteinander verbunden. Die mobile bzw. strömende Phase ist für alle Teilsysteme gleich. Die zu berechnenden Teilsysteme lassen sich in drei

unterschiedliche Größenordnungen (vgl. Abbildung 1.5) aufteilen: makroskopische, mesoskopische und mikroskopische Größenordnung.

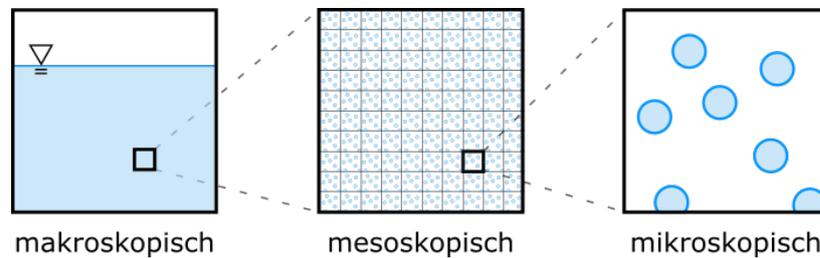


Abbildung 1.5 Unterschiedliche Größenordnungen der Modellierung von Flüssigkeiten

Die makroskopische Ebene befasst sich mit der Berechnung von Druck, Geschwindigkeiten und Reaktionen des gesamten Volumens. Druck und Geschwindigkeit des Kontinuums können über Erhaltungssätze für Masse und Impuls berechnet werden. Das Verhalten und der Zusammenhang zwischen Druck und Geschwindigkeit wird durch die Navier-Stokes-Gleichung beschrieben, die mit Finite-Elemente- (FEM) oder Finite-Volumen-Methoden (FVM) gelöst werden kann. Die Moleküle in den berechneten Volumina werden in der makroskopischen Modellierung mit durchschnittlichen Geschwindigkeiten und Orten dargestellt. Damit wird die mobile Phase als ein Kontinuum betrachtet. Mit der Navier-Stokes-Gleichung können neben den Geschwindigkeiten und dem Druck auch der diffusive Stoff- und Wärmetransport abgebildet werden. Der Umsatz einzelner Komponenten (gelöster Spezies im Kontinuum) kann über mathematische Modelle dargestellt werden. Formalkinetische, approximierte und mechanistische, mathematischen Gleichungen ermöglichen die Beschreibung enzymatischer Reaktionen, die auf den gebildeten Enzymkomplexen basieren. (Saa und Nielsen 2017; Bisswanger 2017) Bei Reaktionen mit mehreren Substraten können sich viele Komplexe bilden, die die nötige Anzahl an kinetischen Parametern für eine mathematische Modellierung der realen Reaktion erhöhen. Die approximierten Formulierungen reduzieren die Parameteranzahl drastisch und werden aus diesem Grund oft in der makroskopischen Modellierungen bevorzugt (Liebermeister und Klipp 2006). Die kinetischen Parameter der approximierten Formulierungen setzen sich aus den Geschwindigkeits- und Gleichgewichtsgrößen der Teilprozesse zusammen (Cleland 1963).

Eine exakte Betrachtung der Wechselwirkungen und Reaktionen zwischen den Molekülen in der mobilen Phase ermöglicht die mikroskopische Modellierung. Hierbei werden einzelne Reaktionsschritte (Quantenmechanik, QM) oder Assoziationsprozesse (Molekularmechanische Methoden, MM) beschrieben (Schlick 2010; Waring 2018). Die Simulation einzelner Moleküle und Wechselwirkungen zwischen Molekülen ist sehr rechenaufwendig. Deshalb werden in solchen Berechnungen nur kleine Volumina einer Flüssigkeit betrachtet. In der Berechnung von Enzymbildungsprozessen werden kristallografische Aufnahmen von Enzymen genutzt, die Informationen über deren Form und Wirkungsweisen beinhalten (Kendrew et al.

1958). Die kristallografischen Aufnahmen werden in digitale Kopien der Enzyme und Moleküle überführt. Über die letzten Jahrzehnte wurden unterschiedliche Softwareprogramme entwickelt, die die Berechnung von Molekül- und Atombewegungen basierend auf elektrostatischen und van-der-Waals Kräften ermöglichen (Pearson und Gross 1998; Huber und McCammon 2010; Spaar und Helms 2005; Roberts und Chang 2016). Die Softwareprogramme spezialisieren sich auf unterschiedliche Anwendungen. Die Modellierung von Assoziationsprozessen mit großen Fusionsenzymen (Rezeptor) kann mit der Brown'sche-Dynamik-Software „GeomBD“ der Arbeitsgruppe von Chang untersucht werden. Das Programm wurde speziell für die Untersuchung von Substratassoziation und -transfer zwischen Enzymen geschrieben. Dadurch lassen sich Molekülsysteme mit mehr als 50.000 Atomen berechnen. Speziell für die Untersuchung von Enzymen auf DONs und mögliche Effekte auf der molekularen Ebene ist GeomBD sehr interessant (Roberts und Chang 2016).

Den breiten Größenunterschied zwischen der makroskopischen und mikroskopischen Ebene überbrückt die sogenannte mesoskopische Ebene bzw. Modellierung. Sie verbindet die Physik auf molekularer Ebene mit einer makroskopischen Betrachtung des Systems. Ein Ansatz zur mesoskopischen Modellierung ist die Lattice-Boltzmann-Methode (LBM). Die zugrundeliegende Boltzmann-Gleichung modelliert eine mesoskopische Teilchendynamik in einem regulären Rechengitter. Basierend auf der Gaskinetik ist die Lösung der Boltzmann Gleichung mit LBM konsequent mit der Navier-Stokes Gleichung. Die Veränderungen von Teilchendichten resultieren in gemittelten Größen für Zeit, Ort und Geschwindigkeit. Die LBM ist eine der vielversprechendsten Alternativen zu den makroskopischen Methoden (Frisch et al. 1986), da sie eine effiziente Parallelisierung mit mehreren tausend Prozessorkernen ermöglicht (Wellein et al. 2006). Speziell Partikelbewegungen, kombiniert mit magnetischen Kräften können mit der LBM Software OpenLB (Krause et al. 2020) berechnet werden. Somit lassen sich Sedimentationsprozesse unter Berücksichtigung magnetischer Wechselwirkungen in einem System untersuchen.

Diese Simulationen ermöglichen die Beschreibung und Modellierung eines Enzymreaktors auf unterschiedlichen Ebenen. Das Reaktions- bzw. Reaktorsystem dieser Arbeit wird in Teilsysteme unterteilt, um chemische und physikalische Prozesse sowie das Reaktorverhalten zu berechnen.

1.3 Forschungsfrage

Die Verbindung der Simulationen in unterschiedlichen Größenordnungen ermöglicht die Betrachtung der Auswirkungen von Reaktorbedingungen, -geometrien und Parametern (makroskopisch). Durch die Berücksichtigung und Implementierung von Maßnahmen auf der molekularen Ebene wie z.B. die Anordnung von Enzymen einer Kaskade lassen sich mögliche Auswirkungen auf das Reaktorverhalten darstellen und untersuchen.

Die makroskopische Beschreibung der Einflüsse und Effekte aus verschiedenen Größenordnungen (Multiskalen) kann zur computergestützten Optimierung des Reaktor- bzw. Reaktionssystems genutzt werden. Die Multiskaleneffekte können sich unterschiedlich auf das Reaktorverhalten auswirken und gegenseitig beeinflussen, womit eine systematische Optimierung nahe liegt. Bei einer solchen Optimierung ist die Identifikation einflussreicher, experimentell umsetzbarer Parameter und die Wahl aussagekräftiger Zielgrößen eine große Herausforderung. Viele Arbeitsgruppen führen experimentelle Reaktoroptimierungen durch, die einen großen experimentellen Aufwand und Kosten zur Folge haben (Dall'Oglio et al. 2017). Dieser Aufwand kann durch die computergestützten Methoden und eine systematische Optimierung entscheidend reduziert werden.

Die Modellierung eines enzymatischen Reaktions- bzw. kontinuierlichen Reaktorsystems wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht. Weit verbreitet sind eindimensionale Beschreibungen eines Reaktors mit durchströmten Partikelbett (Hakala et al. 2020; Finnigan et al. 2020). Diese Modelle nutzen mechanistische Modelle zur Beschreibung der makroskopischen Reaktionen, können aber mögliche komplexere Konzentrationsverteilungen und -gradienten im Reaktor und mögliche Stoff- oder Reaktionslimitierungen nicht abbilden. Weitere Reaktormodelle beschreiben Flussreaktoren mit immobilisierten Enzymen auf der Wand, die mittels einer LBM berechnet werden (Strniša et al. 2018). Die geringe Anzahl der Arbeiten zur Modellierung von Reaktorsystemen für biokatalytische Synthesen zeigt, dass diese Modelle noch Potential zur Weiterentwicklung aufweisen. Dies gilt speziell für unbekannte, komplexe Reaktorsysteme, wie das in dieser Arbeit untersuchte, deren Verhalten mit eindimensionalen Modellen nicht zuverlässig abgebildet werden kann. Speziell im Fall der Reaktionslimitierung besteht in der Wissenschaft ein großer Bedarf für mehrdimensionale Modellierung.

Darüber hinaus ist die Verwendung von detaillierten Modellen zur Optimierung des Reaktorsystems noch sehr unüblich. Finnigan et al. haben sich dieses Vorhabens angenommen und optimierten das Enzymverhältnis zwischen den Aminierungsreaktions-Enzymen und den Cofaktor-Regenerations-Enzymen. Sie optimierten das Verhältnis hinsichtlich der Raumzeitausbeute und der Produktivität für eine Enzymkaskadenreaktion mit einem eindimensionalen Modell eines Reaktors mit durchströmtem Partikelbett (Finnigan et al. 2020). Diese Modelle und Optimierungsmaßnahmen befassen sich mit der Maximierung der Leistung, ohne den ökonomischen Aspekt zu berücksichtigen. Dieser ist jedoch mitentscheidend für die Umsetzung kontinuierlicher Bioreaktoren in der Industrie.

Die Reaktions- bzw. Reaktoroptimierung lässt sich in mehreren Ebenen darstellen (Abbildung 1.4). Die üblichen Reaktoroptimierungen betrachten die Dimensionen, Konzentrationen und Bedingungen auf einer makroskopischen Größenordnung. Die Kombination aus DNA-Nanotechnologie und der Fusion von Enzymen ermöglicht die Optimierung des Biokatalysators auf molekularer Ebene und zeigt schon im Experiment Vorteile durch „substrate channeling“ (Burgahn et al. 2019). Aufgrund der hohen Kosten der

Herstellung solcher Biokatalysatoren ist eine computergestützte Untersuchung unabdingbar. In diesem Feld positioniert sich die vorliegende Arbeit und formuliert folgende Forschungsfragen:

Welche (Multiskala-) Optimierungsmaßnahmen ermöglichen die Verbesserung eines kontinuierlichen Mikroreaktors mit immobilisierten Enzymkaskaden?

Wie gestaltet sich ein optimierter, konkurrenzfähiger kontinuierlicher Mikroreaktor mit immobilisierten Enzymkaskaden für die Industrie?

Der Bedarf an höherer Produktivität und der implizite Bedarf zur Skalierung von Prozessen verstärkt die Entwicklung von innovativen, grünen Technologien in der Biotechnologie (Tufvesson et al. 2010). Die Immobilisierung von Enzymen ermöglicht nachhaltige, kontinuierliche Prozesse (Sheldon 2007; Woodley 2006). Durch die Immobilisierung können das Reaktionsmedium und die Enzyme leicht getrennt und letztere direkt im Reaktor gehalten werden. Die damit möglichen kontinuierlichen Prozesse könnten als nachhaltige Alternative für herkömmliche Satzreaktoren dienen. Aufgrund hoher Kosten in der Immobilisierung der Enzyme müssen Kosten und Aufwand abgewogen werden, um zu klären ob die Immobilisierung auch ökonomisch konkurrenzfähig ist (Tufvesson et al. 2010).

1.4 Struktur der Arbeit

Die definierte Forschungsfrage wird in dieser Arbeit mittels Multiskalensimulation theoretisch untersucht. Das gesamte Reaktorsystem wurden in Teilsysteme abhängig von der abgebildeten Größenordnung aufgeteilt. Die Teilsysteme werden von der molekularen Ebene bis zur makroskopischen Ebene beschrieben (Abbildung 1.6). Dabei werden Größenbereiche von wenigen Nanometern bis zu Millimetern in Simulationen abgebildet. Die Betrachtungen und Simulationen sind bedingt miteinander verbunden. Im Kapitel 2 wird die Reaktionskinetik dargestellt und wie sich die Anordnung der eingesetzten Enzyme auf die Reaktionen und den Umsatz auswirken. Im Anschluss werden in Kapitel 3 die geometrischen Eigenschaften beschrieben. In Kombination mit Partikelsimulationen werden die charakteristische Partikelbetteigenschaften wie die Porosität und Partikelschichtdicke im Mikroreaktor ermittelt. Diese Eigenschaften dienen als Grundlage für die makroskopischen Reaktormodellierung (Kapitel 4) und die anschließende Reaktoroptimierung (Kapitel 5).

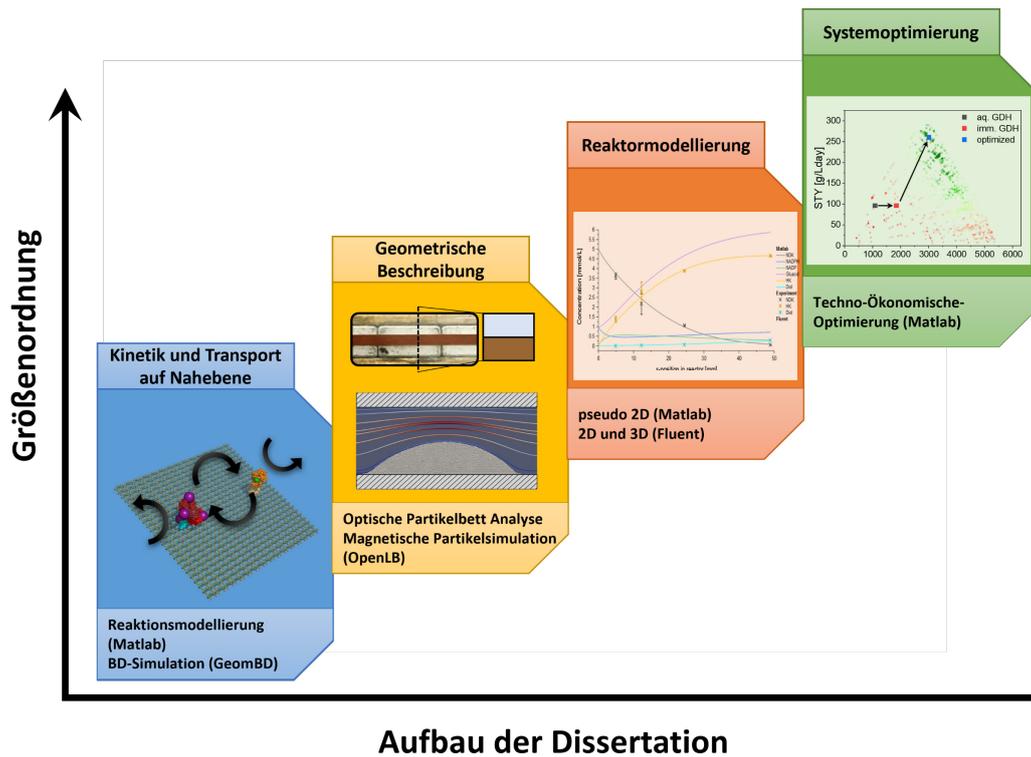


Abbildung 1.6 Unterschiedliche Teilsysteme des Gesamtsystems und die Struktur in dieser Arbeit. Die verwendeten Simulationsmethoden mit der entsprechenden Software sind unter dem beschreibenden Bild aufgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in enger Kooperation mit dem Institut für Biologische Grenzflächen von Prof. C. Niemeyer (IBG-1, Karlsruher Institut für Technologie) entstanden. Das IBG-1 stellte die experimentellen Daten für die Parameterbestimmung und die Flussreaktoruntersuchungen. Einen Überblick über diese Daten gibt Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2 Experimentelle Daten, die vom IBG-1 ermittelt und zur Verfügung gestellt wurden.

	Kapitel	Kommentar
Untersuchungen zur Bestimmung der intrinsischen kinetischen Parameter im Satzreaktor	2.3.3	Präparation, Durchführung und Auswertung von T. Burgahn (Burgahn et al. 2020)
Optische Partikelbettuntersuchung	3.4.2	Befüllen des Reaktors von T. Burgahn
Untersuchung der effektiven Kinetik im Flussreaktor	4.4.2	Präparation, Durchführung und Auswertung von T. Burgahn (Burgahn et al. 2020)
Untersuchung von Flussraten und Schichtdicken	4.5	Präparation, Durchführung und Auswertung von T. Burgahn (Burgahn et al. 2020)

2 Kinetik und Transport auf Nahebene

Dieses Kapitel gibt eine Einführung in das Reaktionssystem (Kapitel 2.1), die Enzymimmobilisierung (Kapitel 2.2) und die kinetischen Grundlagen enzymatisch katalysierter Reaktionen (Kapitel 2.3). Abschließend wird auf Optimierungsmaßnahmen des Biokatalysators eingegangen. Mit Hilfe von Molekularsimulationen werden Einflüsse von Nahordnungen auf das kinetische Verhalten des Reaktionssystems auf molekularer Ebene (Kapitel 2.4) erarbeitet.

2.1 Reaktionssystem

Beispielhaft für die Untersuchung der kinetischen Einflüsse von Enzymkaskaden in einem Flussreaktor wurde eine stereoselektive Reaktion von dem Modellsubstrat 5-Nitrononan-2,8-Dion (NDK) untersucht (Abbildung 2.1). Das NDK ist ein Diketon und wird in einer Redoxreaktion reduziert. Die beiden Ketogruppen des NDKs werden mit Hilfe einer Ketoreduktase (KRED) zu Hydroxygruppen reduziert. Bei der Reduktion der Ketogruppen können aufgrund der Bildung eines chiralen C-Atoms zwei unterschiedliche Stereoisomere entstehen. Die räumliche Orientierung der unterschiedlichen Stereoisomere wird mit „R“ bzw. „S“ bezeichnet. Die beiden Stereoisomere können unterschiedliche Auswirkungen auf Geruch, Geschmack und pharmazeutische Effekte haben (Schmiermund 2019). Bei der ersten Reduktion können somit bis zu vier unterschiedliche Hydroxyketone (HK) 2a-d entstehen. Die Reduktion der zweiten Ketogruppe resultiert in vier Diolen 3a-d.

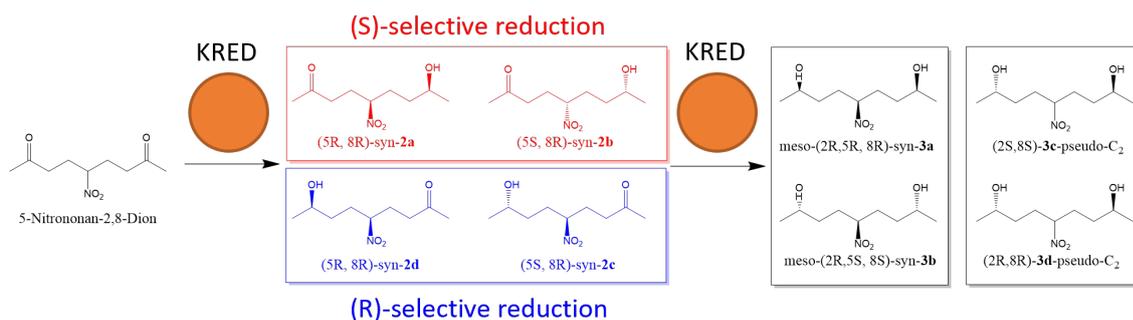


Abbildung 2.1 Zweistufige Reduktion von 5-Nitrononan-2,8-Dion (NDK) mit Ketoreduktasen und den möglichen stereoselektiven Zwischenprodukten bzw. Endprodukten. Abhängig von stereoselektiven Enzymen entstehen (R)- bzw. (S)-selektive Stoffe.

In dieser Arbeit wurde die Methylglyoxal Reduktase Gre2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Weitere Information in der bioinformatischen Datenbank für Proteine unter UniProt-Eintrag: Q12068 oder der EC-Nummer: EC 1.1.1.283) als KRED genutzt. Dabei dient Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Protonendonator und ist, damit der nötige Cofaktor für die Redoxreaktion. Gre2 ermöglicht

die Reaktion mit vielen unterschiedlichen Substraten (Müller et al. 2010) und katalysiert die Reduktion von Ketogruppen irreversibel und (S)-selektiv. Aufgrund der hohen Selektivität von 99:1 (2b:2a) der Gre2, bildet sich hauptsächlich das HK 2b ((5S,8S)-syn) (Peschke et al. 2017b). Im Weiteren wird die Produktion vom HK 2a ((5R-8R)-syn) vernachlässigt. Nach gleichem Prinzip bildet sich in der zweistufigen Reduktion mit Gre2 von NDK nur das Diol 3c ((2S,8S)-pseudo-C₂). Guo et al. untersuchten die Kristallstruktur und verweisen auf einen sequenziellen, geordneten Reaktionsmechanismus der Reduktion mit Gre2 (Guo et al. 2014). Eine genauere Beschreibung möglicher Mechanismen bei enzymatisch katalysierten Reaktionen ist in Kapitel 2.3.2 aufgeführt.

Um die Reduktion aufrechtzuerhalten, wird ein NADPH-Regenerationssystem genutzt. Durch die Oxidation von D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton (GluAcid) wird NADPH aus NADP⁺ regeneriert. Die Regeneration wird mit der homotetrameren Glucose 1-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* (GDH) (Weitere Information in der bioinformatischen Datenbank für Proteine unter UniProt-Eintrag: P12310 oder der EC-Nummer: EC 1.1.1.47) katalysiert. Die Verwendung eines NADPH-Regenerationssystems ist speziell bei einer ökonomischen Betrachtung essenziell. NADPH ist sehr teuer und durch die Verwendung von billiger Glucose kann NADP⁺ kostengünstig in-situ regeneriert werden (Sigma Aldrich 2020b, 2020c; Wang et al. 2017).

Die Umsetzung von NADP⁺ und Glucose unterliegt einem sequenziellen Reaktionsmechanismus, wobei keine exakte oder präferierte Reihenfolge der Komplexbildung bekannt ist (Kaswurm et al. 2013). Unter Verwendung von Gre2 und GDH-Enzymen ergibt sich ein Reaktionssystem wie in Abbildung 2.2, das in dieser Arbeit grundlegend untersucht wurde. Sowohl die Reduktionen und die Regeneration sind Redoxreaktionen. Im Weiteren wird die zweistufige Reduktion von NDK als Reduktion und die Umwandlung von NADP⁺ zu NADPH als Cofaktor-Regeneration bezeichnet.

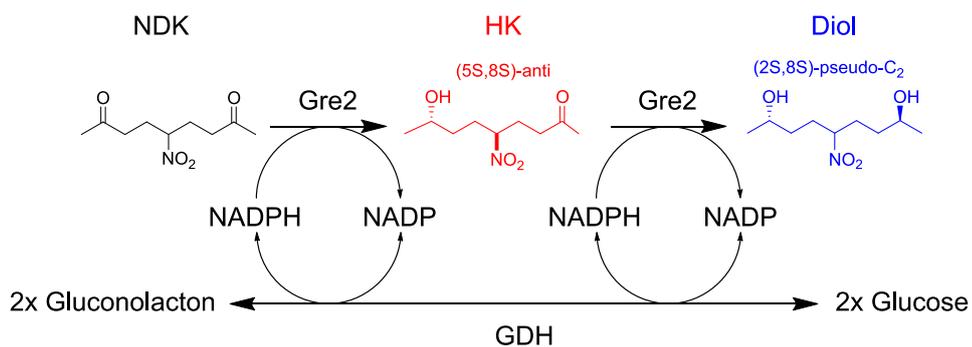


Abbildung 2.2 Reaktionsnetz zur stereoselektiven Reduktion von NDK mit Gre2 mit NADPH (Cofaktor) Regeneration mit GDH.

2.2 Enzymimmobilisierung

In der Synthese von organischen Produkten besteht die Katalyse mit Enzymen durch eine hohe Selektivität und den Betrieb bei milden Prozessbedingungen (pH-Wert, Temperatur und Druck) (Sheldon und Brady 2018). Insbesondere bei der Herstellung von wertvollen Produkten in geringem Reaktionsvolumen wie beispielsweise pharmazeutischen Wirkstoffen findet die Enzymkatalyse häufig Anwendung (Woodley 2019). In der Forschung und Entwicklung von Prozessen und deren technologischer Umsetzung ist die Nachhaltigkeit von großer Bedeutung (Dunn et al. 2010). Solche grünen Technologien (eng.: *green technologies*) können das Anwendungsgebiet der kontinuierlichen biotechnologischen Prozesse erweitern.

Die Immobilisierung von Enzymen bezeichnet das Binden von sonst frei diffundierenden Enzymen auf einem Träger als Enzymaggregate oder als Einschluss. Die Immobilisierung basiert auf drei unterschiedlichen Methoden: Physisorption, ionische/kovalente Bindungen oder das Einschließen in Kanälen oder mesoporösen Strukturen (Hartmann und Jung 2010; Saccà und Niemeyer 2011). Die Immobilisierung geht in den meisten Fällen mit einer Verringerung der Aktivität und einer Konformationsänderung des Enzyms einher. Jedoch ermöglicht sie u.a. (Burgahn et al. 2019): i) das Halten von Enzymen in einem Flussreaktor mit lokaler erhöhter Enzymkonzentration; ii) eine Erstellung von Nahordnungen von Enzymkaskaden auf DONs mit Enzymabständen von wenigen Nanometern.

Die Immobilisierung auf Trägern wird in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Enzyme auf magnetischen Partikeln zu binden und diese dann stationär in einem Flussreaktor zu halten. Außerdem ermöglichen Immobilisierungsmethoden eine ortsselektive Positionierung auf quadratischen, planaren DONs. Dafür werden die Proteine gentechnisch modifiziert und mit Immobilisierung-Tags verbunden. Immobilisierung-Tags verbinden sich automatisch mit einem entsprechenden Gegenpart auf einem Träger oder einer Molekülstruktur. Unter der Verwendung unterschiedlicher Immobilisierung-Tags können somit die Proteine auf unterschiedlichen Partikeln oder an unterschiedlichen Positionen auf DONs gebunden werden.

In dieser Arbeit werden sowohl Halo- bzw. HOB-Tags als auch Snap-Tags zur Immobilisierung auf den Partikeln bzw. den DONs genutzt. Ein reduzierter Überblick über die Immobilisierung der Enzyme auf DONs ist im Anhang A1 dargestellt. Er beinhaltet eine Beschreibung des Komplexes der Enzyme Gre2 und GDH mit ihren entsprechenden Binde-Tags und deren Bindereaktion mit dem Gegenpart.

Im Folgenden werden die Annotation der Komplexe aus Enzym und Binde-Tag wie folgt verwendet: Gre2-HOB und GDH(ST). Der Bindestrich bezieht sich auf die Fusionierung am N- bzw. C-Terminus und die Fusionierung durch Bindung an einer internen Aminosäure ist mit Klammern gekennzeichnet.

Die genaue Kultivierung, die Erstellung der Fusionsenzyme und die detaillierte Immobilisierung wurden von T. Burgahn durchgeführt und dokumentiert (Burgahn 2019).

2.2.1 Enzymkaskaden auf DNA-Origami-Nanostrukturen (DONs)

Die Immobilisierung von Enzymkaskaden auf einem Träger ermöglicht eine Anordnung der Enzyme angelehnt an der natürlichen Kompartimentierung in Zellen (Good et al. 2011; Rabe et al. 2017). Abhängig vom gewählten Träger kann auf die Abstände, Anordnungen und Stöchiometrie verschiedener Enzyme einer Kaskade Einfluss genommen werden. Die Träger beinhalten unterschiedliche Materialien, die von funktionalisierten Oberflächen (z.B. Glas (Carvalho et al. 2017), Polymer (Stojkovič und Žnidaršič-Plazl 2012) oder Partikeln (Contente et al. 2017; Burgahn et al. 2020)) zu Hydrogelen (Peschke et al. 2018) oder DNA-Nanostrukturen (Burgahn et al. 2019; Burgahn 2019; Schröder et al. 2009; Saccà et al. 2010) reichen. Die Enzymimmobilisierung auf funktionalisierten Oberflächen und in Hydrogelen erlaubt ein Einbinden der Kaskaden in ein Reaktorsystem. Da die Bindestellen auf den Oberflächen und in den Hydrogelen zufällig verteilt sind, kann bei diesen Methoden keine bestimmte Anordnung der Enzyme realisiert werden. Eine Anordnung auf molekularer Ebene gelingt mit molekularen Trägerstrukturen aus DNA-Strängen, die Enzymabstände in der Größenordnung von Nanometern ermöglicht (Saccà und Niemeyer 2012). Durch die Nähe der Enzyme verringern sich die Diffusionswege von Stoffen, die bei mehreren Reaktionen und Enzymen beteiligt sind (Intermediate), was zu erhöhten Umsatzraten führen kann. Durch die negative Ladung der DNA-Strängen können die diffundierenden Moleküle an der DON gehalten werden, sodass die Assoziationswahrscheinlichkeit an einem benachbarten Enzym erhöht wird (Chen et al. 2018; Yang et al. 2018). Dieser Effekt wird oft als „substrate channeling“ bezeichnet.

Im Folgenden wird ein kompakter Überblick über Aufbau, Herstellung von DONs und Immobilisierung von Gre2 und GDH auf DONs gegeben. Die Herstellung und Untersuchung von DNA-Nanostrukturen geht zurück auf die bahnbrechende Idee von Seeman, der DNA als Grundmaterial für geometrische Strukturen auf Nanometer-Skala definierte (Seeman 1982). Die darauf aufbauenden Forschungen im Bereich der strukturellen Nanotechnologie ermöglichten die Herstellung und Untersuchung unterschiedlicher, selbstorganisierter Nanostrukturen (Seeman 2005; Rothmund 2006; Mei et al. 2011). Die Spezifität der Watson-Crick-Basenpaarungen (Watson und Crick 1953) in der DNA wird bei der Erstellung der Nanostrukturen genutzt, um maßgeschneiderte, vorhersehbare, dreidimensionale Strukturen zu bilden. Eine DNA-Doppelhelix ist eine schraubenförmige Struktur, die aus zwei Strängen der Desoxyribonukleinsäure besteht (DNA-Stränge). Die DNA besteht aus einem Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat und einer heterozyklischen Base (Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin) (siehe Abbildung 2.3).

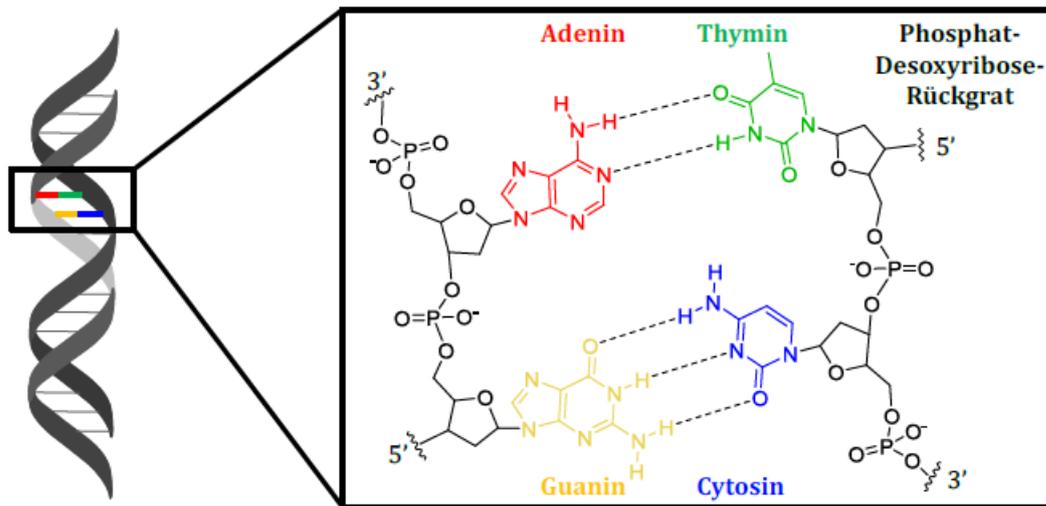


Abbildung 2.3 Aufbau einer DNA-Helix und Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der einzelnen DNA (Burgahn 2019).

Die DNA-Polymerase ermöglicht die Herstellung beliebig langer Stränge durch Verkettung an der 5' und 3'-Position der Desoxyribose. Ein Strukturelement setzt sich somit aus einer Sequenz (3'-5') zusammen. Bei der Bildung der Helix Struktur bilden sich Basenpaare (Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin), die über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Die Helix Struktur wird durch π - π -Wechselwirkungen zwischen den Basenpaaren (Basenstapelung; engl.: *base stacking*) stabilisiert, sodass sie physikalisch und chemisch robust werden. Somit lassen sich stabile, langkettige DNA-Doppelhelix-Moleküle herstellen. Durch eine Modifizierung einzelner Strukturelemente wird die Vernetzung von zwei Strängen oder die Erstellung einer spezifischen Bindestelle mit Binde-Tag ermöglicht. Mit Hilfe von Gerüststrängen und entsprechenden Oligonukleotiden (kurzen Klammersträngen) setzen sich lange, vorentworfene, ringförmige DNA-Stränge zu einem geometrischen Gerüst automatisch zusammen (Saccà et al. 2015) (vgl. Abbildung 2.4). Dieser Vorgang wird bei erhöhten Temperaturen (ca. 90°C) durchgeführt, da sich hierbei die Komplexe aufgrund höherer Diffusions- und Reaktionsraten schneller bilden (Sobczak et al. 2012).

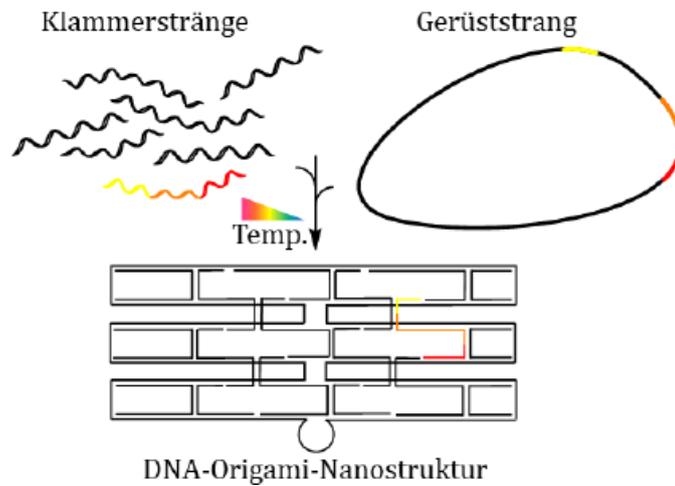


Abbildung 2.4 Herstellung von DNA-Origami Nanostrukturen mit Gerüst- und Klammersträngen. Die Nanostruktur setzt sich bei erhöhter Temperatur von selbst zusammen (Burgahn 2019).

Durch die Vernetzung wird der DNA-Strang automatisch gefaltet. Dieser Prozess wird durch eine Erhöhung der Temperatur beschleunigt, da dieser Prozess diffusionsabhängig ist und sehr lange dauert. Angelehnt an die japanische Faltkunst Origami und der Größe der Struktur wird sie als „DNA-Origami-Nanostruktur“ (DON) bezeichnet (Rothemund 2006). Dadurch können zwei- und dreidimensionale Strukturen erstellt werden. Die einzelnen Strukturelemente lassen sich modifizieren, sodass Proteine an vordefinierten Positionen gebunden werden können. Dies ermöglichte die Anwendung von DONs in der Biosensorik (Niemeyer 2010) und in der Erstellung großer Enzymkomplexe (Ye et al. 2018). Speziell in der Biotechnologie ist der Einsatz von Enzymkaskaden auf DONs sehr interessant, da durch die räumliche Anordnung der Enzyme weitere Einflüsse auf den Biokatalysator ausgeübt werden können. Des Weiteren kann diese Technologie genutzt werden, um Prozesse in Zellen nachzustellen und deren Funktionsweise zu verstehen (Rajendran et al. 2017). Die Faltung des DNA-Strangs zu einer Platte ermöglichen eine systematische Untersuchung von unterschiedlichen Anordnungen von Enzymkaskaden. Durch die Anpassung von Abstand, Immobilisierungsmethode und Enzymverhältnis lassen sich Optimierungsmaßnahmen für katalytische Komplexe untersuchen. Abhängig vom biokatalytischen System können hierbei stöchiometrisch bevorzugte Enzymverhältnisse sowie Produktselektivitäten ermittelt werden und Limitierungen durch Engpässe bzw. Mangel von (Co-)Substraten überwunden werden.

T. Burgahn untersuchte in ihrer Arbeit unterschiedliche Abstände zwischen einer KRED (Gre2 und LbADH) und einem Regenerationsenzym (GDH und ICDH) in Experimenten und zeigte eine Aktivitätserhöhung bei geringeren Abständen. Darüber hinaus verbessert eine Erhöhung des Verhältnisses von GDH zu Gre2 die Reduktionsgeschwindigkeit (Burgahn et al. 2019). Die Ergebnisse aus der Arbeit von T. Burgahn werden in dieser Arbeit als Grundlage für die theoretische Untersuchung der Enzymkaskaden auf DONs genutzt und diese mit einer molekularmechanischen Simulationsmethode untersucht und verglichen. Dafür werden in

einem ersten Schritt die DON und die entsprechenden Fusionsenzyme erstellt (Kapitel 2.4.5). Um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, werden in dieser Arbeit die Gre2-HOB und GDH(ST)-SC auf einer planaren DON untersucht. Gre2-HOB wird an einem CH-modifizierten Oligonukleotid auf der DON gebunden. Die Immobilisierung von GDH mit der ST/SC-Methode auf DONs ist im Vergleich zu anderen Regenerationsenzymen schwerer umzusetzen, wird in dieser Arbeit aber als gegeben angenommen. Nach der Erstellung wurde mit der Software GeomBD die direkte Assoziationsrate von NADPH von der GDH zur Gre2 untersucht (Kapitel 2.4.6). Aufgrund der Vereinfachungen der Molekülmechanik bzw. der verwendeten Simulationsmethode (Kapitel 2.4.10) werden nur Tendenzen und grobe Auswirkungen der untersuchten Fälle dargestellt.

2.3 Enzymatisch katalysierte Reaktionen

Eine enzymatisch katalysierte Reaktion basiert auf Komplexbildungsprozessen und der biochemischen Reaktion (Cornish-Bowden 2012). Das in dieser Arbeit untersuchte Reaktionssystem beinhaltet die Umsetzungen von mehreren Substanzen in einer Reaktion. Eine Reaktion mit zwei Edukten (A, B) und zwei Produkten (P, Q) mit dem Enzym E wird als *bi-bi*-Reaktion bezeichnet und kann mit dem allgemeinen Reaktionsschema aus Gleichung 2.1 dargestellt werden.



Der eigentlichen biochemische Reaktion vorgelagert sind dabei Assoziations- und Dissoziationsprozesse der beteiligten Spezies.

Der Assoziationsprozess beschreibt den Vorgang der Komplexbildung eines Moleküls mit dem entsprechenden Rezeptor bzw. Enzym. Eine beispielhafte Reaktionsgleichung ist in Gleichung 2.2 dargestellt:



Bei der Assoziation diffundiert ein Substratmolekül A aus dem Bulk der Lösung zur Bindetasche des Enzyms und wird dort entweder kovalent oder durch elektrostatische Kräfte gehalten. Die dreidimensionale Struktur des Enzyms beeinflusst die Assoziation durch Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Substrat. Nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip können nur spezifische Substrate oder funktionelle Gruppen einen Komplex mit dem Enzym bilden, wodurch die hohe Selektivität von Enzymen erreicht wird (Cornish-Bowden 2012). Das Verhältnis der Assoziation- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ist in der Assoziationskonstante $K_M^A = \frac{k_{-1}}{k_1}$ definiert, die in der Literatur auch als Michaelis-Menten Konstante bezeichnet wird. Die Assoziation ist abhängig von der Form, der Partialladungen der Atome von Substrat und Enzym sowie der Diffusionsgeschwindigkeit des Substrats und der lokalen Substratkonzentration. Die

Dissoziation ist nicht abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit. Nach den letzten Punkten lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit D_A des Substrats A und der Assoziationsrate bzw. der Assoziationskonstante bilden (Gl.2.3) (Bisswanger 2017):

$$k_1 = f(D_A) \Rightarrow K_M^A = f\left(\frac{1}{D_A}\right) \quad 2.3$$

Neben der Assoziationsgeschwindigkeit beeinflusst die Reihenfolge der Assoziationen die allgemeine Reaktion. Bei Reaktionen mit mehreren Substraten ist die Reihenfolge von großer Bedeutung. Eine übliche Form der Darstellung der Reihenfolge und der möglichen Komplexe während der Reaktion wurde von W.W. Cleland gegeben (Cleland 1963). Die Komplexbildungsreihenfolgen sind enzymspezifisch und werden als Mechanismen bezeichnet. Sie unterteilen sich in sequenzielle und Ping-Pong Mechanismen (Chmiel 2011). Die sequenziellen Mechanismen werden in geordnete und zufällig ablaufende Komplexbildungen und den Theorell-Chance Mechanismus als Spezialfall unterteilt. In Abbildung 2.5 sind die drei unterschiedlichen Mechanismen als so genanntes Cleland-Diagramm dargestellt.

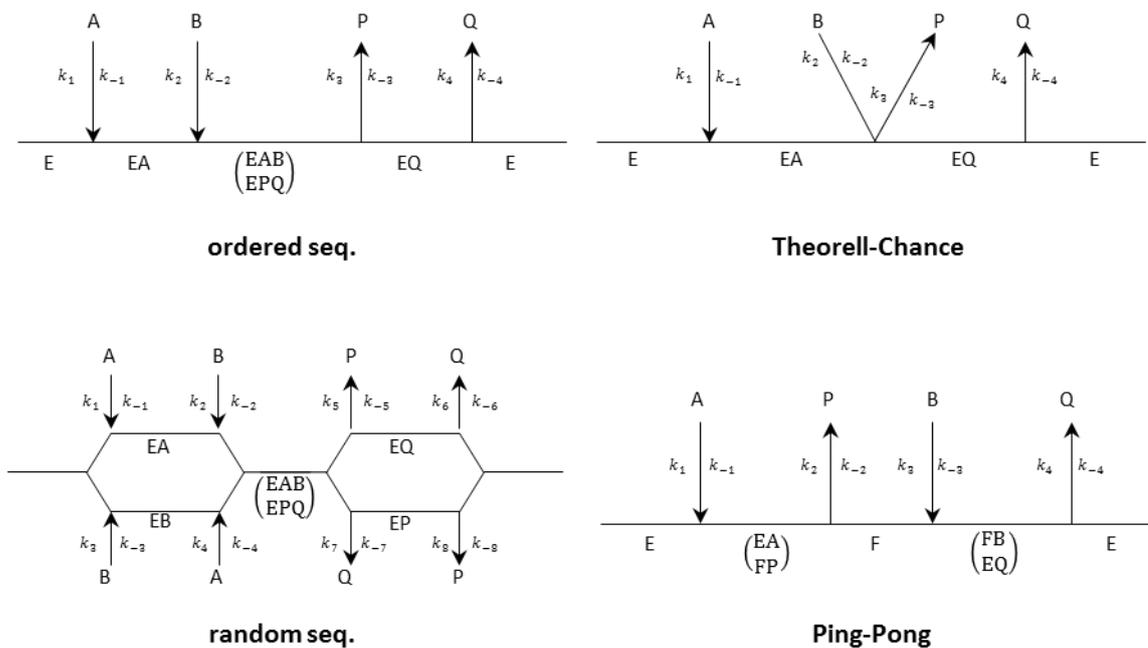


Abbildung 2.5 Reaktionsmechanismen in Cleland Nomenklatur für einen sequenziell geordneten, sequenziell zufälligen, Theorell Chance und Ping-Pong Mechanismus (nach Cleland (Cleland 1963)).

Für die Umsetzung der sequenziellen Mechanismen müssen vor der Reaktion beide Substrate zuerst einen Komplex mit dem Enzym formen. Die Substrate können in einer festen Reihenfolge assoziiert werden, damit ein geordneter Reaktionsmechanismus entsteht. Bei dem zufälligen Mechanismus ist die Assoziationsreihenfolge nicht gerichtet. Gleiches gilt für die Dissoziation der Produkte. Der Theorell-Chance-Mechanismus ist ein Sonderfall des geordneten, sequenziellen Mechanismus, wenn die Assoziationen des

Cofaktors und die Dissoziationen des Produktes P sehr schnell ablaufen und somit vernachlässigt werden können.

Bei dem Ping-Pong Mechanismus ist kein Gesamtkomplex (EAB) nötig. Die Substrate werden unabhängig voneinander in Teilreaktionen umgesetzt und die transferierten Elemente werden in einem Enzymübergangszustand (F) gehalten. Der Enzymzyklus wird nach der Reaktion des Übergangszustands mit dem zweiten Substrat abgeschlossen.

2.3.1 Inhibierung und Aktivierung

Enzymatische Reaktionen sind häufig durch Wechselwirkungen des Enzyms mit anderen Substanzen beeinflusst. So können bestimmte Substanzen hemmende (Inhibitoren) oder verstärkende (Aktivatoren) Effekte auf die Assoziationen und somit die Reaktion haben. Die Aktivierung kann mit einer Aktivierungskonstante K_A^i bzw. die Inhibierung mit der Inhibierungskonstante K_I^i für eine Komponente i angegeben werden. Man unterscheidet vier typische Fälle (Abbildung 2.6): normale Assoziation, kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibierung.

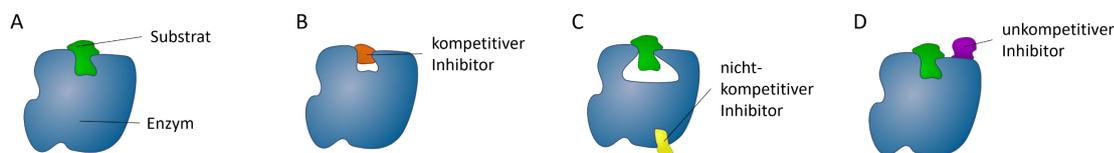


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung unterschiedlicher Inhibierungstypen. A: normale Assoziation eines Substrats an einem Enzym; B: kompetitive Inhibierung; C: nicht-kompetitive Inhibierung; D: unkompetitive Inhibierung. Design nach Bisswanger (Bisswanger 2017).

Kompetitive Inhibitoren können in der gleichen Bindetasche des Substrats binden und vermindern somit den Umsatz. Kompetitive Inhibitoren sind meist ähnlicher Struktur wie das Substrat.

Die nicht-kompetitive Inhibierung ermöglicht ein Binden des Inhibitors am Enzym und Enzym-Substrat-Komplex. Bei der nicht-kompetitiven Inhibierung wird die biochemische Reaktion verhindert, solange der Inhibitor an das Enzym gebunden ist.

Unkompetitive Inhibierung beschreibt eine Hemmung durch das Bilden eines nicht reaktiven Komplexes aus dem Enzym-Substrat Komplexes und dem Inhibitor. Die unkompetitive Inhibierung tritt häufig bei sehr hohen Substratkonzentrationen auf (Chmiel 2011).

Die Beschleunigung von Assoziationsraten und biochemischen Reaktionen kann durch sogenannte Aktivatoren erzielt werden. Die Aktivatoren verändern bei der Bindung an das Enzym dessen Konformation und beschleunigen somit die allgemeine Reaktion.

2.3.2 Mathematische Beschreibung

Die mathematische Formulierung von biochemischen, katalysierten Reaktionen wird im Allgemeinen durch nicht-lineare Reaktionsraten beschrieben. Im Laufe der letzten Jahrzehnte haben sich unterschiedliche mathematische Beschreibungen von biochemischen Reaktionen entwickelt. Sie teilen sich in drei Kategorien ein: formal kinetische, mechanistische, und approximierte mathematische Formulierungen. Formal kinetische Formulierungen (engl.: *canonical*) werden mit einer exponentiellen ($f(x) = x^k$) oder log-linearen ($f(x) = \log(x)$) Gleichung beschrieben.

Mechanistische Beschreibungen beziehen sich auf den exakten Mechanismus, welcher der enzymatischen Reaktion zugrunde liegt. Dabei werden alle Elementarreaktionen berücksichtigt und beschrieben. Für jeden möglichen Komplex müssen zwei Geschwindigkeitskonstanten (Assoziation und Dissoziation) bestimmt werden (vgl. Kapitel 2.3). Darüber hinaus werden noch die Reaktionsgeschwindigkeiten des eigentlichen biochemischen Umsatzes benötigt. Bei größeren Reaktionsnetzen werden somit viele kinetische Parameter benötigt, was den experimentellen Aufwand erhöht.

Die approximierte Formulierung von Reaktionsraten basiert auf den Elementarreaktionen. Durch modell-spezifische Annahmen leiten sich vereinfachte mathematische Formulierungen mit einer reduzierten Anzahl an kinetischen Parametern her. Die Parameter vereinen Substrat-bezogene, elementare kinetische Konstanten und stellen Komplexbildungsprozesse dar (z.B. Assoziationskonstanten K_M , Inhibierungskonstante K_I oder Aktivierungskonstante K_A) (Cleland 1963). Die berühmteste approximierte Enzymkinetik wurde 1955 von Michaelis und Menten vorgestellt (Michaelis und Menten 1913):

$$v = \frac{V_{max} \cdot c_A}{K_M^A + c_A} \quad 2.4$$

Mit den Annahmen, dass ein Überschuss an Cosubstraten und geringe Enzymkonzentrationen vorliegen können die meisten Reaktionen mit der Michaelis-Menten Kinetik hinreichend genau beschrieben werden. In Systemen, die diese Annahmen nicht mehr erfüllen, muss eine andere Kinetik genutzt werden. Innerhalb der letzten Jahre wurden viele unterschiedlichen Beschreibungen für enzymkatalysierte Reaktionen entwickelt, die über die Grenzen der Michaelis-Menten Kinetik reichen. Die approximierte Formulierung von Enzymreaktionen ist aufgrund einer reduzierten Zahl von Reaktionsparametern und einer standardisierten Reaktionskinetik für die Modellierung sehr attraktiv. Speziell in großen Reaktionsnetzen wird das biologische System dadurch ressourceneffizient dargestellt (Saa und Nielsen 2017).

1.1.1.1 Modulare Kinetik

Ein Ansatz für eine approximierte Reaktionskinetik ist die modulare Kinetik von Liebermeister (Liebermeister et al. 2010). Diese basiert auf der Idee einer allgemeinen Gleichung zur Beschreibung enzymatisch katalysierter Reaktionen, die abhängig vom untersuchten Reaktionssystem leicht anzupassen ist.

Liebermeister et al. formulierten für einen zufälligen, sequenziellen Reaktionsmechanismus eine allgemeine, mathematische Beschreibung zur Reduktion der Anzahl an Reaktionsparametern und thermodynamisch konsistenten Parametern (Liebermeister et al. 2010). Unter der Annahme, dass die Assoziationsprozesse viel schneller als die Dissoziationsprozesse sind („rapid equilibrium“) und dass die Bindungsenergien der Komponenten nicht voneinander abhängig sind, leiten Liebermeister et al. die allgemeine Gleichung 2.5 her. Die Reaktionsrate ist hiernach abhängig von der Enzymkonzentration c_E , einem Regulierungsfaktor f_r , dem allgemeinen Zähler T_r und einem spezifischen Nenner D_r für einen zu wählenden Mechanismus (Tabelle 2.3) mit Regulierungsterm D_r^{reg} (Gl. 2.7). Der Zähler T_r (Gl. 2.6) beschreibt die Hin- und Rückreaktion mit einer Reaktionsordnung entsprechend dem Stöchiometriefaktor m_{ri}^\pm , bezogen auf die Assoziationskonstanten K_M^i . Die Stöchiometriefaktoren m_{ri}^\pm für Produkte sind positiv, für Edukte negativ. Mit Hilfe eines Regulierungsterms D_r^{reg} können Inhibierung (K_I^i) oder Aktivierung (K_A^i) durch eine Komponente i berücksichtigt werden. Diese werden als Erweiterung des Nenners (Gl. 2.7) implementiert. Ohne Inhibierung oder Aktivierung ist D_r^{reg} null.

$$v_r = c_E f_r \frac{T_r}{D_r + D_r^{reg}} \quad 2.5$$

$$T_r = k_r^+ \prod_i \left(\frac{c_i}{K_M^i} \right)^{m_{ri}^+} - k_r^- \prod_i \left(\frac{c_i}{K_M^i} \right)^{m_{ri}^-} \quad 2.6$$

$$D_r^{reg} = \sum_i \left(\frac{K_A^i}{c_i} \right) + \sum_i \left(\frac{c_i}{K_I^i} \right) \quad 2.7$$

Mit:

f_r : Regulierungsfaktor (Verstärkung, Dämpfung, nicht kompetitive Inhibierung)

D_r : Von Mechanismus abhängiger Nenner (Tabelle 2.3)

D_r^{reg} : Mechanistischer Regulierungsfaktor (Kompetitive Inhibierung und Aktivierung)

m_{ri}^\pm : Stöchiometriefaktor

Der Nenner in Gleichung 2.5 wird abhängig vom Mechanismus bzw. bei der Formulierung von Liebermeister et al. abhängig von dem mathematischen Modell angepasst. Liebermeister definiert unterschiedliche Nenner, die in Tabelle 2.3 aufgelistet sind. Die Liste wurde in dieser Arbeit mit entsprechenden Formulierungen für einen geordneten und Ping-Pong-Mechanismus nach Cleland (Gl. 2.13 und 2.14) erweitert (Cleland 1963). Das Zeitgesetz „common modular“ (CM) ist eine generalisierte Form der Michaelis Menten Gleichung und bezieht sich auf einen „zufällig geordnet“ (engl.: *random ordered*) genannten Mechanismus. In Bezug auf die Reaktionsschritte bedeutet „zufällig“, dass die Reihenfolge, in der sich Enzym-Substrat-Komplexe bilden, nicht vorgeschrieben ist.

Das zweite Zeitgesetz „direct binding modular“ (DM) enthält im Vergleich zum Ersten nur die Substrat- und Produktterme mit der höchsten Ordnung. Dadurch kann man die K_M^i Werte der Substrate zu einem

Parameter zusammenfassen. Das bedeutet, dass bei gleichen Werten der kinetischen Parameter die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Nutzung von DM höher ist.

Im Gegensatz dazu steht das „simultaneous binding modular“ (SM), das zusätzliche Terme im Nenner beinhaltet, die eine langsamere Kinetik zur Folge haben. Als viertes Zeitgesetz wurde das „power-law modular“ (PM) beschrieben, das als einfachstes Modell nur aus einer Potenzgleichung besteht.

Die letzte Formulierung ist als „force-dependent modular“ (FM) bekannt und ist im Gegensatz zu den anderen Modellen nicht biochemisch plausibel, da der Nenner null werden kann und die Reaktionsgeschwindigkeit damit unendlich groß wird. Die direkte Beziehung zwischen Affinitäten und Reaktionsgeschwindigkeit lässt die FM zu einer guten Approximation in der Nähe des Gleichgewichts bei stationären Bedingungen werden.

Tabelle 2.3 Unterschiedliche Mechanismusterme D_r der Reaktion r für unterschiedliche Zeitgesetze. CM, DM, SM und FM sind von Liebermeister et al. definiert (Liebermeister et al. 2010). Die Terme für einen geordneten sequenziellen und Ping-Pong Mechanismus wurden hinzugefügt.

Modell	Mechanismus Term D_r	Gl.
CM (zufällig seq.)	$D_r = \left(1 + \frac{c_A}{K_M^A}\right) \left(1 + \frac{c_B}{K_M^B}\right) + \left(1 + \frac{c_P}{K_M^P}\right) \left(1 + \frac{c_Q}{K_M^Q}\right) - 1$	2.8
DM	$D_r = 1 + \frac{c_A}{K_M^A} \frac{c_B}{K_M^B} + \frac{c_P}{K_M^P} \frac{c_Q}{K_M^Q}$	2.9
SM	$D_r = \left(1 + \frac{c_A}{K_M^A}\right) \left(1 + \frac{c_B}{K_M^B}\right) \left(1 + \frac{c_P}{K_M^P}\right) \left(1 + \frac{c_Q}{K_M^Q}\right)$	2.10
PM	$D_r = 1$	2.11
FM	$D_r = \sqrt{\frac{c_A}{K_M^A} \frac{c_B}{K_M^B} \frac{c_P}{K_M^P} \frac{c_Q}{K_M^Q}}$	2.12
Geordnet seq.	$D_r = \left(1 + \frac{c_A}{K_M^A}\right) \left(1 + \frac{c_B}{K_M^B}\right) + \left(1 + \frac{c_P}{K_M^P}\right) \left(1 + \frac{c_Q}{K_M^Q}\right) + \frac{c_A}{K_M^A} \frac{c_P}{K_M^P} + \frac{c_B}{K_M^B} \frac{c_Q}{K_M^Q} + \frac{c_A}{K_M^A} \frac{c_B}{K_M^B} \frac{c_P}{K_M^P} + \frac{c_B}{K_M^B} \frac{c_P}{K_M^P} \frac{c_Q}{K_M^Q} - 2$	2.13
Ping-Pong	$D_r = \left(1 + \frac{c_A}{K_M^A}\right) \left(1 + \frac{c_B}{K_M^B}\right) + \left(1 + \frac{c_P}{K_M^P}\right) \left(1 + \frac{c_Q}{K_M^Q}\right) + \frac{c_A}{K_M^A} \frac{c_P}{K_M^P} + \frac{c_B}{K_M^B} \frac{c_Q}{K_M^Q} - 2$	2.14

Um die thermodynamische Konsistenz zu gewährleisten, können die Haldane-Beziehung (Gl. 2.15) (Briggs und Haldane 1925) und das Wegscheider-Kriterium (Schuster und Schuster 1989) berücksichtigt werden.

Die Haldane-Beziehung setzt die Geschwindigkeitskonstanten K_{eq} der Hin- und Rückreaktion mit den Assoziationskonstanten in Verbindung (Chmiel 2011). Die Gleichgewichtskonstante lässt sich durch das Konzentrationsverhältnis der Produkte und Edukte in einem Gleichgewichtszustand einfach berechnen. Durch diese Bedingung kann eine der kinetischen Konstanten durch die Kombination anderer ermittelt werden. Die thermodynamische Triebkraft A_r der Reaktion wird mit der Differenz des chemischen Potentials von Edukten und Produkten μ beschrieben (Gl. 2.18). Mit der Gleichung für das chemische Potential kann eine allgemeingültige Reaktionskinetik hergeleitet werden (Gl. 2.19). Diese stimmt exakt mit dem Modell von Ederer und Gilles überein, dem „thermodynamic-kinetic modelling“ (TKM) (Ederer und Gilles 2007). Sie formulierten diese Gleichung, inspiriert durch Formulierungen aus der Elektrotechnik. Die Reaktionsrate nach Gleichung 2.19 basiert auf der Annahme einer stark verdünnten, idealen Mischung.

$$K_{eq} = \frac{k^+}{k^-} \prod_i (K_{M,r}^i)^{m_i^\pm} = \prod_i c_{i,eq}^{m_i^\pm} = \exp\left(-\frac{1}{R_g T} \sum_i m_i^\pm \mu_i^0\right) \quad 2.15$$

$$\mu_i = \mu_i^0 + R_g T \ln \prod_i c_i^{m_i^\pm} \quad 2.16$$

$$k_r^V = \sqrt{k^+ k^-} \quad 2.17$$

$$A_r = - \sum_i m_i^\pm \mu_i \quad 2.18$$

$$v_r = c_E f_r \frac{k_r^V 2 \sinh\left(\frac{A_r}{2 R_g T}\right)}{(D_r + D_r^{reg}) \prod_i \left(\frac{K_M^i}{c_i}\right)^{m_{ri}^\pm/2}} \quad 2.19$$

1.1.1.2 Verwendete kinetisches Modelle

Das in dieser Arbeit untersuchte Reaktionssystem wurde mit modularen Reaktionsraten modelliert. Für die Reduktionen mit Gre2-HOB wurde aufgrund der kristallinen Struktur ein irreversibler, sequenziell geordneter Mechanismus angenommen (Guo et al. 2014). Da beide Reaktionsstufen NADPH als Cofaktor benötigen, bilden sich bei beiden Reduktionen ähnliche Komplexe, wodurch für beide Reaktionen die kinetischen Konstanten (K_M^{NADPH}) als identisch angenommen wurden.

Tabelle 2.4 Angewandte Mechanismen und Inhibierungen der herrschenden Reaktionen. Allen Reaktionen wurde ein bi-bi-Mechanismus zugeordnet.

Reaktion	Mechanismus		Gl.	Quelle
1.Reduktion (Gre2)	sequenziell geordnet	irr.	2.13	(Guo et al. 2014)(Guo et al. 2014)
2.Reduktion (Gre2)	sequenziell geordnet	irr.	2.13	(Guo et al. 2014)
Cofaktor-Regeneration (GDH)	sequenziell zufällig	rev.	2.8	-

Der Mechanismus der reversiblen Cofaktor-Regeneration mit GDH ist in der Literatur nicht erwähnt. Das Verhalten der Regeneration wurde mit den unterschiedlichen Mechanismen der modularen Kinetik untersucht und bewertet (Kapitel A2). Am besten geeignet erwies sich die Formulierung für einen sequenziell zufälligen Reaktionsmechanismus, die in den folgenden Untersuchungen dargestellt wird.

2.3.3 Bestimmung intrinsischer kinetischer Parameterschätzwerte

Die intrinsischen kinetischen Parameter wurden mit Experimenten in einem Satzreaktor ermittelt, die vom Institut für biologische Grenzflächen (IBG-1) des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt wurden. Die Reaktionsbedingungen, Substrat- bzw. Cosubstrat-Konzentrationen wurden in Kooperation mit dem IBG-1 geplant und orientieren sich an Experimenten aus vorangegangenen Arbeiten mit dem untersuchten Mikroreaktor (Kapitel 4) (Peschke 2018). Die kinetischen Untersuchungen wurden mit den Fusionsenzymen (Gre2-HOB und GDH(ST)) der Immobilisierung durchgeführt, damit die Einflüsse der Konformationsänderung der späteren Immobilisierung minimiert werden. Alle kinetischen Parameter wurden über eine nicht-lineare Regression in Matlab® (The MathWorks, Inc. 2020) mit einem einzelligen Satzreaktor-Modell bestimmt. Die Reaktionsmechanismen und Modelle aus Kapitel 1.1.1.2 wurden für die Ermittlung von Schätzwerten der kinetischen Parameter verwendet. In der Parameterbestimmung wurden sowohl Anfangsreaktionsraten sowie das Verhalten der Substrat- bzw. Produktkonzentrationen mit der Zeit verwendet. Dazu wurde die Fehlerquadratsumme der Abweichungen zwischen den experimentellen Daten und den entsprechenden berechneten Werten minimiert. Die Minimierungsfunktion ist in Gleichung 2.20 dargestellt und beinhaltet eine Normierung auf die experimentellen Werte. Die Kombinationen der zeitlichen Konzentrationsverläufe und der Anfangsreaktionsraten bedingen die Normierung der Werte, um die Vergleichbarkeit der Abweichungen zu gewährleisten. Die erhaltenen Parameterschätzwerte wurden anschließend auf ihre Sensitivität untersucht und gedeutet (Kapitel 2.3.4).

$$\min \sum_{k=1}^N \frac{Y_{k,Exp} - Y_{k,Sim}}{Y_{k,Exp}} \quad 2.20$$

Die reversible Cofaktor-Regenerationsreaktion hat insgesamt sechs Parameter: vier Assoziationskonstanten K_M^i , die Geschwindigkeitskonstante k_v und die Gleichgewichtskonstante K_{eq} . Für die Bestimmung des kinetischen Verhaltens von GDH(ST) wurden Anfangsgeschwindigkeitsversuche bei Glucose-Konzentrationen zwischen 0 und 200 mM und NADPH zwischen 0.1 und 1 mM durchgeführt (Abbildung 2.7 A). Die Anfangsgeschwindigkeiten sind unabhängig von der Enzymkonzentration dargestellt und beziehen sich somit auf die Anzahl der Reaktionen pro Sekunde (TON, engl.: *turnover number*). Außerdem wurde eine zeitabhängige Aufzeichnung der NADPH-Konzentration mittels Absorptionschromatographie durchgeführt (Abbildung 2.7 B). Im zeitlichen Verlauf der NADP+ bzw. NADPH-Konzentrationen stellen sich nach 200 s ein stationärer Wert ein, der damit die Gleichgewichtslage beschreibt.

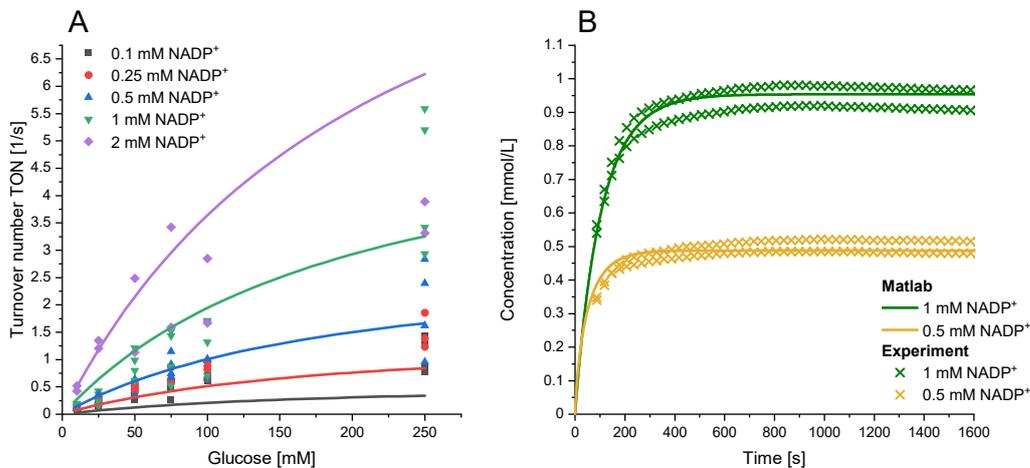


Abbildung 2.7 Experimente zu Bestimmung der intrinsischen Kinetik für die Cofaktor-Regeneration. A: Anfangsreaktionsraten TON in $\frac{1}{s}$. B: NADPH-Konzentrationsverlauf für unterschiedliche Mechanismen und die NADP+ Anfangskonzentrationen von 1 mM und 0,5 mM. Die experimentellen Daten wurden um die Zeit der Injektion bis zum Start der Messung verschoben (80s).

Für die NADP+ Anfangskonzentrationen von 0,5 und 1 mM erreicht die Reaktion ihr Gleichgewicht, das stark auf der Seite von NADPH liegt. Das zeigt sich dadurch, dass die NADPH-Konzentration sich knapp unter 0,5 bzw. 1 mM einstellt. Ein leichtes Sinken der NADPH-Konzentration ist bei längerer Aufzeichnung zu beobachten, was auf eine Degradation von NADPH zurückzuführen ist (Wu et al. 1986). Mit Hilfe der Gleichgewichtskonzentration von NADPH in den Konzentrationsverläufen in Abbildung 2.7 B wurde eine Gleichgewichtskonstante von 0,2 berechnet. Die restlichen intrinsischen kinetischen Parameterschätzwerte wurden mit einer nichtlinearen Lösungsmethode (nichtlineare Lösungsmethode nach der Methode des kleinsten Quadrat – lsqnonlin solver) der Global Optimization Toolbox (The MathWorks, Inc. 2020) bestimmt. Die Lösungsmethode nutzt einen auf Gradienten basierten Algorithmus (Trust-Region-Verfahren) zur Schätzung der Parameter. Das Trust-Region-Verfahren ist in Kapitel A3 genauer beschrieben.

Nach einer Analyse des Reaktionsmechanismus (Kapitel A2) beschreibt ein sequenzieller, zufälliger Mechanismus die experimentellen Daten der Regenerationsreaktion am besten. Die resultierenden kinetischen Parameter mit den Vertrauensbereichen (95%) sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Die Anfangsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (Abbildung 2.7 A) wurden experimentell (IBG-1) innerhalb der ersten 20 Minuten bei einer Enzymkonzentration von 90 nM bestimmt. Die Reaktionsmodelle geben die experimentell beobachteten Trends qualitativ gut wieder. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten werden mit erhöhten Substrat- (Glukose) und Cosubstrat-Konzentrationen (NADP+) größer. Dabei haben geringe NADP+-Konzentrationen einen größeren Einfluss als geringe Glukose-Konzentrationen, was sich in einer geringeren Assoziationskonstante darstellt.

Tabelle 2.5 Gefittete kinetische Parameter der Cofaktor-Regeneration für den sequenziellen, zufälligen Mechanismus. Der zugehörige Vertrauensbereich (95%) der Parameterschätzwerte ist angegeben. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- (k_+) und Rückreaktion (k_-) wurden aus k_v berechnet und hinzugefügt.

Parameter	K_M^A [mM]	K_M^B [mM]	K_M^P [mM]	K_M^Q [mM]	k_v [1/s]	k_+ [1/s]	k_- [1/s]
Wert	39,33	1,01	0,28	0,24	1,17	12,65	0,109
Vertrauensbereich [min; max]	[29,1; 49,6]	[0,66; 1,36]	[0,0301; 0,387]	[0,0534; 326,73]	[0,0829; 1,40]	-	-

A: Glukose; B: NADP+; P: GluAcid; Q: NADPH

Die Analyse der Cofaktor-Regenerationsparameter liefert eine zuverlässige Charakterisierung des Verhaltens innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs. Die berechnete Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion ist geringer im Vergleich zur Hinreaktion und stimmt mit der Gleichgewichtslage überein. Die Vertrauensbereiche sind für die Assoziationsparameter der Hinreaktion enger, da die Untersuchungen mit Startkonzentrationen von Glukose und NADP+ durchgeführt wurden. Diese Vorgehensweise legt einen Fokus auf die Analyse der Reaktionsrichtung, welche zur Bildung von NADPH (Hinreaktion) führt. Die Regeneration von NADPH mit GDH ist für das Reaktionssystem von kritischer Bedeutung, da die Ketoreduktion (NDK zu HK und HK zu Diol; vgl. Kapitel 2.1) NADPH zu NADP+ umwandelt und das Gleichgewicht die Produktion von NADPH begünstigt. Die Bestimmtheit der Reaktion von NADPH zu NADP+ mit GDH(ST) ist somit von geringerer Bedeutung.

Die Regeneration von NADPH soll im Reaktionssystem die Reduktion von NDK aufrecht halten. Das Zusammenspiel zwischen Regeneration und Reduktion ist essenziell für die Berechnung des Umsatzgrades im Reaktor. Die zweistufige Reduktion von NDK wurde in unterschiedlichen Experimenten untersucht. Bei den Experimenten wurde GDH zum Erhalten der NADPH-Konzentration hinzugefügt. Für die Bestimmung der Reaktionsparameter der Reduktion wurden Anfangsgeschwindigkeiten mit 0,1 bis 1 mM NDK (Abbildung 2.8 A) und zeitliche Konzentrationsverläufe (Abbildung 2.8 B) mittels HPLC Assay bestimmt (IBG-1). Das Verfahren der Parameterschätzwertbestimmung der Regenerationsreaktion wurde ebenfalls auf die Reduktionsreaktion übertragen. Dadurch konnten Schätzwerte für die kinetischen Parameter der irreversiblen Reduktion ermittelt werden, die für einen ordentlichen und sequenziellen Reaktionsmechanismus charakteristisch sind. Die nichtlineare Bestimmung der kinetischen Parameter ergab eine gute Übereinstimmung für den experimentell bestimmten Konzentrationsverlauf (Abbildung 2.8 B). Bei den Anfangsgeschwindigkeiten der ersten Reduktion (Abbildung 2.8 A) beschreiben die berechneten die experimentell bestimmten Daten speziell für geringe NDK-Konzentrationen gut. Bei höheren NDK-Konzentrationen zeigen die experimentellen Werte große Abweichungen. Der Konzentrationsbereich von NDK ist in den Untersuchungen dieser Arbeit maximal 5 mmol/L, weshalb die Ungenauigkeiten der

Reaktionsraten bei hohen Konzentrationen akzeptabel sind. Die entsprechenden intrinsischen, kinetischen Parameterschätzwerte der Reduktionsreaktionen sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst.

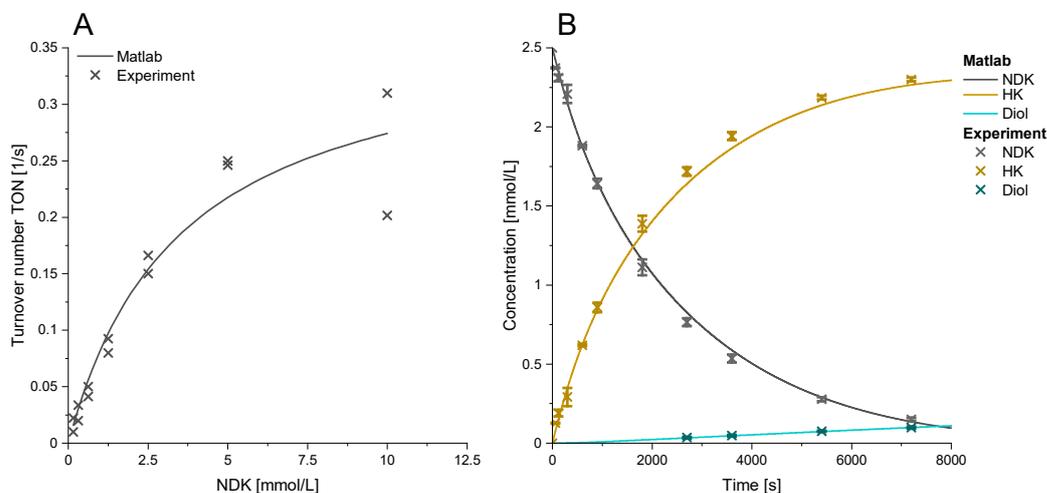


Abbildung 2.8 Experimente zur Bestimmung der intrinsischen kinetischen Parameter für die Reduktion von NDK. A: Enzymkonzentrationsunabhängige Anfangsreaktionsraten TON in $\frac{1}{s}$. B: Konzentrationsverlauf von NDK, HK und dem Diol innerhalb von 8000s.

Durch die Symmetrie des NDK-Moleküls und die Möglichkeit der Bindung beider Ketogruppen am aktiven Zentrum erhöht sich die Assoziationsgeschwindigkeit im Vergleich zum HK, wodurch sich der Wert der Assoziationskonstante verringert. Die Größe der Assoziations- bzw. Inhibierungskonstanten gibt Aufschluss über die Hemmung der Reaktionsrate aufgrund der Konzentrationen der entsprechenden Komponenten. Geringe Werte bedeuten, dass die Reaktionsrate schon bei geringen Konzentrationen gehemmt wird. Gegenläufig verhält sich die Reaktion bei großen Werten. Somit sind beide Reaktionen stark von der Konzentration des Cofaktors und des zu reduzierenden Ketons abhängig. Die Parameter der zweiten Reduktion für HK und die Inhibierungskonstante des Diols haben einen weiten Vertrauensbereich, da experimentell nur geringe Umsätze für die zweite Reaktion gefunden wurden.

Tabelle 2.6 Schätzwerte für die kinetischen Parameter der zweistufigen Reduktion für einen geordneten, sequenziellen Mechanismus mit dem berechneten Vertrauensbereich. Die Werte mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind von dem ersten Reduktionsschritt übernommen.

Reaktion	K_M^A [mM]	K_M^B [mM]	k_{red}^+ [1/s]
1. Red.	6,57	0,102	11,26
Vertrauensbereich [min; max]	[3,76; 9,37]	[0,03; 0,17]	[7,66; 14,88]
2. Red.	0,172	0,102 *	0,0274
Vertrauensbereich [min; max]	[0,0943; 0,418]	[0,03; 0,17] *	[0,0234; 0,0342]

A: NDK (1. Red.) | HK (2. Red.); B: NADPH

2.3.4 Sensitivitätsanalyse der intrinsischen Parameterschätzwerte

Die kinetischen Parameter der beteiligten Reaktionen sind die Grundlage für die Reaktormodellierung. Die Anzahl von Experimenten ist aufgrund wirtschaftlicher und aufwandstechnischer Aspekte begrenzt. Deshalb weisen die Parameterschätzwerte unterschiedliche Vertrauensbereiche auf (Vgl. Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6). Um den Einfluss der einzelnen Parameter auf das Reaktionsverhalten im untersuchten Konzentrationsbereich zu untersuchen, wurde eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die globale varianzbasierte Sensitivitätsanalyse nach Sobol (Sobol 2001) herangezogen. Die Methode untersucht das Verhalten unterschiedlicher Parameter eines Wertebereichs auf eine definierte Zielgröße und wird in der Analyse von komplexen Systemen genutzt. Abhängig von der gewählten Zielgröße können unterschiedliche Effekte und Zusammenhänge bestimmt werden. In diesem Kapitel wird der Einfluss der Parameter auf das Residuum der Parameterschätzung (GDH(ST) und Gre2-HOB) aus Kapitel 2.3.3 bestimmt.

In dieser Analysemethode können neben den individuellen Einflüssen (Sensitivität erster Ordnung) auch Einflüsse zwischen Parametern ermittelt werden (Sensitivität zweiter Ordnung). Letztlich wird mit der totalen Sensitivität der allgemeine Einfluss bestimmt. Parameter, die durch Änderungen großen Einfluss auf die Zielgröße haben, resultieren in großen Sensitivitäten. Parameter mit Sensitivitäten geringer als der Wert 0,05 werden als insignifikant eingestuft (Zhang et al. 2015).

Die Sensitivitätsanalyse der GDH(ST) und Gre2-HOB Parameter wurde jeweils mit 10.000 Stichproben aus zufälligen Wertepaarungen der entsprechenden kinetischen Parameter untersucht. Die totale Sensitivität der Analyse nach Sobol für die Cofaktor-Regeneration mit GDH(ST) ist in Abbildung 2.9 A dargestellt. Der größte Einfluss ist der Geschwindigkeitskonstante k_v zuzuordnen. Die höchste Auswirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist der Zusammenhang mit der Geschwindigkeitskonstante. Die Reaktionsrate setzt sich aus den fundamentalen Umsetzungsschritten der beteiligten Moleküle zusammen. Die Reaktionsrate ist eine rein chemische Konstante und bleibt unbeeinflusst von stofflichen Transportprozessen. Allerdings ist die Bedeutung der Assoziationskonstanten komplexer, da sie von der Diffusion der Komponenten und den Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Substrat beeinflusst werden können.

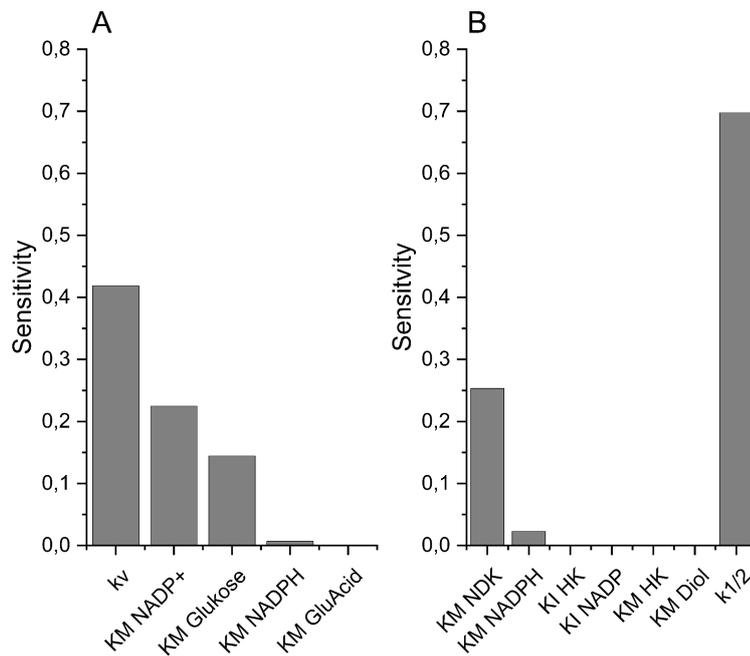


Abbildung 2.9 Totale Sensitivitäten der kinetischen Parameter (Assoziationskonstanten K_M und Inhibierungskonstanten K_I) der Cofaktor-Regenerationsreaktion (A) mit GDH(ST) und der Reduktionen mit Gre2-HOB (B).

Die Ergebnisse der Sensitivitätsanalysen der kinetischen Parameter der Reduktionen sind in Abbildung 2.9 B dargestellt. Die Konzentrationsverläufe im Satzreaktor sind am meisten beeinflusst durch die Geschwindigkeitskonstante k^+ , die Assoziationskonstanten für NDK und NADPH. Die Sensitivität des Inhibierungsfaktors des Zwischenprodukts HK ist ebenfalls zu berücksichtigen. Der Einfluss der Assoziationskonstanten der zweiten Reduktion ist vernachlässigbar gering.

Die Sensitivitätsanalyse stellt mögliche reaktionstechnische Optimierungspotentiale des Reaktionssystems dar. Die Reaktionsrate der Reduktion wird durch die Konzentrationen von NDK und NADPH beeinflusst, wobei der Effekt von NADPH geringer ist als von NDK. Trotzdem kann eine niedrige NADPH-Konzentration die Reduktion beeinflussen. Daher ist die Regenerationsreaktion von entscheidender Bedeutung für die Reduktion, da sie eine konstante Verfügbarkeit von NADPH sicherstellt. Die Assoziationskonstante basiert auf den Assoziationsprozessen. Damit ist sie abhängig von der Diffusion der Komponente. Der Assoziationsprozess kann durch diverse Maßnahmen verbessert werden. Ein Ansatz ist die Erhöhung des Stofftransports durch eine Strömungsgeschwindigkeit des Mediums um das Enzym. Diese kann durch eine entsprechende Strömungsführung (Mischung) oder einen höheren Volumenstrom erreicht werden. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Maßnahmen negative Auswirkungen auf den Umsatz und die Lebensdauer der Enzyme haben können. Eine alternative Methode, die diese Nachteile vermeidet, ist die Verkürzung der Diffusionswege von NADPH. Nach der Sensitivitätsanalyse kann somit die Reduktion entscheidend verbessert werden. Die weiten Diffusionswege aus der Bulkphase zum Gre2-HOB können durch eine lokale Regeneration mit Hilfe von GDH(ST) reduziert werden. Eine exakte, gewollte

Anordnung ist durch die DNA-Nanotechnologie möglich und erlaubt sowohl die theoretische als auch die experimentelle Untersuchung von Enzymkaskaden auf DONs.

2.4 Simulation von Enzymkaskaden auf DONs

Dieses Kapitel beschreibt den theoretischen Hintergrund zur Simulation von Assoziationsraten von Enzymkaskaden auf DONs auf molekularer Ebene (Kapitel 2.4.1). Nach der Wahl eines geeigneten Programms (Kapitel 2.4.2) wird auf die biologische Darstellung der Enzymkaskaden und die Einbettung in die Simulationssoftware eingegangen (Kapitel 2.4.3).

2.4.1 Molekülmechanik

In der Erforschung neuer funktioneller, biologischer Systeme und der Erarbeitung hochleistungsfähiger Prozesse erlangen computergestützte Methoden immer größere Bedeutung. Dabei trägt die Untersuchung von physikalischen Phänomenen auf molekularer Ebene einen entscheidenden Schritt zur Erarbeitung neuer, funktioneller Materialien bzw. maßgeschneiderter Moleküle bei (Satoh 2011; Rabe et al. 2017). Die Reaktionen und die intermolekularen Interaktionen eines biologischen Prozesses basieren auf der Wechselwirkung zwischen Atomen. Die Teilschritte in einem solchen Prozess decken unterschiedliche Größen- (nm bis μm) und Zeitskalen (fs bis ms) ab. Typische Teilprozesse reichen in diesen Bereichen von Bindungsdehnungen, -biegungen (10^{-14} s) über allosterischer Regulierung (10^{-11} – 10^{-7} s) bis zur Proteinfaltung (10^{-5} – 1 s) (Schlick 2010). Zur Abbildung von Assoziationsprozessen mittels Simulationstechniken ist eine detaillierte Modellierung unterschiedlicher Längen- und Zeitmaße erforderlich. Eine größere Detailgenauigkeit (kleinere Zeit- und Längeneinheiten) erfordert jedoch einen höheren Rechenaufwand. Die Berechnung von biologischen Systemen erfolgt mithilfe von zwei verschiedenen Methoden: Quantenmechanik (QM) und Molekülmechanik (MM). Die schnellste modellierte Bewegung bestimmt dabei das Größen- und Zeitmaß. (Abbildung 2.10) (Lorenz und Doltsinis 2017).

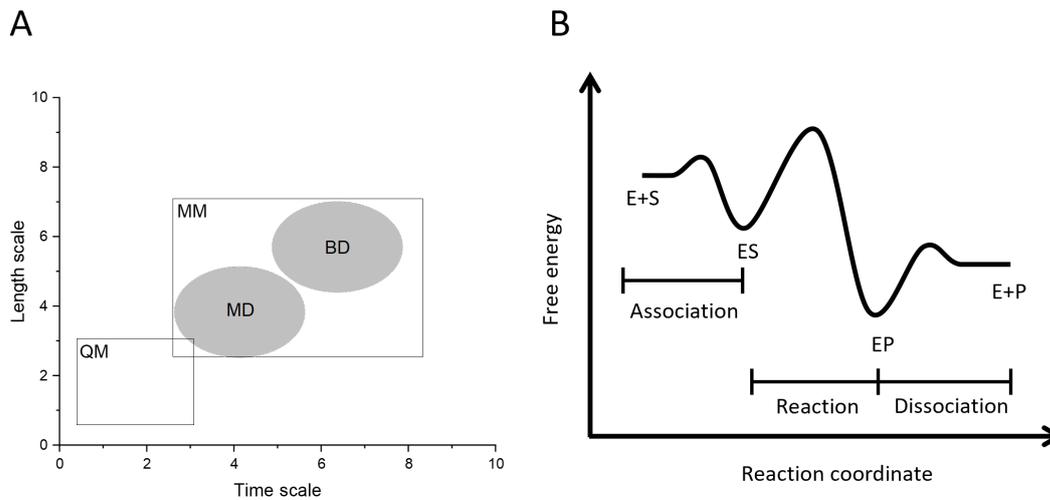


Abbildung 2.10 A: Molekularsimulationsmethoden und das abgebildete Größen- und Zeitmaß (Ozboyaci et al. 2016). B: Schematischer Verlauf der freien Energie während einer Enzymreaktion mit einem Substrat. Die Teilschritte Assoziation, Reaktion und Dissoziation sind in dem Graphen markiert. Der Graph wurde nach Cornish-Bowden erstellt (Cornish-Bowden 2012).

Die QM beschreibt Elektronenbewegungen und Interaktionen zwischen Atomen in einem System, wodurch chemische Reaktionen abgebildet werden können (Abbildung 2.10 B). Die QM (z.B. *density functional theory* oder *ab initio molecular orbital theory*) simulieren nur wenige Atome, die an der Reaktion beteiligt sind. QM-Simulationen berechnen das Verhalten im Größenintervall von Nanometern (nm) und einem Zeitintervall von wenigen Mikrosekunden (μs). Mit der QM lassen sich dabei wichtige Reaktionsschritte (Bindungsbrüche, -bildungen oder Übergangszustände) berechnen. Ein gesamtes, biologisches System mit QM zu berechnen ist aufgrund der Größe und der Anzahl der Atome nicht möglich (Masgrau et al. 2017).

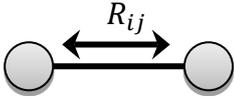
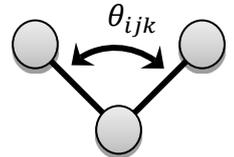
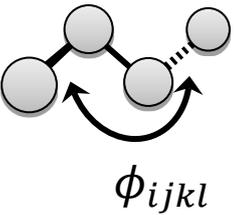
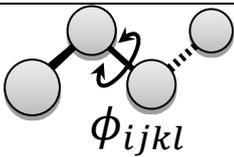
Die MM ist eine Technik, die klassische Ansätze der Mechanik verwendet, um molekulare Systeme zu beschreiben und ihre Bewegungen zu berechnen. Die MM ist ein wertvolles Werkzeug zur Modellierung von Atom- und Molekülbewegungen und bietet die Möglichkeit, Prozesse wie Assoziation, Dissoziation und Konformationsänderungen von Molekülen zu untersuchen und zu berechnen (Abbildung 2.10 B). Dabei werden die Atome als Partikel mit einer festen Masse und Partialladung dargestellt. Die Bindungen zwischen den Atomen werden als mechanische Federn beschrieben. Kräfte, die durch die Umgebung (z.B. durch andere Moleküle, das Lösungsmittel oder gelöste Ionen) auf die Atome induziert werden, werden durch Kraftfelder beschrieben. Die Bewegung eines Atoms bzw. Partikel i folgt der klassischen Mechanik mit der Newtonschen Gleichung $(F = m \cdot \frac{d\vec{r}_i}{dt})$. Als stochastische Alternative zur klassischer Newtonschen Dynamik beschreibt die Langevin-Dynamik (Tuckwell 1995) die Kraft auf ein Partikel über den Gradienten des herrschenden Potentials E , abhängig vom Ort r_i der Partikel.

$$m_i \cdot \frac{d\ddot{r}_i}{dt} = -\nabla E(r_i) + \sum_a F_a \quad 2.21$$

$$E(r_i) = \sum_{i=0}^j E_i(r_i) \quad 2.22$$

Die Erweiterung der Langevin-Gleichung (Gl. 2.21) durch die Inklusion systemspezifischer Terme ermöglicht die Modellierung von komplexeren Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen werden durch Kräfte auf die Atome repräsentiert, die durch die Definition geeigneter Kraftfelder oder Potentiale E dargestellt werden können. Die Kombination verschiedener Potentiale ist gemäß dem Newtonschen Gesetz additiv (Gl. 2.22). Die auf die Atome wirkenden Kräfte unterteilen sich in kurz- und weitreichende Kräfte. Kurzreichende Kräfte resultieren aus intra- und intermolekularen Wechselwirkungen. Intramolekulare Wechselwirkungen bestimmen die Potentiale, die in einem Molekül herrschen. Ein Überblick über die wichtigsten Potentiale ist in Tabelle 2.7 dargestellt. Die mathematische Beschreibung der Potentiale entspricht einem Federkraftpotential mit der Federkonstante k (Schlick 2010).

Tabelle 2.7 Potentiale für unterschiedliche intramolekulare Wechselwirkungen mit grafischer Darstellung.

Potential	Gleichung		Darstellung
Harm. Schwingung	$E_b = \frac{1}{2} k_b (R_{ij} - R_{ij}^{eq})^2$	2.23	
Morse	$E_{b,M} = D_{ij} [1 - \exp(-a(R_{ij} - R_{ij}^{eq}))]^2$	2.24	
Winkel	$E_w = \frac{1}{2} k_w (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{eq})^2$	2.25	
Uneigentliche Torsionswinkel	$E_d = \frac{1}{2} k_d (\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^{eq})^2$	2.26	
Torsion	$E_T = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^{eq})]$	2.27	

Bindungspotentiale zwischen zwei Atomen werden durch harmonische und bei Bindungsbrüchen und großer Auslenkung mit Morsepotential beschrieben (Gl. 2.23). Die Morsedehnung ersetzt die harmonische

Dehnung nach Gl. 2.24 mit der Dissoziationsenergie D_{ij} und $a = \sqrt{\left(\frac{\mu}{2D_{ij}}\right)}\omega$. Dabei beschreibt μ die reduzierte Masse und ω die harmonische Schwingungsfrequenz.

Das Potential der Beugeschwingung E_w bezieht sich auf den Winkel θ_{ijk} , der durch drei Atome aufgespannt wird. Die Beugeschwingung wird mit einem harmonischen Potential beschrieben (Gl. 2.25).

Wechselwirkungen zwischen vier Atomen werden über den uneigentlichen Torsionswinkel (Gl. 2.26) und das Torsionspotential (Gl. 2.27) beschrieben. Das Potential des uneigentlichen Torsionswinkels hält beispielsweise Benzol planar und wird mit dem Winkel ϕ_{ijkl} berechnet, der sich zwischen den Ebenen durch die Atome ijk bzw. jkl aufspannt. Das Torsionspotential erlaubt die Rotation einer Bindung mit der Torsionsbarriere V_n und mit der Anzahl n der Potentialminima (Schlick 2010; Lorenz und Doltsinis 2017).

Bei intermolekularen Wechselwirkungen wird zwischen van-der-Waals (VdW) und elektrostatischen Wechselwirkungen unterschieden. Die VdW-Kräfte zwischen den Atomen von zwei Molekülen können mit dem Lennard-Jones-Potential (12,6) (Gl. 2.28) beschrieben werden, das sich aus der Potentialmulde ϵ_{ij} und dem minimalen Abstand σ_{ij} (Berührungspunkt der Atomradien) zusammensetzt. $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i\epsilon_j}$ berechnet sich mit den beiden atombezogenen Potentialmulden (bzw. Einzugsradien) und $\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2}$ mit den Atomradien σ_i und σ_j . Beide Werte werden nach der Lorentz-Berthold-Methode berechnet (Lorentz 1881). Mit dem VdW-Potential werden schwache nicht-kovalente An- und Abstoßungskräfte beschrieben.

$$E_{VdW} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}}\right)^6 \right] \quad 2.28$$

Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen zwei Atomen können mithilfe des Coulombschen Gesetzes quantifiziert werden, was in einer Berechnung des entsprechenden Potentials E_{ES} resultiert (Gl. 2.29). Das Potential E_{ES} setzt sich aus den Partialladungen q_i, q_j der Atome, deren Abstand R_{ij} und der Dielektrizitätskonstante ϵ_0 zusammen. Abhängig von der Ladung der Atome ziehen sich diese an (entgegengesetzte Ladung) oder stoßen sich ab (gleiche Ladung).

$$E_{ES} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}} \quad 2.29$$

Die elektrostatischen Wechselwirkungen haben eine größere Reichweite und tragen einen Großteil zur Konformation und zum Assoziationsverhalten zweier Moleküle bei.

Die Modellierung der inter- und intrapartikulären Kräfte werden in der MM genutzt, um das Molekülverhalten zu simulieren. Abhängig von der Größen- und Zeitskala wird die MM in die molekulardynamische Simulation (engl.: molecular dynamics, MD) und die Simulation starrer Körper (engl. *coarse grained methods*) unterteilt. Die MD-Simulationen ermöglichen die Simulation mehrerer Moleküle in einem festen Volumen. In Anwesenheit von Lösungsmittel und anderen gelösten Molekülen wird dabei das elastische

Verhalten der Moleküle und der intramolekularen Atomanordnungen berechnet. Somit können geringe Konformationsänderungen und allosterische Regulationen dargestellt werden. Generell werden die MD-Systeme in einem Größenbereich von 10 nm und für wenige 1 Nanosekunden berechnet. In den letzten Jahren wurden auch größere MD-Systeme berechnet, die jedoch einen großen numerischen Aufwand mit sich bringen (Bhattacharya et al. 2011; Yoo et al. 2020).

Die Simulation von Molekülen als starre Körper erlaubt die Berechnung größerer Zeitskalen durch Approximation der Interaktionen zwischen einem Molekül und dem Lösungsmittel, vernachlässigt jedoch Konformationsänderungen der Moleküle. Diese Methode wird als Brown'sche-Dynamik (BD) Simulationen bezeichnet. Die BD basiert auf der Annahme, dass die Bewegung der in der Simulation betrachteten Moleküle im Lösungsmittel durch zufällige Brown'sche Molekularbewegungen beschrieben werden kann. Im Allgemeinen sind die simulierten Moleküle viel größer als das Lösungsmittel, wodurch ihre Bewegung durch die Hydrodynamik des Lösungsmittels bestimmt wird (Bian et al. 2016; Mizuta et al. 2019). Bei diffundierenden Molekülen, die ähnlich groß wie das Lösungsmittel sind, gelangt die BD an ihre Grenzen (Schmidt und Skinner 2003). Wie die MD basiert die BD auf dem Langevin-Modell, vernachlässigt jedoch die intramolekularen Kräfte und die explizite Simulation der Lösungsmittelmoleküle. Der Einfluss des Lösungsmittels und die Brown'sche Bewegung erweitern die Langevin-Gleichung (Gl. 2.21):

$$F = -\nabla E(r_i) + \xi u + F^b(t) \quad 2.30$$

Der zweite Term auf der rechten Seite in Gl. 2.30 beschreibt den Einfluss des Lösungsmittels mit der Relativgeschwindigkeit u der Partikel und dem Reibungsfaktor $\xi = 6\pi\eta d$ für den Partikeldurchmesser d und die dynamische Viskosität η des Lösungsmittels. Die Langevin-Kraft $F^b(t)$ ist eine zufällige Kraft aufgrund von Zusammenstößen zwischen Lösungsmittelmolekülen und dem bewegten Molekül. Sie ist eine stochastische Variable, die ein normalverteiltes weißes Rauschen darstellt (engl.: *zero mean Gaussian noise*). In der BD wird die Bewegung als statistischer, zufälliger Prozess modelliert. Dadurch ist der Mittelwert der Langevin Kraft F^b konstant, zeitunabhängig und kann als null angenommen werden (Gl. 2.31). Weiterhin wird angenommen, dass die Korrelationszeit infinitesimal klein ist, wodurch sie proportional zur Delta-Funktion mit der Gewichtung des Diffusionskoeffizienten D_i wird (Gl. 2.32) (Kubo 1966).

$$\langle F^b(t) \rangle = 0 \quad 2.31$$

$$\langle F^b(t) F^b(t') \rangle = 2D_i \delta(t - t') \quad 2.32$$

$$D_i = k_b T / \xi \quad 2.33$$

Die Implementierung der Brown'schen Dynamik erfolgt mit der Einstein-Smoluchowski-Beziehung (Gl. 2.33) als orts aufgelöste, gedämpfte Langevin-Gleichung. Mit einem definierten Zeitschritt kann somit die Brown'sche Bewegung nach Gleichung 2.35 berechnet werden.

$$\frac{dr_i}{dt} = -\frac{D_i}{k_b T} \nabla E + \sqrt{2D_i} \frac{dF^b(t)}{dt} \quad 2.34$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) - \frac{D_i}{k_b T} \nabla E \Delta t + \sqrt{2D_i \Delta t} F^b(t) \quad 2.35$$

Das Lösungsmittel hat neben der Beeinflussung der Bewegung der Partikel auch einen abschirmenden Effekt auf die elektrostatischen Kräfte. Aus diesem Grund wird das Coulombsche Potential E_{ES} in der BD angepasst (engl.: *screened Coulomb potential*). Das Coulombsche Potential (Gl. 2.29) wird mit der inversen Debye Länge $\kappa = 1/\lambda_D$ als Abschirmungsparameter angepasst:

$$E_{ES,s} = \frac{k_e q_i q_j}{R_{ij}} e^{\kappa R_{ij}} \quad 2.36$$

$$\text{Mit: } \kappa = \frac{1}{\lambda_D} = \sqrt{\frac{4\pi k_e \sum_a (Q_a^2 c_a)}{\epsilon_0 k_b T}} \quad 2.37$$

In Gleichungen 2.36 und 2.37 wird mit der Coulombschen Konstante k_e , der Boltzmann Konstante k_b und der Temperatur T das abgeschirmte elektrostatische Potential $E_{ES,s}$ berechnet. Die Ionenstärke des Lösungsmittels ist in dem Abschirmungsparameter für die Ladung Q_a und der Konzentration c_a des entsprechenden a-wertigen Salzes enthalten.

Die BD ermöglicht es, größere, biologische Systeme mit bis zu 500.000 Atomen und für Simulationszeiten bis zu wenigen *ms* abzubilden (Ozboyaci et al. 2016). Einer der vielversprechendsten Anwendungsbereiche der BD-Simulation ist die Berechnung von Assoziationsprozessen zweier Moleküle. In dieser Arbeit wird das grundlegende Verhalten der NADPH Assoziation mit Gre2-HOB und der Einfluss von DONs mit BD-Simulationen untersucht.

2.4.2 Brown'sche-Dynamik (BD) Simulations-Software

In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedlichste BD-Programme geschrieben, die abhängig von ihrer Anwendung unterschiedliche BD-Algorithmen nutzen (Northrup et al. 1982; Northrup et al. 1984; Elcock 2004; Roberts und Chang 2016). Ein Überblick über eine Auswahl an Programmen wird in Tabelle 2.8 gegeben. Die Protein-Protein (P-P) und Substrat-Protein (S-P) Assoziation mit flexiblen Molekülen wurde mit MakroDox und University of Houston Brownian Dynamics (UHBD) Software untersucht und dient als Grundlage für viele BD-Programme (Pearson und Gross 1998; Huber und Kim 1996; Rojnuckarin et al. 2000). Basierend auf Assoziationsereignissen bei den Berechnungen führt die UHBD die Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (AGK) ein. Die „Simulation of Diffusional Association“ (SDA) Software ermöglicht die Berücksichtigung von Umgebungsbedingungen wie pH-Wert oder Salzgehalt (Spaar und Helms 2005) und inspirierte die Erstellung von Browndye (Huber und McCammon 2010). Ein weiteres Programm zur Untersuchung bimolekularer Systeme ist GeomBD. Mit der dritten Version des Programms wurde neben der Berechnung von Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten auch das Simulieren des Transportverhaltens für Substrate bzw. Intermediate einer Enzymkaskade ermöglicht (Roberts und Chang 2015, 2016). Die Software wurde speziell für die Untersuchung von auf DONs immobilisierten Enzymen

entwickelt. Die Berechnung von Substratdiffusion und -assoziation in Dimensionen einer Zelle kann mit Mcell, ChemCell oder Smoldyn modelliert werden (Stiles und Bartol 2001; Plimpton und Slepoy 2005; Andrews et al. 2010).

Tabelle 2.8 Simulationsprogramme basierend auf BD und ihre Anwendung. Die Assoziation von zwei Proteinen wird mit P-P und von einem Substrat und einem Protein mit S-P abgekürzt.

Programm	Anwendung	Quellen
MakroDox	P-P/S-P Assoziation Flexible Moleküle	(Pearson und Gross 1998)
UHBD	P-P/S-P Assoziation Flexible Moleküle, Berechnung von Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten	(Huber und Kim 1996; Rojnuckarin et al. 2000)
SDA	P-P/S-P Assoziation Starre Moleküle, Umgebungseffekte, Kompetitive Assoziation	(Spaar und Helms 2005)
Browndye	P-P/S-P Assoziation Starre Moleküle, Umgebungseffekte, Kompetitive Assoziation	(Huber und McCammon 2010)
GeomBD3	P-P/S-P Assoziation + Substrat Transfer Starre Moleküle, Umgebungseffekte, Simulation von DON-Enzymkomplexen	(Roberts und Chang 2015; Gao et al. 2016)
Mcell, ChemCell, Smoldyn	Assoziationen in Zellen	(Stiles und Bartol 2001; Plimpton und Slepoy 2005; Andrews et al. 2010)

Wegen der Einbindung von DNA-Nanostrukturen in der BD-Simulation wurde in dieser Arbeit GeomBD für die Simulationen auf molekularer Ebene gewählt. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Software GeomBD und deren Anwendungen gegeben.

Der Algorithmus basiert auf der Brown'schen Bewegung (Gl. 2.30-2.37). Intramolekulare Wechselwirkungen werden nicht berechnet, da die Moleküle als starre Körper betrachtet werden. In den Simulationen werden die relativen Diffusionen des Liganden zum Rezeptor (Protein oder Protein-DON Komplex) berechnet. Sowohl der translatorische (Gl. 2.38), als auch rotatorische Diffusionskoeffizient (Gl. 2.39) werden nach der Stokes-Einstein-Gleichung mit dem hydrodynamischen Durchmesser berechnet:

$$D_{translation} = \frac{k_b T}{6\pi\eta} \left(\frac{1}{r_{ligand}} + \frac{1}{r_{receptor}} \right) \quad 2.38$$

$$D_{rotation} = \frac{k_b T}{8\pi\eta} \left(\frac{1}{r_{ligand}^3} + \frac{1}{r_{receptor}^3} \right) \quad 2.39$$

Die Berechnung der Kraftfelder von Van-der-Waals- (VdW) und abgeschirmten elektrostatischen Wechselwirkungen (Gl. 2.28 und Gl. 2.36) erfolgt vor der Simulation mittels eines festen Gitters (LJ-Gitter engl.: *Lennard-Jones grid*; bzw. ES-Gitter engl.: *electrostatic grid*). Zudem bietet das Programm die Möglichkeit, das Volumen des Rezeptors durch Ausschluss aus dem Gitter zu definieren, um Überlappungen von Molekülen zu verhindern (EX-Gitter; engl.: *exclusion grid*). Die BD-Simulation ermöglicht die Simulation von zwei verschiedenen Szenarien: (i) indirekte Northrup-Allison-McCammon-Simulation (NAM-Simulation) für Assoziationen aus dem Bulkvolumen und (ii) direkte Simulation des Transports eines Substrats oder Intermediats zwischen zwei Enzymen. Diese beiden Szenarien sind in Abbildung 2.11 dargestellt.

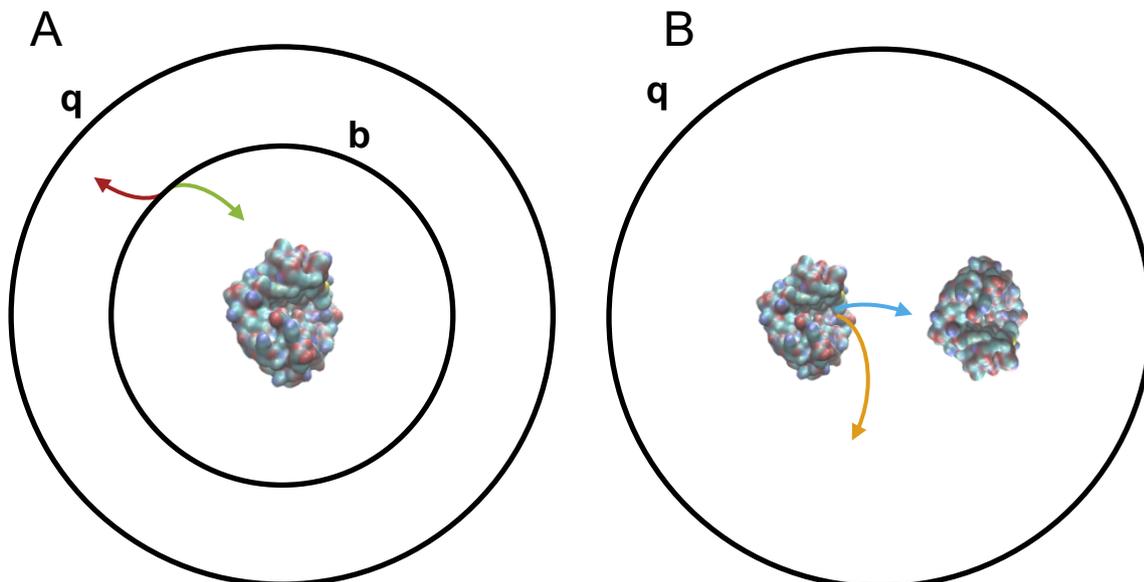


Abbildung 2.11 Schematische Darstellung der Anwendungsfälle von GeomBD. A: indirekte/NAM Methode (Adsorption aus der Bulkphase) b: Startradius der Liganden q: Austrittsradius. B: direkte Methode (Substrattransfer zwischen zwei Rezeptoren).

Bei der indirekten Assoziation wird ein Ligand an einer zufälligen Position mit dem Abstand b vom Rezeptor erzeugt. Liganden, die sich weiter als die Austrittsentfernung q aufhalten, werden vernachlässigt, da die Wahrscheinlichkeit einer Assoziation minimal ist. Sowohl b als auch q werden abhängig von dem Rezeptor gewählt. Für kleine Rezeptoren betragen diese beispielsweise $b = 13,5$ nm und $q = 67,5$ nm (Roberts und Chang 2015). In der direkten Assoziation (Substrat Transfer) werden Liganden an einem vordefinierten Ort erstellt. Die Startposition des Liganden bzw. Substrats kann beispielsweise in der Nähe des aktiven Zentrums des Ausgangsenzyms festgelegt werden. Sobald ein Binde- oder Austrittsereignis stattfindet, ist die Berechnung des entsprechenden Liganden abgeschlossen und es wird ein neuer Ligand an einem Startpunkt erstellt. Mit Hilfe der BD-Simulation lassen sich die Geschwindigkeiten der Assoziation unterschiedlicher Substrate berechnen. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (AGKs) berechnen

sich für beide Methoden über die Bindeereignisse. Das Ereignis für die Bindung eines Substrates kann über zwei Methoden definiert werden. Dafür muss ein Bereich für eine erfolgreiche Assoziation angegeben werden (Kugelvolumen mit Bindezentrum und Radius). Sobald entweder (i) das Zentrum des Liganden oder (ii) ein vordefiniertes Atom des Liganden in das Kugelvolumen eintritt, wird die Assoziation als abgeschlossen angenommen. Informationen über Methoden, Anzahl der berechneten Liganden, Umgebungsvariablen und Bindebedingungen werden in einer Eingabe-Datei angegeben.

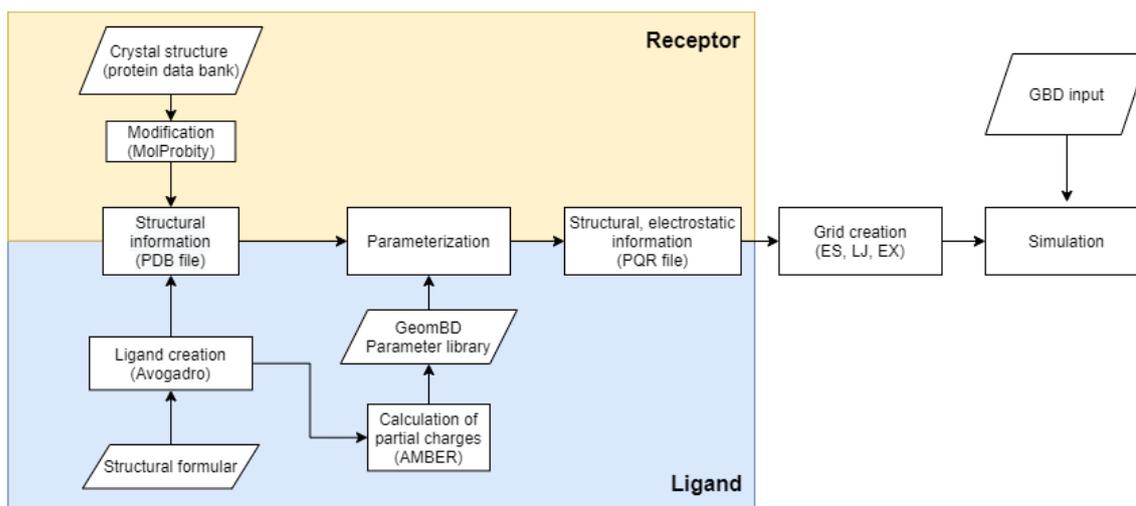


Abbildung 2.12 Flussdiagramm des Vorgehens einer Simulation mit GeomBD. Die nötigen strukturellen Moleküldateien (Blau: Ligand; Gelb: Rezeptor) werden entweder erstellt oder von Proteindatenbanken bezogen. Nach der Zuweisung von Partialladungen werden Kraftfeldgitter erstellt, die in der BD-Simulation genutzt werden. Allgemeine Informationen für die Methode, Bindung und Anzahl der berechneten Liganden werden in einer „GBD-Input“-Datei angegeben. Modifikationen (MolProbit (Williams et al. 2018)), Ligand Erstellung (Avogadro (Hanwell et al. 2012)) und die Berechnung der Partialladungen von kleinen Molekülen (AMBER (Case et al. 2005)) werden mit zusätzlichen Programmen durchgeführt.

Das Vorgehen zum Erstellen einer Simulation zur Berechnung einer AGK eines Substrats (Ligand) an einem Enzym (Rezeptor) mit GeomBD ist in Abbildung 2.12 dargestellt. Im ersten Schritt müssen die molekularen Informationen des Rezeptors und des Liganden bereitgestellt werden. In Protein-Datenbanken (z.B. RCSB: <https://www.rcsb.org/>; Protein Data Bank Europe: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>) kann auf unterschiedliche digitalisierte Kristallstrukturen (PDB-Dateiformat) zugegriffen werden. Die Kristallstrukturen werden entweder mit Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie oder mit Elektronenmikroskopie ermittelt und umgewandelt. Je nach Aufnahmemethode müssen die Kristallstrukturen nachbearbeitet werden. Dies beinhaltet die Ergänzung von fehlenden Atomen, wie Wasserstoffatomen oder das Reparieren von Strukturen, das durch das online Tool MolProbit ermöglicht wird (Williams et al. 2018). Eine weitere Modifikation kann die Fusionierung mehrerer Moleküle beinhalten. Für die Untersuchung von Enzymkaskaden auf DONs werden die entsprechenden Enzyme über Verbindungsmoleküle (Linker, z.B. Tags) mit den DONs zusammengeführt. Die korrekte Bezeichnung und Nummerierung der Kristallstruktur (PDB-Datei) ist für die Parametrisierung und Berechnungen mit GeomBD essenziell, da ansonsten falsche

Ergebnisse produziert werden. In GeomBD ist eine Datenbank mit Partialladungen von Standard-Aminosäuren hinterlegt, die bei der Parametrisierung genutzt wird, um Atomen deren entsprechende Partialladung zuzuweisen. Die Parameter basieren auf AMBER, GAFF und 14SB Kraftfeldern (Case et al. 2005; Salomon-Ferrer et al. 2013; Ponder und Case 2003; Tian et al. 2020). Durch die Parametrisierung wird aus der Datenbank und der PDB-Datei eine PQR-Datei erstellt. Die PQR-Datei enthält neben den strukturellen auch elektrostatische Informationen der Atome. Ein Überblick zu den einzelnen Dateiformaten und deren Syntax wird in Kapitel A4 gegeben. Kleine Moleküle sind nicht in den Proteindatenbanken zu finden und können anhand ihrer Strukturformel (z.B. mit ihrem SMILE-Code) mit dem Programm Avogadro konstruiert werden (Hanwell et al. 2012). Die Energie der erstellten Liganden wird anschließend minimiert. Da die meisten kleinen Moleküle nicht aus Standard-Aminosäuren aufgebaut sind, werden die partiellen Ladungen der Atome mit AMBER berechnet und in die GeomBD-Datenbank eingepflegt (Case et al. 2005). Mit der bereitgestellten Parametrisierung werden anschließend PQR-Dateien des Liganden erstellt.

Nach erfolgreicher Erstellung der Dateien zu Rezeptor- und Liganden-Molekülen, die strukturelle und elektrostatische Informationen enthalten, werden die Potentialgitter generiert. Die Gitter für VdW- und abgeschirmte elektrostatische Wechselwirkungen (LJ- und ES-Gitter) werden mit Informationen über Reichweite, Gitterabstände und Ionenstärke des Lösungsmittels berechnet. Die Konfigurationen der Gittererzeugung wurden bei allen Berechnungen konstant gehalten. Ein Exklusions-Gitter (EX-Gitter) kann bei Bedarf berechnet werden, welches ein Überlappen der Moleküle verhindert. Im Anhang (Kapitel A5) sind die Standardeinstellungen und die Befehle zur Handhabung von GeomBD angegeben. Im letzten Schritt wird die Simulation gestartet. GeomBD bietet die Möglichkeit einer parallelisierten Berechnung, vorausgesetzt der genutzte Compiler unterstützt Cilk Plus (Asai und Vladimirov 2015).

2.4.3 Berechnung von Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten

Die Berechnungen mit GeomBD, beschrieben in Kapitel 2.4.2, ermöglichen die Ermittlung der AGK k_{on} (direkte Assoziation) und der Transfargeschwindigkeitskonstanten (TGK) $k_{indirect}$ (indirekte Assoziation) aus den Assoziations- und Austrittsereignissen. In der direkten Simulationsmethode ist der Zusammenhang zwischen der AGK zweiter Ordnung nach Gleichung 2.40 gegeben (Roberts und Chang 2016). Dabei ist β das Assoziationsverhältnis aus Assoziationsereignissen bezogen auf alle Ereignisse (Assoziation und Austritt). $k_d(r) = 4\pi rD$ wird für den Startradius b und Austrittsradius q mit dem relativen Diffusionskoeffizienten D berechnet. Damit ergibt sich eine Assoziationsrate nach Gleichung 2.41. Dabei entspricht die beobachtete AGK k_1^{app} der indirekten AGK k_{on} .

$$k_{on} = \frac{\beta k_d(b)}{1 - (1 - \beta) \frac{k_d(b)}{k_d(q)}} \quad 2.40$$

$$v_{ass} = k_1^{app} [E][A] = k_{on}[E][A] \quad 2.41$$

Die Berechnung der AGK $k_1^{app'}$ für einen Enzymkomplex mit Nahordnung berücksichtigt zur indirekten Assoziation aus der Bulkphase noch die direkte Assoziation eines nahen Enzyms. Für die Berechnung der resultierenden Assoziationsrate (Gl. 2.42) müssen somit beide Fälle berechnet werden. Die indirekte AGK (Gl. 2.43) berechnet sich aus der Assoziationsrate aus der Bulkphase und berücksichtigt die direkt assoziierten Liganden. Die direkte TGK bildet sich aus dem Assoziationsverhältnis β_{direkt} und der durchschnittlichen Zeit $t_{bind,avg}$, die ein Ligand beim Transfer benötigt (Gl. 2.44).

$$v_{ass} = k_1^{app'} [E][A] = k_{direkt}[E] + k_{indirekt}[E][A] \quad 2.42$$

$$k_{indirekt} = (1 - \beta_{direkt})k_{on} \quad 2.43$$

$$k_{direkt} = \beta_{direkt} \frac{1}{t_{bind,avg}} \quad 2.44$$

In der Reaktionsgleichung der makroskopischen Reaktion aus Kapitel 2.3.2 kann mit der neuen beobachteten AGK $k_1^{app'}$ der Einfluss einer Nahordnung eingebunden werden (Gl. 2.45). Der Nenner des letzten Terms kann als ein Verstärkungsfaktor verstanden werden. Ohne direkte Assoziation nimmt er den Wert 1 an und vergrößert sich mit einer schnelleren, direkten Assoziation.

$$K_M^{A,app} = \frac{k_{-1}}{k_1^{app'}} = \frac{k_{-1}}{k_{indirekt}} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{k_{direkt}}{k_{indirekt}[A]}\right)} \quad 2.45$$

Wie schon in Kapitel 2.3.4 erwähnt, ist die Verfügbarkeit von NADPH wichtig zum Aufrechterhalten der Reduktion. Die Diffusion von NADPH ist im Vergleich zu NDK und HK langsamer, weshalb eine Reduktion der Diffusionswege von NADPH einen größeren Einfluss hat. Speziell bei Fällen einer Hemmung der Reduktion aufgrund von NADPH-Mangel könnte eine kürzere Diffusionsstrecke aufgrund von Nahanordnungen profitabel sein. Der Einfluss von direkter NADPH Assoziation durch eine Nahordnung auf die Anfangsreaktionsrate der ersten Reduktion wurde exemplarisch für unterschiedliche NADPH-Konzentrationen und verschiedene Werte der direkten TGK berechnet. Das Verhältnis von v_{direkt} zu einer Reaktionsrate ohne Einfluss durch Nahordnungen v_0 ist in Abbildung 2.13 dargestellt. Der Bereich der NADPH-Konzentrationen entspricht den Werten aus der Parameterbestimmung aus Kapitel 2.3.3 (Abbildung 2.8 A). Die Nahanordnung hat keinen Einfluss auf den Diffusionsweg von NDK, da dieses aus der Bulkphase diffundiert. Aus diesem Grund wurde dessen Assoziationskonstante als unbeeinflusst betrachtet. Die konzentrationsunabhängige TGK k_{direkt} wurde linear erhöht, während die indirekte TGK konstant blieb.

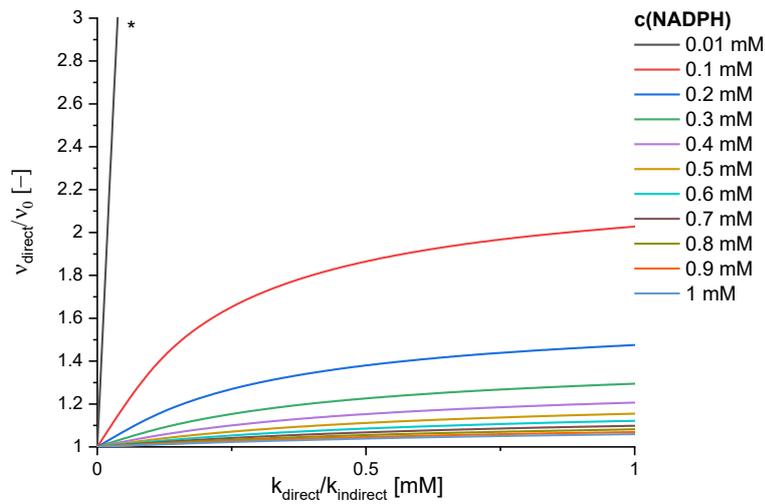


Abbildung 2.13 Effekt der direkten Assoziation durch Verstärkung der Anfangsreaktionsrate v_{direct} , bezogen auf die freie Anfangsreaktionsrate v_0 für unterschiedliche NADPH-Konzentrationen bei linear skaliierter TGK. Die Kurve für 0,01 mM NADPH ist aufgrund der Grenzen der Y-Achse abgeschnitten (*).

Ohne Einfluss der direkten Assoziation ($k_{direct} = 0$) ist keine Verbesserung der Anfangsreaktionsrate zu vermerken. Die Vorteile der direkten Assoziation werden bei niedrigen Konzentrationen von NADPH offensichtlich. Der Verbesserungsfaktor v_{direct}/v_0 ist reziprok proportional zur NADPH-Konzentration. Das ist der Grund für die Erhöhung der Reaktionsrate bei geringeren NADPH-Konzentrationen. Hierbei dominieren die Ereignisse der direkten Assoziation im Vergleich zur indirekten. Umgekehrt sind die Assoziationen aus der Bulkphase bei höherer NADPH-Konzentration wahrscheinlicher als die direkte Assoziation. Eine Nahordnung der Enzymkaskade zur Verringerung der Diffusionswege und somit der Assoziationskonstante von NADPH würde also eine Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit der ersten Reduktion ergeben. Speziell bei geringen NADPH-Konzentrationen profitiert das System von der Nahordnung der Enzyme.

Dieser Effekt wird in dieser Arbeit durch die Berechnung die NADPH Assoziation solcher Systeme mit GeomBD untersucht. In einem ersten Schritt wurde die Assoziation aus der Bulkphase berechnet, da diese ebenfalls für die Bestimmung der direkten AGK benötigt wird. In einem weiterführenden Schritt wurde die direkte Assoziation von einem GDH(ST) Enzym mit unterschiedlichen Abständen zwischen den Enzymen untersucht und bewertet.

2.4.4 Indirekte Assoziation

Die indirekte Assoziation wurde für den Rezeptor Gre2-HOB mit dem Liganden NADPH untersucht. Im Folgenden wird das Vorgehen bei der Simulation eines Rezeptor-Liganden-Systems nach Abbildung 2.12 beschrieben. NADPH wurde mit dem SMILES-Code (PubChemID: 5884) mit Avogadro erstellt. NADPH wurde anschließend mittels Avogadro energetisch minimiert. In AMBER wurden die Partialladungen der Atome mit dem 14SB Kraftfeld berechnet und in die Datenbank von GeomBD eingebunden.

Der Rezeptor ist ein fusioniertes Enzym aus der KRED Gre2 (PDBID: 4pvd) (Guo et al. 2014) und dem HOB-Tag (PDBID: 6U32) (Deo et al. 2021). Die Proteinstruktur wurde über die RCSB-Protein-Datenbank bezogen. Fehlende Wasserstoffatome wurden mit MolProbity hinzugefügt. Die beiden Moleküle wurden mit einem GGGGS-Linker (Chen et al. 2013), erzeugt in Pymol (Schrödinger und Warren DeLano), am C- bzw. N-Terminus verbunden. Das entstehende Fusionsprotein wurde mit MD-Simulationen energetisch minimiert und ist in Abbildung 2.14 dargestellt. NADPH geht nach MD-Simulationen von Guo et al. mit LYS169 der Gre2 eine Bindung ein (Guo et al. 2014). Die entsprechende Bindetasche ist als ein grünes Kugelvolumen mit einem Radius von 15 Å visualisiert. Die Assoziation gilt als erfolgreich, wenn sich das Zentrum des diffundierenden NADPH Molekül innerhalb des grünen Volumens befindet.

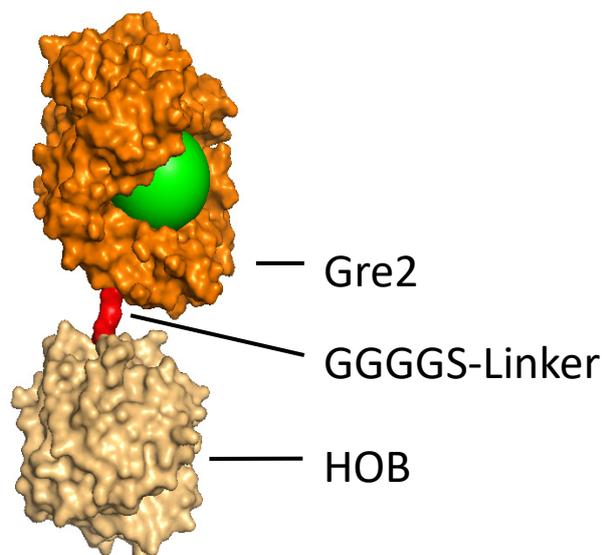


Abbildung 2.14 Darstellung der Oberflächen des Gre2-HOB Fusionsproteins mit gefärbten Oberflächen zur Identifizierung der Komponenten. Orange: Gre2 mit der Bindetasche (Grün); Rot: GGGGS-Linker; Beige: HOB.

Die Struktur des Fusionsproteins zeigt eine Orientierung der Bindetasche. Dadurch haben die Liganden abhängig von ihrer Startkoordinate unterschiedliche Diffusionswege und Wahrscheinlichkeiten zur Assoziation. Der GGGGS-Linker definiert den Abstand der beiden Proteine und ermöglicht eine Rotation der beiden Proteine zueinander und gibt somit der Orientierung der Bindetasche einen Freiheitsgrad.

In der Vorbereitung der Simulation wurden LJ-, ES- und EX-Potentialgitter erstellt. Die Liganden werden auf einem Startradius von $b = 100 \text{ \AA}$ erstellt und treten bei einer Entfernung von $q = 300 \text{ \AA}$ aus dem Simulationsvolumen aus. Zur Untersuchung unterschiedlicher Einflüsse von Kraftfeldern wurden die Kombinationen: ES+EX und ES+LJ untersucht. Die Simulationen wurden mit 10.000 zufällig positionierten Liganden auf einem Hochleistungs-Computercluster (BwForCluster) durchgeführt (Details in Kapitel A5). Aufgrund des stochastischen Charakters der Modellierungsmethode wurden die Berechnungen dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.15 dargestellt. Die Berechnung von knapp 140000 Liganden ergab eine konvergierte AGK von $7,51 \pm 0,15 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Konvergenzkriterium: $2e-3$). Über die Steigung des Verhältnisses von Bindeereignissen zur Zahl der Ereignisse (Abbildung 2.15 C) berechnet sich das Assoziationsverhältnis β zu 0,0164.

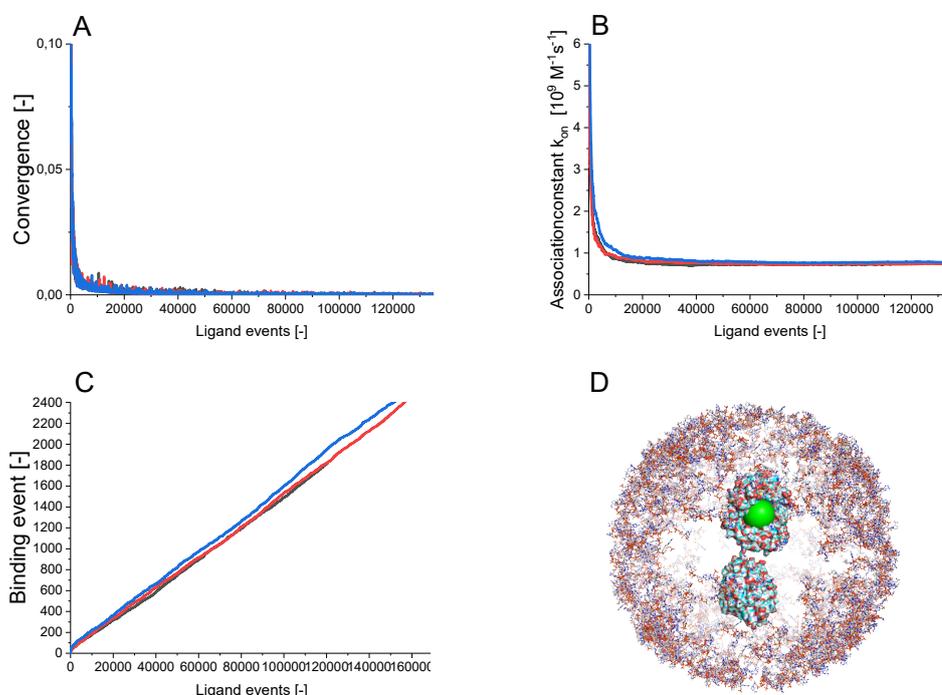


Abbildung 2.15 Diagramme der indirekten Assoziationsberechnungen bezogen auf alle Ereignisse (Assoziation und Austritt). A: Konvergenzverhalten der Rechnungen; B: indirekte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} ; C: Anzahl der Bindeereignisse zu den gesamten Ereignissen; D: Start der Simulation mit auf einer Kugel zufällig verteilten NADPH Molekülen an Gre2-HOB mit der Bindetasche (Grün).

Die Simulationen mit ES und EX-Potentialfeld zeigen ein lineares Verhalten der Bindungs- und der gesamten Ereignisse (Abbildung 2.15 C) und damit ein konstantes Assoziationsverhältnis β . Untersuchungen des LJ-Potentials resultieren in Assoziationen von Liganden an ungewollten Positionen der Enzymoberfläche, die den Rechenaufwand erhöhen. Diese Liganden werden nicht als assoziiert angenommen, sodass ihre Bewegung weiterhin berechnet wird. Wie in Abbildung 2.16 dargestellt, halten die LJ-Kräfte die Liganden fest und verhindern somit ein Austreten oder eine Assoziation.

Die mit dem LJ-Potential verbundenen, schwachen VdW-Kräfte verringern danach die Assoziationsrate, was den Ergebnissen aus der Literatur widerspricht. Dort wird ein verstärkender Effekt beobachtet (Roberts und Chang 2016). Dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit als Artefakt der Simulation festgehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Lösung für dieses Phänomen gefunden, weswegen in den weiteren Berechnungen lediglich die abgeschirmten, elektrostatischen Wechselwirkungen berücksichtigt werden.

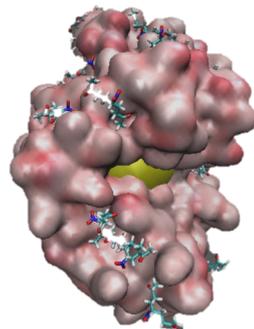


Abbildung 2.16 Bindung an der Enzymoberfläche von Gre2-HOB mit der entsprechenden Bindetasche (Grün) unterschiedlicher Liganden.

2.4.5 DNA-Origami-Nanostrukturen (DON) mit Enzymkaskaden

Auf der molekularen Ebene lassen sich mittels DONs Nahanordnungen von Enzymkaskaden untersuchen. Diese Systeme profitieren von erhöhten, lokalen Enzymkonzentrationen und können durch *substrate channeling* die Reaktionsraten des Systems erhöhen. Basierend auf den experimentellen Untersuchungen von T. Burgahn (Burgahn 2019) werden in dieser Arbeit DONs erstellt und mit Enzymen besetzt. Um eine Einheitlichkeit des betrachteten Reaktions- bzw. Enzymsystems zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit die Gre2-HOB und GDH(ST)-SC auf DNA-Strukturen künstlich platziert und untersucht.

Die Erstellung eines Gesamtkomplexes (Supramolekül) aus DONs und den Enzymen der Enzymkaskade wurde mit einem Python-Skript automatisiert. Details über das Skript und dessen Anwendung sind im Anhang A6 dargestellt. Mit dem Skript werden planare 50x50 nm DONs mit zwei unterschiedlichen Enzymen gebildet. Dafür werden die entsprechenden Enzyme und ein DNA-Molekül benötigt. Grundlegend für die DON wurde mit AMBER (Case et al. 2005) eine Beta-Helix Struktur mit der Länge 50 nm erstellt. Die Partialladungen der Atome des DNA-Moleküls wurden mit AMBER berechnet (siehe Anhang A6) und in GeomBD eingepflegt. Das Fusionsenzym Gre2-HOB aus Kapitel 2.4.4 wurde als Zielenzym genutzt. Das NADPH-Regenerationsenzym GDH (Tetramer) wurde von einer Proteindatenbank (PDBID: 1GCO) (Yamamoto et al. 2001) bezogen und mit dem ST (ST/SC PDB: 2X5P) (Oke et al. 2010) anstelle der Aminosäuren

D202 und P203 in ein GDH Molekül eingebaut (Burgahn 2019). Das Fusionsenzym GDH(ST)-SC wurde energetisch minimiert und ist in Abbildung 2.17 dargestellt. Fehlende Atome der verwendeten Moleküle wurden mit MolProbity hinzugefügt (Williams et al. 2018). Die PDB-Datei beinhaltet gebundenes NADP+, welche die gleiche Bindetasche mit NADP+ teilt. Die NADP+ Atome wurden entfernt und ausgehend von ihrer Position wurden die Startpositionen (SP) definiert. Die Startpositionen SP1 bis SP4 wurden radial vom GDH-Mittelpunkt um 5 μm nach außen verschoben, um ein Überlappen der Moleküle zu vermeiden. Die Hauptachsen für Gre2-HOB und GDH(ST)-SC wurden ermittelt und orthogonal zur DON ausgerichtet. Durch Rotation um die Hauptachse (Vertikale in Abbildung 2.17) ist eine Orientierung der SPs und der Bindetasche möglich.

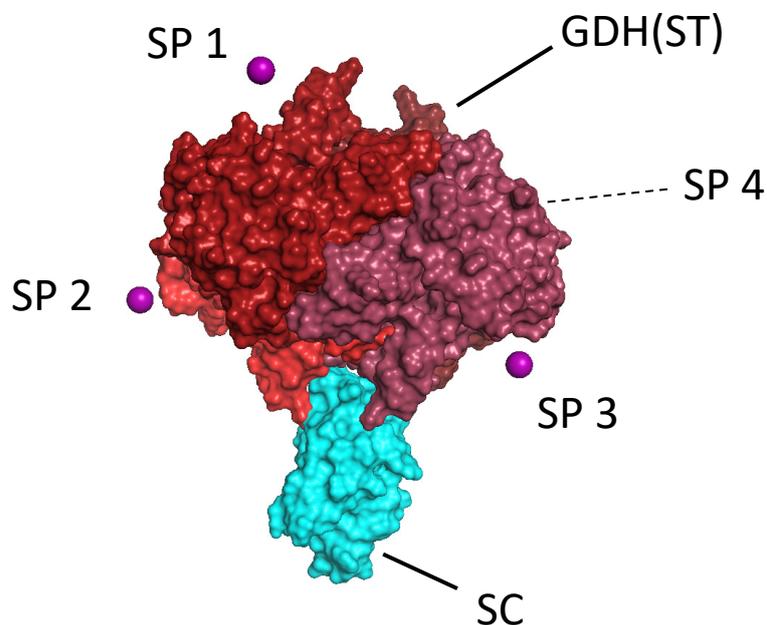


Abbildung 2.17 Darstellung von GDH(ST) mit SC. Das Tetramer GDH (Rottöne) ist mit dem ST fusioniert und mit dem SC (Türkis) verbunden. Drei Startpositionen SP 1-3 sind als lila Kugeln dargestellt. Die vierte Startposition ist von der GDH verdeckt.

Ein 50 nm langer DNA-Strang wurde kopiert und verschoben, so dass eine quadratische DON entsteht, siehe Abbildung 2.18 A. Anschließend wurden die Enzyme auf der DON platziert. Der Abstand zwischen den Enzymmittelpunkten d_{enz} wird durch die Position von GDH (Rot) definiert. Eine Energieminimierung des kompletten Systems ist aufgrund der Größe nicht durchgeführt worden. Der Linker zwischen den Enzymen ermöglicht eine Rotation der Enzyme um ihre Hauptachse (orthogonal zur DON), was in den Simulationen Berücksichtigung fand.

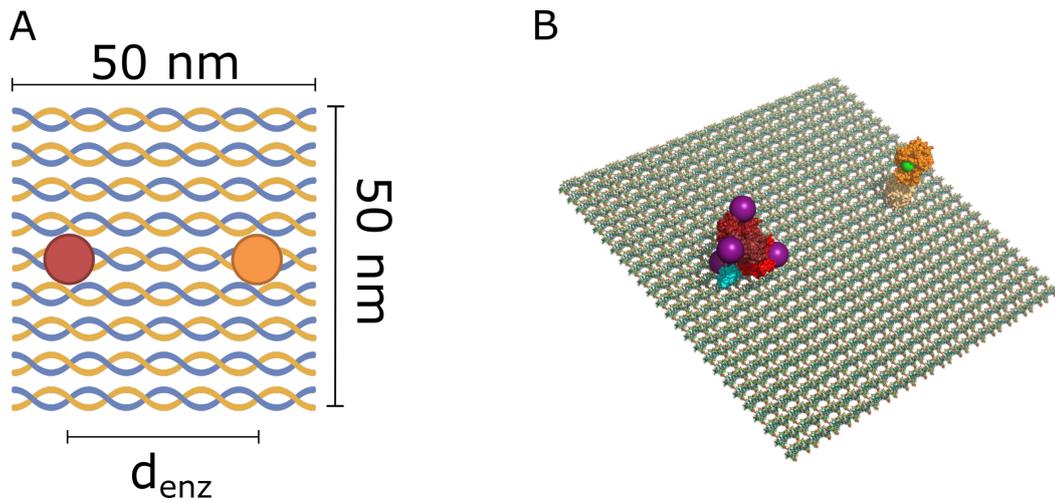


Abbildung 2.18 Aufbau des DON-Enzymkaskaden-Systems mit Draufsicht. A: Schematischer Aufbau der DON mit verschobenen DNA-Molekülen, GDH (roter Kreis) und Gre2 (orangener Kreis) im Abstand d_{enz} . B: Zusammengesetztes Supramolekül mit GDH(ST)-SC (Rot) und Gre2-HOB (Orange) auf einer DON für einen Abstand d_{enz} von 30 nm. Die vier Startpositionen (Lila) und die Zielbindetasche (Grün) sind als Kugeln dargestellt.

Sowohl der Abstand und die Orientierung der Enzyme als auch die DON können einen Einfluss auf den Diffusionsweg von NADPH haben und wurden in dieser Arbeit untersucht. Unterschiedliche Supramoleküle wurden erstellt und mit GeomBD parametrisiert und berechnet. Für den Abstand d_{enz} wurden Werte von 10, 20 und 30 nm untersucht. In der Rotationsuntersuchung wurden die Orientierungen der Bindetasche von Gre2-HOB für 0° , 90° , 180° und 270° untersucht und sind in Abbildung 2.19 dargestellt. Die Rotation von GDH(ST)-SC wurde aufgrund der unterschiedlich orientierten Startpositionen nicht untersucht. Für alle Abstände und Orientierungen wurden komplementäre Fälle mit und ohne DON zur Ermittlung des Einflusses der DON erstellt. Die entstandenen Supramoleküle bestehen aus 240.000 Atomen mit DON und 16.000 Atomen ohne DON. Insgesamt wurden 24 Supramoleküle produziert und für die Simulation der direkten Assoziation mit GeomBD vorbereitet.

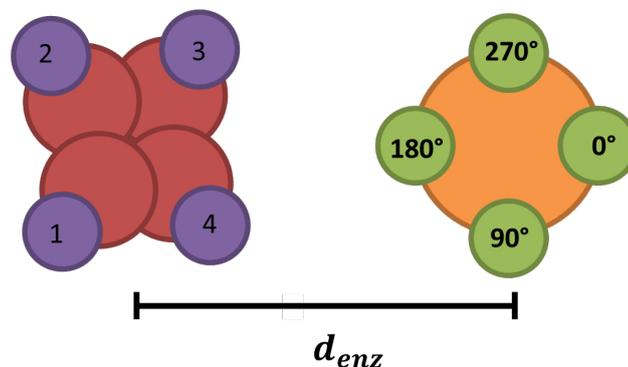


Abbildung 2.19 Orientierung der Bindetasche (Grün) von Gre2-HOB (Orange) für die Winkel zwischen 0° und 270° . Die Startpositionen 1-4 (Lila) von GDH(ST) (Rot) bleiben fest für unterschiedliche Orientierungen und Abstände d_{enz} .

2.4.6 Einflüsse von Nahordnungen

Die erstellten Supramoleküle (Kapitel 2.4.5) wurden zur Berechnung der direkten TGK k_{direct} genutzt. Nach der Parametrisierung der Supramoleküle wurden die Potential-Gitter (ES, LJ und EX) für NADPH (Kapitel A5) berechnet. Für die Berechnung der direkten Assoziation werden NADPH-Moleküle an den Startpositionen 1-4 erstellt und ihr Diffusionsverhalten zur Bindetasche an Gre2 untersucht. Von jeder Startposition werden 1000 NADPH-Moleküle gleichzeitig erzeugt. Nach einem Bindeevent oder einem Austrittsevent bei einem Abstand von $q = 50 \text{ nm}$ wird ein neuer Ligand an der Startposition erzeugt. Die direkten TGK werden für jede Startposition berechnet (Gl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die kombinierte, direkte TGK aus allen vier Startpositionen berechnet sich aus deren Mittelwert. Aufgrund der Größe der Supramoleküle benötigen die Fälle viel Zeit, um den Diffusionsprozess und die Assoziation zu berechnen. Alle Simulationen wurden dreifach auf dem BwForCluster NEMO (Details in Kapitel A5) durchgeführt und mit Hilfe von Matlab analysiert. Die resultierenden Werte der TGK k_{direct} für unterschiedliche Abstände (A-C), Gre2-HOB Orientierungen, sowie mit und ohne DON sind in Abbildung 2.20 dargestellt.

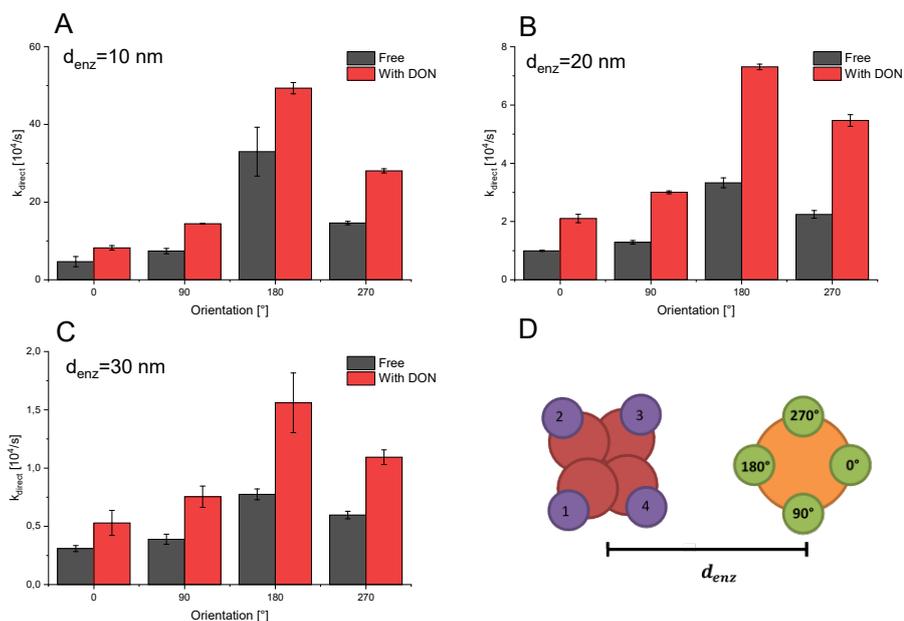


Abbildung 2.20 Ergebnisse der GeomBD Simulation mit und ohne DON: Direkte Transferratekonstante k_{direct} für die Abstände d_{enz} von 10 nm (A), 20 nm (B) und 30 nm (B) für unterschiedliche Orientierungen der Bindetasche (0°-270°). D: Visualisierung der Orientierung und des Enzymabstands d_{enz} .

Der Einfluss der Orientierung beschreibt ein abstandsunabhängiges Verhalten. Bei der Ausrichtung der Bindetasche zum Regenerationsenzym finden die meisten Assoziationen statt, da der Diffusionsweg von allen Startpositionen aus der geringste ist. Bei den Simulationen wurde eine verringerte

Assoziationswahrscheinlichkeit für die 90°-Orientierung beobachtet. Unter der Annahme eines symmetrischen, kugelförmigen Enzyms müsste die direkte Assoziation für die Orientierung von 90° und 270° gleich sein. Die geringere TGK für 90° weist auf eine Hinderung oder verlängerte Diffusionswege der Liganden für die Konfiguration von 270° hin.

Die Anwesenheit der DON verstärkt die direkte Assoziation in allen Fällen. Dieses Verhalten hat seinen Ursprung einerseits in der negativen Ladung der DON, aber auch in der sterischen Hinderung der Diffusion der Liganden durch die DON. Wie erwartet hat die Entfernung der Enzyme einen großen Einfluss auf die direkte TGK. Unter der Annahme, dass jede Orientierung der Gre2-HOB gleich wahrscheinlich ist, wurde eine durchschnittliche, direkte TGK k_{direct} berechnet. Die beobachtete AGK k_1^{app} , bezogen auf die indirekte AGK aus Kapitel 2.4.4, setzt sich aus der AGK und der TGK zusammen. Die AGK bezieht sich auf die NADPH-Konzentration im Bulk (0,5 mM). Bei einem Abstand von 10 nm zeigt sich eine Erhöhung der allgemeinen Assoziationsrate um 150%. Mit vergrößertem Abstand der Enzyme verringert sich die gemittelte, direkte Assoziationskonstante und somit verringern sich auch die Vorteile durch die Nahanordnung. Bei einem Abstand von 30 nm wird der gesamte Assoziationsprozess um 6% beschleunigt. Des Weiteren verringert sich der Effekt der DON verglichen mit freien Enzymen. Die Vorteile der DON minimieren sich mit großem Abstand der Enzyme und stellen nochmals die Wichtigkeit einer exakten Positionierung der Enzyme auf den DONs dar.

Tabelle 2.9 Gemittelte direkte TGK, der beobachtete AGK bezogen auf die indirekte Assoziation ($7,51 \cdot 10^8 M^{-1}s^{-1}$) (Kapitel 2.4.4) bei einer NADPH Bulk-Konzentration von 0,5 mM und Anfangsreaktionsrate v_0 der ersten Reduktion für die Gre2 Kinetik, Konzentration aus Kapitel 2.3.3.

Abstand d_{enz}	10 nm	10 nm	20 nm	20nm	30nm	30nm
DON	-	✓	-	✓	-	✓
$\bar{k}_{direct} [10^5 s^{-1}]$	1,492	2,501	0,196	0,447	0,052	0,098
$\frac{k_1^{app}}{k_{indirect} \left(1 + \frac{\bar{k}_{direct}}{k_{indirect}[A]} \right)}$	1,398	1,667	1,053	1,119	1,0161	1,026
$\frac{v_{0,red,direct}}{v_{0,red}}$	1,2041	1,3153	1,052	1,119	1,0158	1,0235

Die Auswirkungen der erhöhten Assoziationsrate wurden für die verwendeten Reaktionsmechanismen (Kapitel 1.1.1.2) und Parameterschätzwerten (Kapitel 2.3.3) berechnet. Die Reaktionsrate erhöht sich für alle Fälle. Die größte Verbesserung der Reaktionsrate ist beim Abstand von 10 nm zu beobachten (131,5 %). Hierbei ist zu vermerken, dass bei diesem Vergleich der mögliche Aktivitätsverlust der Gre2 durch die

Immobilisierung auf den DONs nicht berücksichtigt wird. In der Arbeit von T. Burgahn wurde ein Aktivitätsverlust von etwa 80% durch die Immobilisierung auf DONs der Gre2-HOB festgestellt (Burgahn 2019). Sie untersuchte die Anordnung der Gre2 mit dem Regenerationsenzym ICDS bei Abständen von 30 nm und 6 nm. Durch die Verringerung des Abstands konnte ein mehr als doppelt so hoher Umsatzgrad beobachtet werden. Da das Regenerationssystem sich zwischen der theoretischen und den experimentellen Untersuchungen unterscheidet, sind Unterschiede zu erwarten. In den hier berechneten Reaktionsraten ist eine Steigerung von ca. 30% bei einer Verringerung des Abstandes von 30 auf 10 nm zu beobachten. Ein Grund dafür ist einerseits, dass die hier aufgeführte Untersuchung keinen Verlust der Enzymaktivität durch die Immobilisierung berücksichtigt. Andererseits beschränkt sich die Berechnung der Reaktionsraten lediglich auf den Effekt der direkten Assoziation von NADPH und GDH mit Gre2, während die Assoziationen anderer Substrate und die Dissoziation von Produkten auch von den DONs beeinflusst werden können. Schließlich bezieht sich die Simulation auf starre Körper, was zur Folge hat, dass Konformationsänderungen durch Liganden sowie Interaktionen zwischen einzelnen Liganden nicht in Betracht gezogen wurden. Diese Vereinfachungen könnten in zukünftigen Berechnungen, die auf einer hybriden Simulation von MM und QM basieren, berücksichtigt werden (Senn und Thiel 2009).

Eine Beschreibung des gesamten Reaktionssystems mit immobilisierten Enzymen auf DONs ist komplex und bedarf einer Betrachtung aller Assoziations- und Dissoziationsprozesse. Die Grundstrukturen zur Fall- und Supramolekülerstellung sind in dieser Arbeit dargestellt und erlauben auch die Untersuchung anderer Assoziationen bzw. anderer Enzymsysteme. Enzymverhältnisse und andere DON-Formen können weiterhin einen Einfluss auf das Reaktionssystem haben (Chen und Silver 2012). Diese Maßnahmen ermöglichen eine weiter detaillierte Optimierung auf der molekularen Ebene. Trotz der Verbesserungen der Enzymkaskaden auf DONs ist deren Einsatz aufgrund der hohen Herstellungskosten und aufwendigen Verfahren noch offen (Keller und Linko 2020).

2.5 Zusammenfassung

Dieses Kapitel befasst sich mit der Charakterisierung eines enzymatischen Reaktionssystems, welches eine stereoselektive Reduktion mit einer Cofaktor-Regenerierung beinhaltet und legt die Grundlagen für deren mathematische Modellierung. Außerdem werden Methoden der Immobilisierung der Enzymkaskade im Hinblick auf die Applikation im Flussreaktor dargestellt und mit der in dieser Arbeit untersuchten Methode verglichen. Experimentelle Studien (durchgeführt von IBG-1) wurden genutzt, um intrinsische kinetische Parameter der Fusionsenzyme (Enzym mit Immobilisierungstag) zu schätzen, welche als Basis der Reaktorberechnung und für Studien zu möglichen Einflüssen durch die Immobilisierung dienen. Das Verhalten der Reaktionen konnte mit einer Multisubstratkinetik basierend auf einer modularen Kinetik von Liebermeister et al. (Liebermeister et al. 2010) beschrieben werden.

Eine Brown'sche Dynamik-Modellierung wurde genutzt, um die Nahordnung der beteiligten Enzyme auf einer DNA-Origami-Nanostruktur (DON) zu untersuchen. Über die Newtonsche Beschreibung des Molekülsystems über Kugelmassen und Federkräfte ermöglicht das Softwarepaket GeomBD die Simulation von Assoziationsprozessen (direkte und indirekte Assoziation) von großen Molekülsystemen unter Berücksichtigung elektrostatischer und VdW-Kräfte.

Kristallographische Strukturen wurden verwendet, um Supramoleküle mit Enzymkaskaden auf DONs zu erstellen und die Auswirkungen der DONs sowie des Abstands und der Orientierung zwischen GDH und Gre2 Enzymen auf die Assoziation des Cofaktors (NADPH) an Gre2 zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass die Ladung der DONs in Kombination mit ihrer sterischen Hinderung die Assoziationsgeschwindigkeit von NADPH erhöhen. Mit geringeren Abständen erhöht sich der Einfluss der Nahordnung und somit der direkten Assoziation. Dies ermöglicht eine theoretische Verstärkung der Reduktionsgeschwindigkeit um bis zu 30% mit DON und 15% ohne DON. Aufgrund der längeren Diffusionswege verringert sich die Verstärkung mit größeren Enzymabständen. Sie ist bei einem Abstand von 30 nm kaum merklich. Diese Ergebnisse zeigen das Potential und die Grenzen der Kompartimentierung mithilfe der DNA-Nanotechnologie. Zukünftige Studien könnten den Einfluss von Enzymverhältnissen und der Form der Nanostruktur auf die beobachteten Reaktionsraten untersuchen. Dies würde eine weitere Optimierung auf molekularer Ebene ermöglichen.

3 Geometrische Reaktoreigenschaften

Das in Kapitel 2 beschriebene Reaktionssystem zur selektiven Reduktion von NDK mit Cofaktor-Regeneration wurde in dieser Arbeit in einem Mikroreaktor theoretisch und in Kooperation mit dem IBG-1 auch experimentell untersucht. In diesem Kapitel wird auf die geometrischen Eigenschaften des Reaktorsystem eingegangen, die den Experimenten und den makroskopischen Reaktormodellierungen zugrunde liegen. Die Enzyme werden auf paramagnetischen Partikeln immobilisiert, welche mit Magneten im Reaktor gehalten werden. Dieses Kapitel befasst sich mit den Eigenschaften des Reaktorchips sowie dem überströmten Partikelbett. Der Reaktor und das Partikelbett wurden mit einem 3D-Profilometer (Sensors S neox) auf deren charakteristische Eigenschaften untersucht (Kapitel 3.4). Um den Bildungsprozess des Partikelbetts zu berechnen, wurden Simulationen durchgeführt. Die Bewegung der Partikel bei der Befüllung des Reaktorkanals wurde mit OpenLB simuliert. Das dafür nötige Magnetfeld wurde mit COMSOL® berechnet.

Die erhaltenen Erkenntnisse über Schichtdicke und Porosität bilden die Grundlage für die anschließende mathematische, modellhafte Beschreibung des Reaktorsystems.

3.1 Reaktorbeschreibung

Der untersuchte Reaktor ist ein Kunststoffchip aus Polymethylmethacrylat (PMMA) der Firma „Microfluidic Chipshop“ (Microfluidic ChipShop 2021) (Abbildung 3.1). Der Chip beinhaltet vier identische, gerade Kanäle mit einem rechteckigen Querschnitt und den Maßen 58,5 mm x 0,2 mm x 1 mm (Länge x Höhe x Breite). Eingespannt auf einer temperierten Messingplatte wird der Chip mittig in einer Aussparung positioniert und betrieben. Unter den Reaktorkanälen des Chips befinden sich Vertiefungen in der Messingplatte, in denen acht Neodym-Dauermagnete mit den Maßen 6 mm x 3 mm x 1 mm (Länge x Höhe x Breite) (IBS Magnet 2021) mit alternierender Orientierung der magnetischen Pole festgeklebt sind. Die Magnete und das induzierte Magnetfeld ermöglichen ein Halten magnetischer Partikel im Reaktor. Bei dem Beladungsvorgang wird eine wässrige Suspension mit magnetischen Partikeln in den Kanal gepumpt und ein Partikelbett bildet sich am Boden des Reaktorkanals über den Magneten.

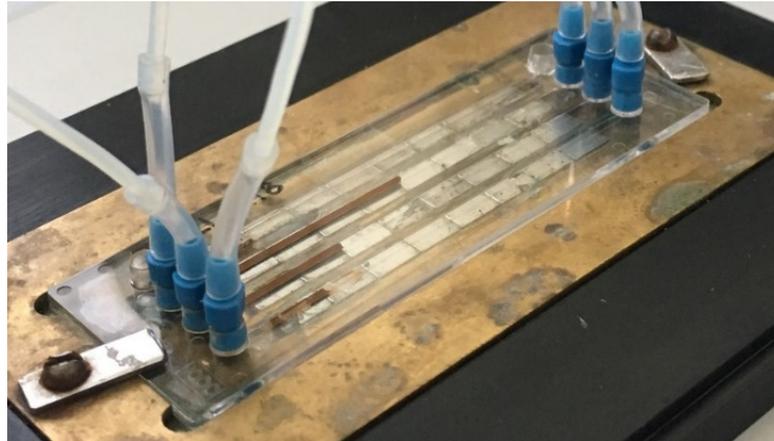


Abbildung 3.1 PMMA-Chip mit vier Mikrokanälen mit unterschiedlicher Menge an magnetischen Partikeln (braun). Der Chip ist auf einer temperierten Messingplatte eingespannt und unter den Kanälen sind acht Neodym Magnete platziert, die die Partikel im Kanal halten.

3.2 Magnetfeld

Der Magnetismus beruht auf den Ladungen und der Ladungsverteilung der Elemente eines Objekts. Entscheidend dafür ist die Elektronenbesetzung der Schalen eines Atoms bzw. Elements. Im Allgemeinen können Elemente in diamagnetisch, paramagnetisch, ferromagnetisch, antiferromagnetisch und superparamagnetisch unterteilt werden. Nach der Atomtheorie und dem Schalenmodell wird zunächst die äußerste Schale mit Elektronen aufgefüllt, bevor die nächste begonnen wird. Jedes Elektron besitzt ein Bahnmoment und einen Spin. Bei manchen Elementen des Periodensystems wird eine neue Schale angefangen, bevor die letzte voll besetzt ist. Diese Elemente befinden sich in der Eisengruppe (Elemente 19-28) und in der Gruppe der seltenen Erden (Elemente 58-71). Das magnetische Moment eines Atoms hat einen Wert größer Null und ist räumlich orientiert. Bei Schalen, die komplett abgeschlossen sind, heben sich die Bahnmomente und Elektronenspins auf. Dieser Effekt tritt bei Elementen mit abgeschlossenen Schalen auf (z.B. Edelgase). Elemente mit einem magnetischen Atommoment von Null werden als diamagnetisch bezeichnet und werden von einem Magnetfeld abgestoßen. Elemente mit permanenten magnetischen Atommomenten größer als Null verhalten sich paramagnetisch in einem Magnetfeld. Das magnetische Moment richtet sich nach dem angelegten Magnetfeld aus und wird von diesem angezogen. Ohne ein Magnetfeld ist das magnetische Moment von Paramagneten ungeordnet. Die Elemente der Eisengruppe sind paramagnetisch und haben aufgrund der ungerichteten Elektronenspins ein großes magnetisches Moment. Benachbarte Atome eines kristallinen Ferromagneten richten sich nach benachbarten Elementen parallel aus. Einzelne Körner eines Ferromagneten (Weiss'sche Bezirke oder Domänen) können unterschiedliche Orientierungen aufweisen, da die Parallelisierung von den Korngrenzen limitiert wird. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden die Elemente als ferromagnetisch (Eisen, lat.: „*ferrum*“) bezeichnet. Wird ein ferromagnetischer Werkstoff von einem starken Magnetfeld beeinflusst, richten sich

die Elementarmagnete der Domänen nach dem Magnetfeld aus und behalten diese Ausrichtung, auch nach Entfernung des Magnetfeldes (Magnetisierung). Kristalline Stoffe, bei denen eine anti-parallele Ausrichtung die Elementarmagnete energetisch begünstigt ist, werden als antiferromagnetisch bezeichnet. Zuletzt kann noch ein superparamagnetisches Verhalten einem Atom zugeschrieben werden. In Präsenz eines Magnetfeldes beeinflussen sich die magnetischen Momente benachbarter Atome, ähnlich wie beim Ferromagnetismus. Nach Entfernen des Magnetfeldes desorientieren sich die Elementarmagnete des Superparamagnetes. Ein solches Verhalten ist auch bei kleinen ferromagnetischen Partikeln zu beobachten (Schüler und Brinkmann 1970).

Ein magnetisches Feld kann mit der Maxwell-Gleichung beschrieben werden und wird durch die magnetische Flussdichte \mathbf{B} charakterisiert. Im Folgenden beziehen sich fett gedruckte Buchstaben auf Vektoren mit drei Dimensionen. Die Flussdichte \mathbf{B} ist abhängig von der Magnetfeldstärke \mathbf{H} , der magnetischen Permeabilität μ_i und der Magnetisierung \mathbf{M} , nach Gleichung 3.1 definiert. Die magnetische Permeabilität beschreibt die Durchlässigkeit von Materie i für magnetische Felder. Die Magnetisierung \mathbf{M} bestimmt wie ein magnetisierbares Material sich im Magnetfeld verhält. Die Homogenität des Feldes wird durch Gleichung 3.2 ausgedrückt

$$\mathbf{B} = \mu_i(\mathbf{H} + \mathbf{M}) \quad 3.1$$

$$\nabla \mathbf{B} = 0 \quad 3.2$$

Die Darstellung von Potentialfeldern wird üblicherweise mit Feldlinien umgesetzt. Die geordneten Feldlinien stellen Orte mit gleichem Potential dar (Abbildung 3.2 A). Dauermagnete haben einen Nord- und Südpol. Die Feldlinien verlaufen vom Nord- zum Südpol. Für einzelne, quadratische Magnete lassen sich die Magnetfeldlinien analytisch berechnen (Camacho und Sosa 2013).

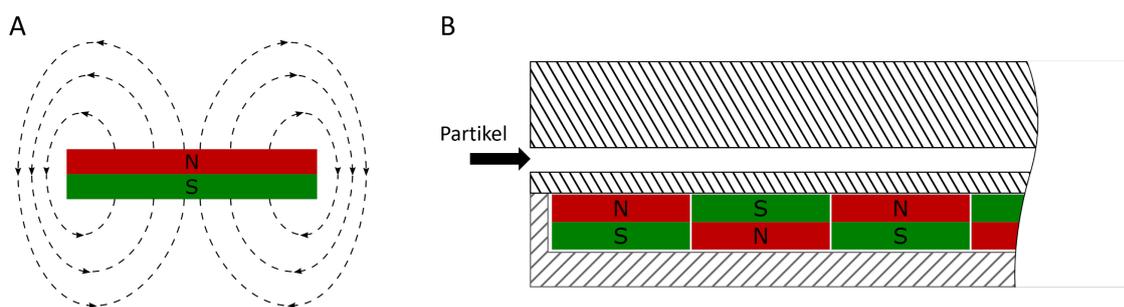


Abbildung 3.2 A: Magnetische Feldlinien eines Dauerstabmagneten. Nord- und Südpol sind mit N und S abgekürzt und farblich dargestellt. B: Alternierende Anordnung der Magnete unter dem Reaktorchip.

Das Magnetfeld des Reaktordesigns in dieser Arbeit ist essenziell für das Halten der superparamagnetischen Partikel im Reaktor und damit für das entstehende Partikelbett. Die Überlagerung der Magnetfelder von acht hintereinander platzierten, alternierenden Neodym-Dauermagneten (NeoDelta NE361, IBS Magnet (IBS Magnet 2021)) macht eine explizite Beschreibung komplex. Die magnetische Orientierung der

Magnete alterniert, wie in Abbildung 3.2 B dargestellt. Dadurch ist die Montage der Magnete durch die Anziehungskräfte zwischen den Nord- und Südpolen benachbarter Magnete vereinfacht. Die Form des Magnetfeldes ist entscheidend für die lokalen magnetischen Kräfte, die auf die superparamagnetischen Partikel wirken.

3.3 Superparamagnetische Partikel

Die magnetischen Partikel *Dynabeads* der Firma Thermo Fischer Scientific (Thermo Fischer 2020) bestehen aus einem Kern aus $\gamma - Fe_2O_3$ und Fe_3O_4 und einer Polymerbeschichtung. Die Partikel sind einheitliche, kompakte Kugeln mit einem Durchmesser von $2,8 \mu m$. Die funktionelle Polymerschicht ermöglicht unterschiedliche Immobilisierungsmethoden und verhindert eine Reaktion der Prozessmedien mit dem Eisenkern. Die Partikel verhalten sich superparamagnetisch und reagieren somit auf ein angelegtes Magnetfeld. Benachbarte magnetisierte Partikel beeinflussen sich zusätzlich gegenseitig und ermöglichen die Bildung von Partikelketten.

Die Magnetisierung von superparamagnetischen Partikeln ist abhängig von der Feldstärke des angelegten Magnetfeldes. Das magnetische Moment einer Partikel orientiert sich an dem Magnetfeld und induziert, abhängig von seiner Magnetisierung M , ein eigenes Magnetfeld. Die Magnetisierung für superparamagnetische Partikel kann mit der Langevin-Funktion (Gl. 3.3) beschrieben werden und erreicht bei einer hohen Feldstärke die Sättigungsmagnetisierung M_0 . Weitere Parameter sind die Dichte ρ und die magnetische Flussdichte \mathbf{B} .

$$M = M_0 \rho \left(\coth(|\mathbf{B}|) - \frac{1}{|\mathbf{B}|} \right) \quad 3.3$$

Eine superparamagnetische Partikel verliert ihren ferromagnetischen Charakter, sobald das angelegte Magnetfeld verschwindet. Das Verhalten der magnetischen Flussdichte und der Partikelmagnetisierung ist in Abbildung 3.3 dargestellt und beschreibt eine Hystereseschleife. Bei den Daten, die in der Arbeit von Fonnum et. al (Fonnum et al. 2005) gemessen wurden, ist keine Remanenz und Koerzitivfeldstärke zu erkennen, was typisch für superparamagnetische Partikel ist.

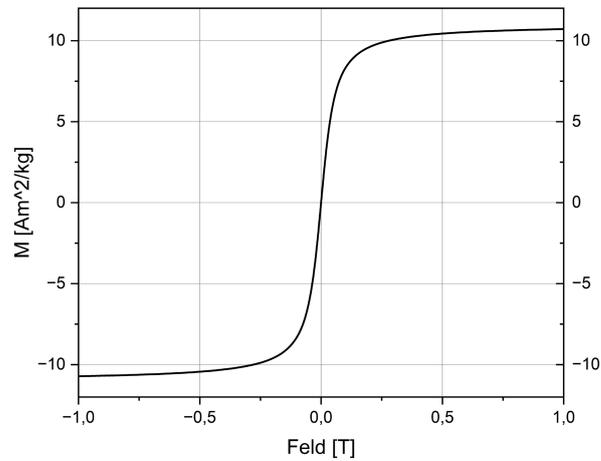


Abbildung 3.3 Hysterese-Schleife der Magnetisierung von Dynabeads M-280 für die magnetische Flussdichte zwischen -1 und 1 T bei Raumtemperatur (Abbildung nach Fonnum et al. (Fonnum et al. 2005)).

Die Größe der Partikel wurde mit REM(Rasterelektronenmikroskop)-Aufnahmen untersucht (vgl. Abbildung 3.4). Die Partikel wurden mit T-TEMg-Puffer gespült und anschließend für die REM-Aufnahmen getrocknet. Die Partikel bildeten während des Trocknungsprozesses Agglomerate, die aus sphärischen Kugeln mit einer rauen Oberfläche bestehen.

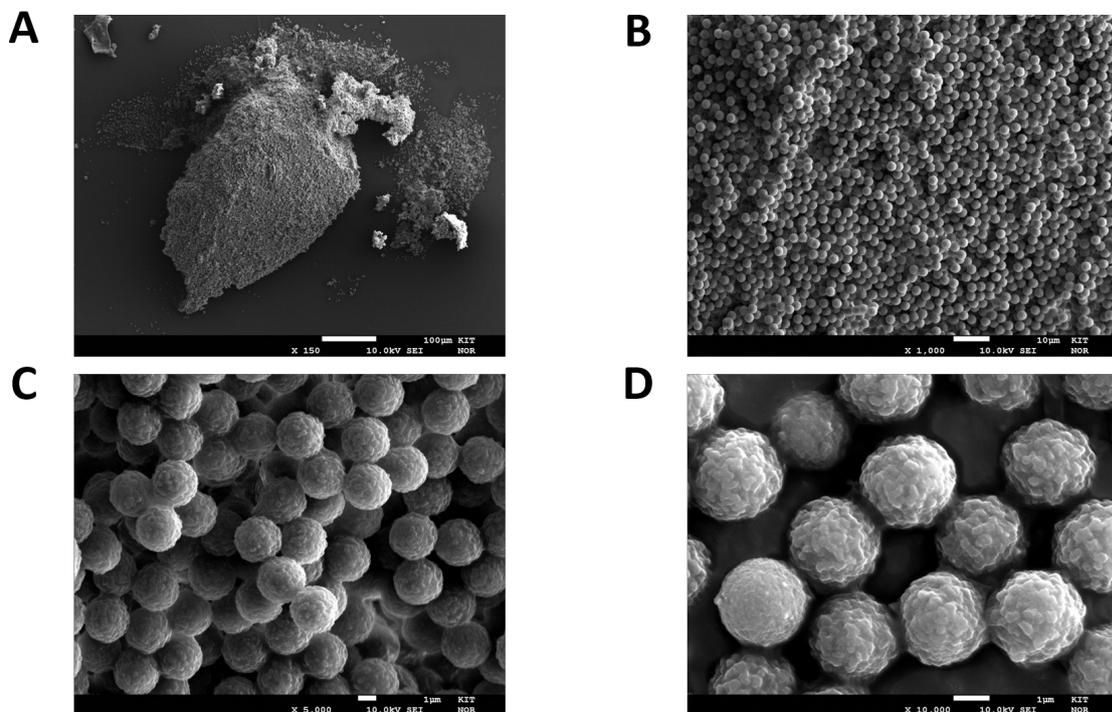


Abbildung 3.4 REM-Aufnahmen mit unterschiedlichen Vergrößerungen (A: x150; B: x1.000; C: x5.000; D: x10.000).

Die REM-Aufnahmen wurden in Matlab mit einer Bildanalyse mit vorhergehenden Bildbearbeitung (Kontrastanpassung und Binarisierung) untersucht (Kapitel A7). Die Anpassung einer Normalverteilung des Partikeldurchmessers ergab einem Mittelwert von $2,65 \mu\text{m}$ und eine Varianz von $0,1 \mu\text{m}$. Dies weicht somit leicht von den Herstellerangaben ($2,8 \mu\text{m}$) ab. Die Verkleinerung der Partikeln und die raue Oberfläche lässt sich auf den Trocknungsprozess zurückführen. Allerdings liegen die Abweichungen im Rahmen der Genauigkeit der Bildanalyse.

Fonnum et al. charakterisierten unterschiedliche Dynabeads mit Röntgenstreuungs-, REM-Analyse, Mössbauer-Spektren und Magnetisierungsmessungen. Die Daten für die untersuchten Dynabeads M-280 wurden in dieser Arbeit genutzt und sind in Tabelle 3.1 aufgelistet (Fonnum et al. 2005).

Tabelle 3.1 Eigenschaften der superparamagnetischen Partikel Dynabeads M-280 nach Fonnum et al. (Fonnum et al. 2005): Partikeldurchmesser d_p , Standardabweichung des Partikeldurchmessers, Dichte ρ_p , Eisenanteil, magnetischen Suszeptibilität bezogen auf die Masse χ_m bzw. auf das Volumen χ_v , Sättigungsmagnetisierung M_0 und spontane Magnetisierung M_s .

Durchmesser d_p [μm]	Abweichung [%]	Dichte ρ_p [$\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$]	Eisen [$\frac{\text{mg}}{\text{g}}$]	$\chi_m \cdot 10^{-5}$ [$\frac{\text{m}^3}{\text{kg}}$]	χ_v [-]	M_0 [$\frac{\text{Am}^2}{\text{kg}}$]	M_s [$\frac{\text{kA}}{\text{m}}$]
2,83	1,4	1,4	118	54	0,756	10,8	336

3.3.1 Kräfte auf superparamagnetische Partikel

Partikel, die sich in einem Newtonschen Fluid befinden bzw. bewegen, erfahren verschiedenste Kräfte (Abbildung 3.5), die zur Berechnung der Bewegung von (superparamagnetischen) Partikeln in einer Strömung mit angelegtem Magnetfeld benötigt werden (Lindner et al. 2013).

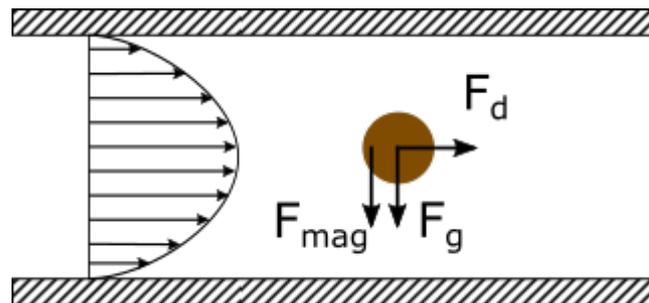


Abbildung 3.5 Wirkende Kräfte auf eine superparamagnetische Partikel in einer Strömung mit angelegtem Magnetfeld.

Strömungskräfte auf eine Partikel bei schleichenden Strömungen ($\text{Re} < 1$) können mit der Widerstandskraft F_d (engl.: *drag force*) für sphärische Partikel beschrieben werden. Sie berechnet sich mit der dynamischen Viskosität η , dem Partikeldurchmesser d_p und der relativen Geschwindigkeit \mathbf{u} wie folgt:

$$\mathbf{F}_d = -3\pi\eta d_p \mathbf{u} \quad 3.4$$

Weiterhin gilt die Gewichtskraft \mathbf{F}_g , unter Berücksichtigung des Auftriebs der Partikeln mit dem Volumen V_p und den Dichten der Partikeln ρ_p und des Fluids (Wasser) ρ_w :

$$\mathbf{F}_g = V_p(\rho_p - \rho_w)\mathbf{g} \quad 3.5$$

Die Kraft auf eine magnetische Partikel ist abhängig von ihrer Größe, dem Unterschied in der magnetischen Suszeptibilität $\Delta\chi_V = \chi_{V,p} - \chi_{V,m}$ (mit $\chi_{V,m} = -9,05 \cdot 10^{-6}$ für Wasser (Arrighini et al. 1968)) sowie dem Gradienten des Magnetfeldes (Pamme 2006):

$$\mathbf{F}_{mag} = \frac{V_p \cdot \Delta\chi_V}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad 3.6$$

Neben der magnetischen Kraft \mathbf{F}_{mag} erfährt die Partikel auch ein Drehmoment \mathbf{T}_m . Die Orientierung des magnetischen Moments der Partikel ist beeinflusst vom anliegenden Magnetfeld und den benachbarten magnetisierten Partikeln. Beim Durchströmen des Kanals ist die Änderung des magnetischen Moments durch eine Rotation der Partikel mit einem Drehmoment umgesetzt. Die Rotation der Partikel hat keinen Einfluss auf die angreifenden Kräfte durch die Strömung, die Erdbeschleunigung oder das Magnetfeld. Das Drehmoment setzt sich aus der Orientierung des magnetischen Moments der Partikel und des Magnetfeldes zusammen:

$$\mathbf{T}_m = \mu_0 V_p \mathbf{M}_P \times \mathbf{H} \quad 3.7$$

Magnetisierte superparamagnetische Partikeln können ein eigenes Magnetfeld induzieren und auf benachbarte Partikel i und j magnetisch und mechanisch einwirken. Hierdurch kann es zu einer Serienordnung der Partikel in Form von Ketten kommen. Wenn sich eine Kette bildet, werden die magnetischen Momente der Partikel in Richtung des Mittelpunkts der benachbarten Partikeln ausgerichtet, entsprechend der Magnetfeldrichtung innerhalb der Kette. Wenn zwei Ketten nebeneinander entstehen, stoßen sich die Ketten aufgrund der gegensätzlichen magnetischen Momente ab, wodurch Lücken zwischen den Ketten entstehen (Jamari et al. 2020).

Die Partikeln üben eine interpartikuläre Kraft und ein Drehmoment aufeinander aus (Satoh et al. 1999):

$$\mathbf{F}_{m,ij} = -\frac{3\mu_0 |\mathbf{M}_i| |\mathbf{M}_j|}{4\pi r_{ij}^4} \left(-(\mathbf{n}_i \cdot \mathbf{n}_j) + 5(\mathbf{n}_i \cdot \mathbf{t}_{ij})(\mathbf{n}_j \cdot \mathbf{t}_{ij})\mathbf{t}_{ij} - [(\mathbf{n}_j \cdot \mathbf{t}_{ij})\mathbf{n}_i + (\mathbf{n}_i \cdot \mathbf{t}_{ij})\mathbf{n}_j] \right) \quad 3.8$$

$$\mathbf{T}_{m,ij} = -\frac{3\mu_0 |\mathbf{M}_i| |\mathbf{M}_j|}{4\pi d r_{ij}^3} (\mathbf{n}_i \times \mathbf{n}_j - 3(\mathbf{n}_j \cdot \mathbf{t}_{ij})\mathbf{n}_i \times \mathbf{t}_{ij}) \quad 3.9$$

In den Gleichungen 3.8 und 3.9 beschreiben die \mathbf{n}_i und \mathbf{n}_j die Orientierungen der magnetischen Momente, r_{ij} ist der Vektor zwischen den Mittelpunkten der Partikeln mit dem Einheitsvektor \mathbf{t}_{ij} .

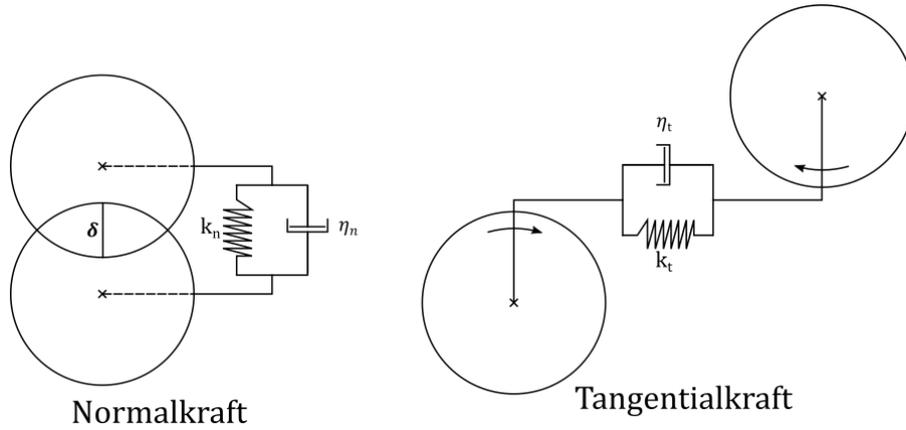


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung der mechanischen Kräfte $F_{n,ij}$ und $F_{t,ij}$, die zwischen zwei Partikeln wirken, wenn diese in Kontakt stehen.

Die Wechselwirkung zwischen zwei superparamagnetischen Partikeln können mit einem Feder-Dämpfer Modell dargestellt werden, welches auf der Überlappungs- oder Komprimierungslänge δ beruht (vgl. Abbildung 3.6). Die Partikel üben aufgrund dieser Überlappung eine mechanische Kraft aufeinander aus, die sich nach einem Federelastizitätsmodell beschreiben lässt (Lindner et al. 2013). Durch diese Betrachtung ist die Berechnung von Haufwerken oder Partikelpackungen möglich. Die Kräfte unterteilen sich in Normal- und Tangentialkräfte mit dem Normal- und Tangentialvektor n_{ij} und t_{ij} . Die Normalkraft wird mit Gleichung 3.10 beschrieben. Neben der Federkonstante k_n (Gl. 3.11), der Dämpfungskonstante $\eta_{n,ij}$ (Gl. 3.12) und der relativen Geschwindigkeit in Normalenrichtung $u_{rel,n,ij}$ beschreibt δ_n die Überlappungslänge der Partikeln in Normalenrichtung. Bei der Berechnung von k und η ist E das Elastizitätsmodul des Partikelmaterials, m die Masse und $c_n = 0,3$.

$$\mathbf{F}_{n,ij} = k_n \delta_n^{3/2} - \eta_{n,ij} \cdot \mathbf{u}_{rel,n,ij} \quad 3.10$$

$$k_n = \frac{E \sqrt{r_p}}{3(1 - \nu^2)} \quad 3.11$$

$$\eta_{n,ij} = -c_n \sqrt{\frac{9}{2} \left(\frac{m_i m_j}{m_i + m_j} \right)} \sqrt{\delta} k_n \quad 3.12$$

Der tangentielle Anteil der mechanischen Kraft berechnet sich aus einem Dämpfungsterm mit der tangentialen Dämpfungskonstante $\eta_{t,ij}$ und der relativen Geschwindigkeit $\mathbf{u}_{rel,t,ij}$. Mit der tangentialen Federkonstante k_t (Gl. 3.14) berechnet sich $\eta_{t,ij}$ (Gl. 3.15) mit dem Schubmodul G (Deen et al. 2007).

$$\mathbf{F}_{t,ij} = -\eta_{t,ij} \cdot \mathbf{u}_{rel,t,ij} \quad 3.13$$

$$k_t = 2 \sqrt{2r_{ij}} \cdot \frac{G}{2 - \nu} \cdot \sqrt{\delta} \quad 3.14$$

$$\eta_{t,ij} = 2 \sqrt{\frac{2}{7} \left(\frac{m_i m_j}{m_i + m_j} \right)} k_t \quad 3.15$$

3.4 Das Partikelbett

Das Partikelbett im Reaktorkanal entsteht aufgrund des Anziehungsfelds, das durch die Dauermagnete induziert wird. Bei voller Beladung werden 4,5 mg superparamagnetische Partikeln im Kanal gehalten, was in einer Gesamtbettlänge von ca. 50 mm resultiert. Die acht Magnete unter dem Kanal haben eine Gesamtlänge von 48 mm. Das Haufwerk steht aufgrund des Magnetfeldes ca. 1 mm vor und nach dem ersten bzw. letzten Magneten über. Die Materialdaten des Herstellers (Thermo Fischer 2020) weisen darauf hin, dass sich bei voller Beladung ca. 280 Millionen Partikel im Reaktor befinden. In Abbildung 3.7 ist die Partikelpackung als braun-rote Schicht sichtbar.

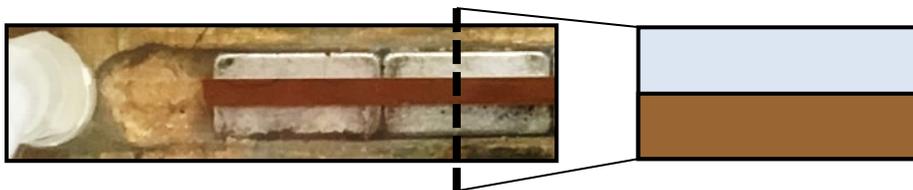


Abbildung 3.7 Beladener Reaktorkanal mit dem Partikelbett (braun) und schematischem Querschnitt in Seitenansicht.

3.4.1 Physikalische Betteigenschaften

Makroskopisch kann die Partikelpackung als poröses Bett oder Schicht betrachtet werden. Das poröse Bett ist durch seine Porosität ε_{bed} und die Tortuosität τ_{bed} charakterisiert. Die Porosität ist das Verhältnis aus dem freien und dem gesamten Volumen des Betts (Gl. 3.16) und nimmt Werte zwischen 0 und 1 an.

Die Tortuosität beschreibt den Grad der Gewundenheit eines Transportweges in der Packung. Gemäß dem Kapillarmodell von Hagen (Hagen 1839) wird die effektive Weglänge l_{eff} , die ein Molekül beim Durchwandern des porösen Volumens zurücklegen muss, durch die Tortuosität in Beziehung zur kürzesten Weglänge l gesetzt (Gl. 3.17).

$$\varepsilon_{bed} = \frac{V_{empty}}{V_{total}} \quad 3.16$$

$$\tau_{bed} = \left(\frac{l_{eff}}{l} \right)^2 \quad 3.17$$

Die Berechnung des Volumens des Partikelbetts kann durch die Masse der Magnetpartikel (*MB* engl.: *magnetic beads*) erfolgen. Das Bettvolumen kann vereinfacht mit der mittleren Betthöhe und der Bettlänge berechnet werden. Durch Form und Größe der Partikeln bzw. Einflüsse der Umgebung können sich unterschiedliche Anordnungen bilden. Abgesehen von natürlich auftretenden Fehlern in Packungen wird zwischen Partikelanordnungen uniformer Partikel unterschieden (analog zu Kristallstrukturen). Die Porosität für verschiedene Kristallstrukturen ist in Tabelle 3.2 aufgelistet: kubisch dichteste Packung (FCC engl.: *face centered cubic*), hexagonal dichteste Packung (HCP engl.: *hexagonal close-packed*), kubisch

raumzentrierte Packung (BCC, engl.: *body centered cubic*), zufällige Packung und kubisch reguläre Packung (SC, engl.: *simple cubic packing*) (Stieß 2009, S. 62).

Tabelle 3.2 Porosität unterschiedlicher Partikelschüttungen bzw. vergleichbarer kristalliner Strukturen: kubisch dichteste Packung (FCC), hexagonal dichteste Packung (HCP), kubisch raumzentrierte Packung (BCC), einer zufälligen Packung und einer kubisch regulären Packung (SC).

Kristalline Struktur	FCC/HCP	BCC	Zufällig	SC
Porosität ε [-]	0,259	0,320	0,37	0,476

Beim Beladungsvorgang wird eine definierte Menge an magnetischen Partikeln m_{MB} in den Kanal gepumpt. Die Anzahl der zugeführten Partikeln ergibt sich aus der Dichte ρ_{MB} und dem Partikelvolumen V_{MB} (vgl. Gl. 3.18).

$$N_{ges} = \frac{m_{MB}}{\rho_{MB} V_{MB}} \quad 3.18$$

Mit der Annahme eines homogenen Partikelbetts kann das Volumen und die durchschnittliche Bettdicke berechnet werden. Die maximale Schichtdicke ergibt sich aus der Breite, der effektiven Länge des Partikelbettes und dem Partikeldurchmesser d_p für ideal gestapelte Partikel. Diese Dicke entspricht der kubisch regulären Packung (SC) (vgl. Gl. 3.19).

$$d_{bed,SC} = \left(N_{ges} \frac{d_p^2}{B \cdot L_{eff}} \right) \cdot d_p \quad 3.19$$

$$d_{bed,i} = d_{bed,SC} \frac{1 - \varepsilon_{SC}}{1 - \varepsilon_i} \quad 3.20$$

Mit Gleichung 3.20 kann diese Schichtdicke für die anderen Packungsarten mit der entsprechenden Porosität umgerechnet werden. Für eine kubisch reguläre Packung und eine Partikelmasse von 4,5 mg mit einer Bettlänge von 48,5 mm ermittelt sich die durchschnittliche Betthöhe zu $d_{bed,SC} = 125 \mu m$. Mit der entsprechenden Porosität einer Packung lässt sich eine durchschnittliche Schichtdicke berechnen. Für eine dichteste Kugelpackung ergibt sich beispielsweise eine durchschnittliche Schichtdicke von $d_{bed,FCC} = 88 \mu m$.

3.4.2 Optische Partikelbettuntersuchung

Die Form des Partikelbetts im Kanal wurde mit Hilfe von optischen Messmethoden untersucht. Einzelne beladenen Kanäle wurden mit einem 3D-Profilometer betrachtet (Sensofar S neox) (Sensofar 06.07.21). Eine Übersicht über die Funktionsweise und die verwendeten Einstellungen ist in Anhang A8 gegeben. Die Partikelmenge von 4,5 mg (M-280) wurde in einer wässrigen Suspension in den Kanal mit $10 \mu L/min$ gepumpt. Nach dem Beladen wurden die Mitte und der Anfang des Partikelbettes optisch analysiert. Das Ergebnis der optischen Untersuchung der Mitte eines Kanals ist in Abbildung 3.8 A dargestellt.

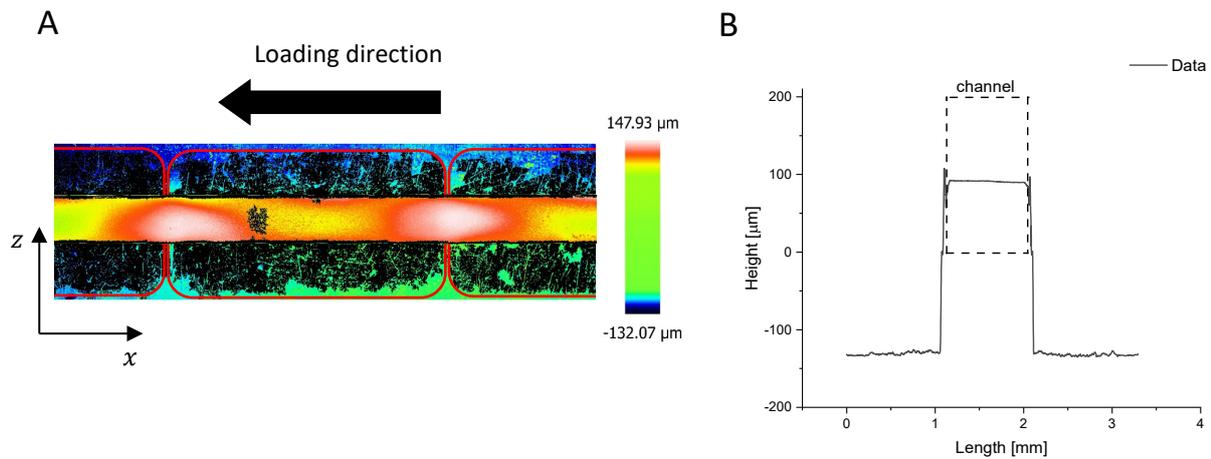


Abbildung 3.8 A: Optische Messung der Partikelschicht in der Draufsicht der Mitte des Kanals über drei Magnete. Die Magnete unter dem Reaktorkanal sind mit roten Umrandungen gekennzeichnet. Zur Darstellung der Höhenunterschiede des Betts ist die Farbskala angepasst (nichtlinear). B: Durchschnittliche Höhe über die Länge von einem Magneten (in z-Richtung) des Partikelbettes aus A. Der Querschnitt des Kanals wurde eingezeichnet (gestrichelt).

Die Partikelschicht bildet gleich hohe Hügel über den Kontakten zweier Magneten (rote Kästen). Mit der Software SensoSCAN (Sensofar 06.07.21) wurden die optischen Messungen analysiert. Die durchschnittliche Höhe des Partikelbettes wurde über die Länge eines Magneten (in x-Richtung) berechnet (Abbildung 3.8 B). Mit einem visuellen Bezugspunkt (Höhe 0) des Bodens des Kanals wurde eine durchschnittliche Betthöhe zwischen zwei Hügeln bzw. zwischen dem Anfang und dem Ende des Magneten von $99 \mu\text{m}$ errechnet. Eine leichte Erhöhung in negativer z-Richtung des Betts ist zu erkennen, die auf eine schräge Lage des Chips oder der Magnete zurückzuführen ist. Die Anhäufungen deuten große magnetische Kräfte über den Magnetübergängen an.

Wie sich das Partikelbett am Anfang des Reaktors durch die magnetische Kraft gestaltet, ist in Abbildung 3.9 B gezeigt.

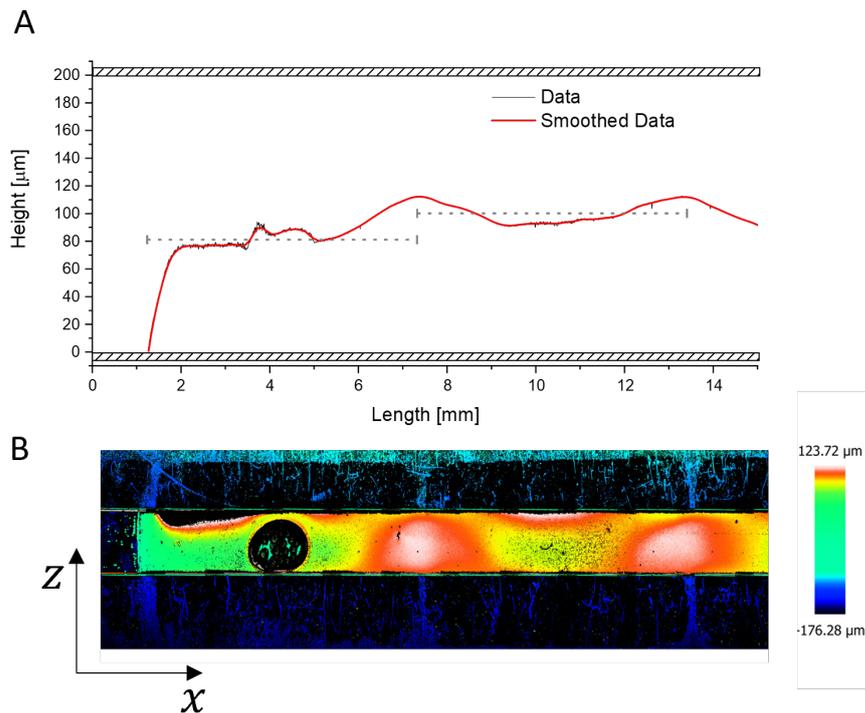


Abbildung 3.9 A: Durchschnittliche Betthöhe über der Breite des Kanals im Verlauf der ersten drei Magnete des Reaktors. Die Daten (schwarz) wurden für die Darstellung geglättet (rot). Die durchschnittlichen Dicken des Anfangsbereichs und zwischen Hügeln sind gekennzeichnet (gestrichelt). B: Profilometrie des Partikelbetts am Anfang. Die Blase wurde händisch aus dem Datensatz ausgeschnitten und in der Schichtberechnung ausgeschlossen.

Bei dem Höhenprofil der Schichtdickenanalyse am Anfang des Kanals lassen sich Erhöhungen erkennen. Die Schichtdicke am Anfang des Kanals steigt schnell an und erreicht ein Plateau mit der Höhe $82,0 \mu\text{m}$. Über dem Kontakt der ersten beiden Magnete entsteht ein Hügel mit vergleichbarer Höhe wie bei der Messung in der Mitte des Kanals (Abbildung 3.8 A). Das Höhenprofil des anschließenden Bereichs über dem zweiten Magneten (in x-Richtung) ist dem eines Magneten in der Mitte (Abbildung 3.8) sehr ähnlich. Das zeigt sich auch in der durchschnittlichen Höhe von $98,7 \mu\text{m}$. Im Vergleich zu den Erhöhungen zwischen den Magneten ist der Hügel am Anfang der Magnete ca. $40 \mu\text{m}$ kleiner. Durch das Fehlen eines zweiten Magneten sind die magnetischen Kräfte geringer.

Mit der Annahme, dass die Partikelschicht am Ende sich ähnlich ausbildet wie am Anfang, kann eine durchschnittliche Partikelbetthöhe berechnet werden. Mit jeweils einem Anfangs- bzw. Endmagneten und sechs Magneten mit Nachbarmagneten ergibt sich eine durchschnittliche Betthöhe von $94,5 \mu\text{m}$. Nach Gleichung 3.20 entspricht diese durchschnittliche Betthöhe einer Porosität von $\varepsilon_{bed} = 0,307$. Dieser Wert liegt zwischen der Porosität einer FCC- und BCC-Packung. Eine genaue Aussage über die Art der Packung der Partikeln ist schwer zu treffen. Diese setzt sich vermutlich aus unterschiedlichen Arten zusammen. Die Hügel signalisieren hohe magnetische Kräfte, die über der Mitte der Magnete geringer sind. Starke

magnetische Kräfte resultieren in hohen Sedimentationskräften über Magnetübergängen, was auf eine dichte Partikelpackung hindeutet. Jedoch führt die starke Magnetisierung der Partikel zu erhöhter Abstoßung bzw. Anziehung zwischen den Partikeln. Das kann zur Bildung von Partikelketten führen und somit zu größeren Lücken zwischen den Ketten und zu einer höheren Porosität. Die geringeren magnetischen Kräfte zwischen den Hügeln erhöhen die Wahrscheinlichkeit von Fehlern in der Packung und beeinflussen somit die Porosität und die Schichtdicke des Partikelbetts. Ein eindeutiges Zuordnen einer bestimmten Packungsart ist somit nicht möglich. Daraus resultierend stellt sich die Frage, ob und wie sich diese Effekte auf die Betteigenschaften (Höhe und Porosität) auswirken.

3.5 Simulation magnetischer Partikel in einem Mikrokanal

Die Simulation des Beladungsvorgangs des Reaktors bedarf der Definition bzw. Berechnung des Magnetfeldes mit COMSOL® (COMSOL AB, Stockholm, Sweden 2021) und der Partikelsimulation mit OpenLB® (Krause et al. 2020). Grundlage dafür ist der verwendete Flussreaktor, beschrieben in Kapitel 3.1.

3.5.1 Berechnung des Magnetfeldes

Um die magnetischen Kräfte auf die superparamagnetischen Partikeln zu ermitteln, wurde das überlagerte Magnetfeld, das im Reaktorkanal herrscht, mit COMSOL® (COMSOL AB, Stockholm, Sweden 2021) berechnet. Die Simulationen wurden mit dem AC/DC Modul durchgeführt. Die Berechnung teilt sich in die Geometrie-, Gittererstellung, Definition der Randbedingungen und Ermittlung des Magnetfeldes auf.

Eine digitale, dreidimensionale Kopie des Reaktorsetups nach den Angaben der Hersteller des Reaktorchips und der Magnete (siehe auch Kapitel 3.1) wurde erstellt. Vier Magnete wurden direkt unter dem Reaktorchip mit alternierender, magnetischer Orientierung platziert. Den einzelnen Volumina im Berechnungsraum wurden Materialeigenschaften zugeordnet. Als Medium im Kanalvolumen wurde Wasser angenommen. Das freie Volumen wurde als Luft angesehen. Die Materialeigenschaften für den PMMA-Chip und die Magnete wurden aus der Material-Bibliothek von COMSOL übernommen. Die Begrenzungen des Berechnungsraums wurden für die Konservierung des magnetischen Felds mit einer Neumann-Randbedingung gesetzt. Die magnetischen Eigenschaften der Dauermagnete wurden mit einer festen, in y-Achsenrichtung (Abbildung 3.10) orientierten Flussdichte von $1,21 T$ gesetzt (IBS Magnet 2021).

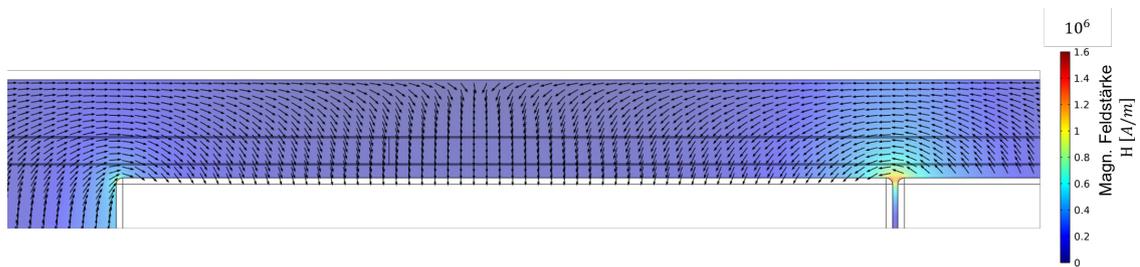


Abbildung 3.10 Berechnetes Magnetfeld über den ersten beiden Magneten, dargestellt mit normalisierten schwarzen Pfeilen. Auf einer Schnittebene in der Mitte des Kanals ist die absolute Magnetfeldstärke dargestellt. Das Kanalvolumen ist über den Magneten sichtbar.

Bei der Gittererstellung wurde ein Tetraeder-Gitter genutzt. Die Auflösung des Reaktorkanalvolumens wurde an die Größe der Partikeln angepasst, um mögliche Fehler bei der Feldübertragung in OpenLB zu minimieren. Das magnetische Feld (Abbildung 3.10) zeigt am Anfang der Magnete typische Feldlinien eines Dauermagneten. Bei den Übergängen zwischen zwei Magneten führen die Feldlinien direkt zum benachbarten Magneten, da diese alternierend angeordnet sind. Die Feldstärke an den Übergängen ist deutlich größer als am Anfang.

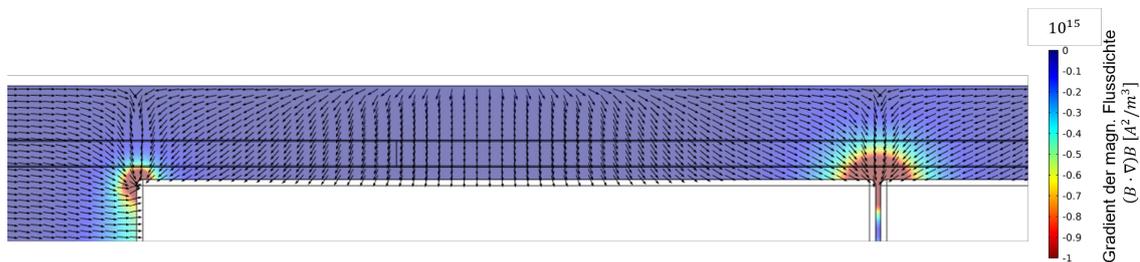


Abbildung 3.11 Gradient der Flussdichte im Reaktorkanal, dargestellt mit schwarzen, normalisierten Pfeilen. Auf einer Schnittebene in der Mitte des Reaktorkanals ist die absolute Höhe des Gradienten der Magnetfeldstärke dargestellt.

Die magnetische Kraft durch die Dauermagnete ist abhängig vom Gradienten der magnetischen Flussdichte (Gl. 3.6). Um die Kräfte und deren Orientierung abzuschätzen, ist in Abbildung 3.11 der Flussdichtengradient durch Pfeile im Anfangsbereich des Reaktorsystems dargestellt. Hier ist offensichtlich, dass die größten Gradienten und somit Kräfte über dem Anfang bzw. Ende der Magnete auftreten. Zwischen benachbarten Magneten ist die Kraft erhöht. Diese Beobachtungen erklären die beobachtete Inhomogenität der Höhe des Partikelbetts in Kapitel 3.4.2. Die Gradienten und damit die Kraft über der Mitte der Dauermagnete sind wesentlich geringer als an den Übergängen. Somit könnte die Sedimentation der Partikeln durch Aufstauen dieser Partikeln zwischen zwei Anhäufungen und die Gravitationskraft bestimmt sein. Die Gradienten deuten auf starke Anziehung zum Anfang bzw. Ende der einzelnen Magnete

hin, was die Hügel aus Kapitel 3.4.2 erklärt. Für die Implementierung in OpenLB wurden die Magnetfeldstärke und der Gradient der Flussdichte für ein äquidistantes Gitter gemäß des OpenLB Gitters exportiert.

3.5.2 Partikelsimulation

Bei der Überströmung der Nd-Magnete unterhalb des Kanals bildet sich ein Partikelbett, welches in Kapitel 3.4 optisch analysiert wurde. In diesem Kapitel wird die LBM-Software OpenLB (Krause et al. 2020) genutzt, um die Bettbildung (Kapitel 3.5.4) und Packungseigenschaften des gebildeten Betts (Kapitel 3.4.2) zu untersuchen. Zuerst wird ein kurzer Überblick über die Lattice-Boltzmann-Methode (LBM) gegeben mit Fokus auf die Simulation eines durchströmten Kanals und die Partikelbewegung. Eine gute Übersicht über die LBM ist in der Arbeit von Krüger et al. (Krüger et al. 2017) zu finden.

3.5.3 Lattice-Boltzmann Methode (LBM)

Die LBM basiert auf der kinetischen Gastheorie, die eine Teilchenverteilung eines Gases beschreibt. Die Teilchenverteilung ist eine Größe abhängig von der Zeit und der Stoßzeit (mittlere freie Flugzeit). Die kinetische Gastheorie lässt sich mit Erweiterungen auf alle Fluide anwenden. Die Teilchenverteilung wird mit der Verteilungsfunktion $f(x, \xi, t)$ der Teilchen beschrieben. Die Verteilungsfunktion beschreibt die Dichte des Fluids mit der Information über die Teilchengeschwindigkeit ξ an dem Ort x und der Zeit t . Mit der Verteilungsfunktion können beispielsweise die Massendichte (Gl. 3.21), Impulsdichte (Gl. 3.22) und die Energiedichte eines Systems berechnet werden. Diese sind direkt mit den makroskopischen Größen Druck p , Geschwindigkeit u und Energie E verbunden.

$$\rho(x, t) = \int f(x, \xi, t) d^3 \xi \quad 3.21$$

$$\rho(x, t)u(x, t) = \int \xi f(x, \xi, t) d^3 \xi \quad 3.22$$

Das Verhalten der Verteilungsfunktion ist über die Boltzmann Gleichung (BG) nach Gleichung 3.23 mit dem Kollisionsoperator $\Omega(f) = \frac{Df}{Dt}$ definiert. Der Kollisionsoperator beschreibt die zeitliche Änderung der Verteilungsfunktion durch interpartikuläre Interaktionen. In Gl. 3.23 beschreiben die Indizes der Nabla-Operatoren die partielle Ableitung in Bezug auf Ort x und Teilchengeschwindigkeit ξ .

$$\frac{df}{dt} + \xi \nabla_x f + \frac{F}{\rho} \nabla_\xi f = \Omega(f) \quad 3.23$$

In der klassischen BG wird der Kollisionsoperator über eine aufwändige, doppelte Integration der Teilchengeschwindigkeit berechnet (Weiß 2006). Dieser berücksichtigt alle Kollisionen zweier Teilchen, abhängig von intermolekularen Kräften. Grundlegend für die LBM in Bezug auf Fluidströmungen formulierten Bhatnagar, Gross und Krook (BGK Kollisionsoperator) eine vereinfachte Form des Kollisionsoperators (Bhatnagar et al. 1954):

$$\Omega(f) = -\frac{1}{\tau}(f - f^{eq}) \quad 3.24$$

Der BGK-Kollisionsparameter beschreibt die Relaxation der Dichteverteilung in einen Gleichgewichtszustand f^{eq} . Die Relaxationszeit τ (Stoßzeit) bestimmt dabei wie schnell das Gleichgewicht erreicht wird und ist abhängig von Diffusion, Viskosität und Wärmeleitung.

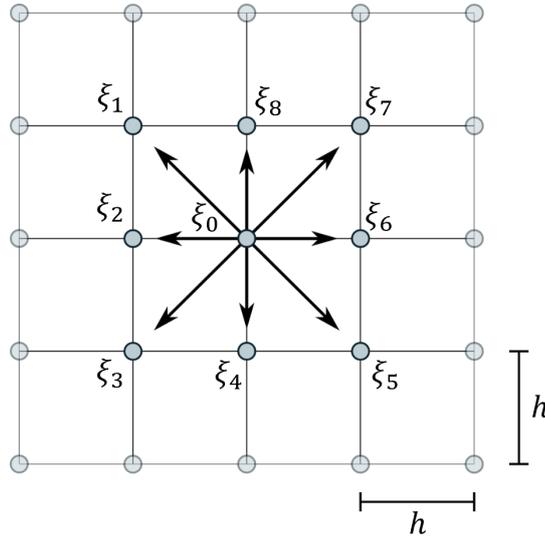


Abbildung 3.12 Grafische Darstellung eines D2Q9-Gitters. Der Diskretisierungsparameter h definiert den Abstand der Knoten. Jedem Knoten ist eine Teilchengeschwindigkeit ξ_i zugeordnet, die zu einem Knotenwechsel benötigt wird.

Die Diskretisierung der Kombination aus der BG und dem BGK-Kollisionsoperator (BG-BGK) resultiert in der LBM. Die inverse Schallgeschwindigkeit c_s definiert den Diskretisierungsparameter h und approximiert die BG-BGK für die Teilchengeschwindigkeit finiter, äquidistanter Knoten. Abhängig von der betrachteten Dimension d hat jeder Knoten q Nachbarknoten. Spezielle LBM werden mit $DdQq$ benannt, wobei D2Q9 und D3Q18 die üblichen Modelle sind. Zur Darstellung der Methode ist in Abbildung 3.12 das Gitter für D2Q9 visualisiert. Eine Fluidpartikel an einem Knoten hat $q - 1$ mögliche Geschwindigkeiten, die eine Verschiebung zu einem benachbarten Knoten bewirken (vgl. Abbildung 3.12). Zusätzlich gibt es eine Möglichkeit an dem Ursprungsknoten zu bleiben. Somit lässt sich die diskrete Geschwindigkeit durch die Boltzmann Gleichung (DVBE, engl.: *discrete velocity Boltzmann equation*) definieren:

$$\frac{df_i}{dt} + \xi \nabla_x f_i = \Omega_i + \tilde{F}_i, i = 1, \dots, q - 1 \quad 3.25$$

Die Abhängigkeit der Verteilungsfunktion f von der Geschwindigkeit wird durch q Gleichungen ersetzt. Hierbei wird die Verteilungsfunktion, der Term für die Kraft und der Kollisionsoperator aus Gleichung 3.23 mit der verkürzten Hermite-Erweiterung in f_i , Ω_i und \tilde{F}_i approximiert.

$$3.21 \rightarrow \rho(x, t) = \int f(x, \xi, t) d^3 \xi = \sum w_i f_i \quad 3.26$$

$$3.22 \rightarrow \rho(x, t)u(x, t) = \int \xi f(x, \xi, t) d^3\xi = \sum w_i \xi_i f_i + \frac{\Delta t}{2} \tilde{F}_i \quad 3.27$$

Mit der Diskretisierung der Geschwindigkeit wird das Integral mit einer Summe und einem gitterabhängigen Gewichtungsfaktor w ersetzt. Der Einfluss einer wirkenden Kraft F_i wird in der Impulsgleichung (Gl. 3.28) berücksichtigt.

Für die numerische Berechnung der DVBE werden eine weitere Diskretisierung in Zeit und Ort, die Integration der charakteristischen Größen und die Anwendung der Trapezregel benötigt. Damit kann die allgemeine Lattice-Boltzmann Gleichung beschrieben werden:

$$f(x + \xi_i \Delta t, t + \Delta t) = f_i - \frac{1}{\tau} (f_i(x, t) - f_i^{eq}(x, t)) \Delta t + F_i \Delta t \quad 3.28$$

In der LBM wird die Lattice-Boltzmann Gleichung in zwei Schritte unterteilt:

$$\tilde{f}_i(x, t) = f_i - \frac{1}{\tau} (f_i(x, t) - f_i^{eq}(x, t)) \Delta t + F_i \Delta t \quad 3.29$$

$$f_i(x + \xi_i \Delta t, t + \Delta t) = \tilde{f}_i \quad 3.30$$

Der erste Schritt beschreibt die Kollision der Teilchen (Gl. 3.29) und der zweite das Strömen der Teilchen (Gl. 3.30). Die beiden Vorgänge sind in Abbildung 3.13 für D2Q9 dargestellt.

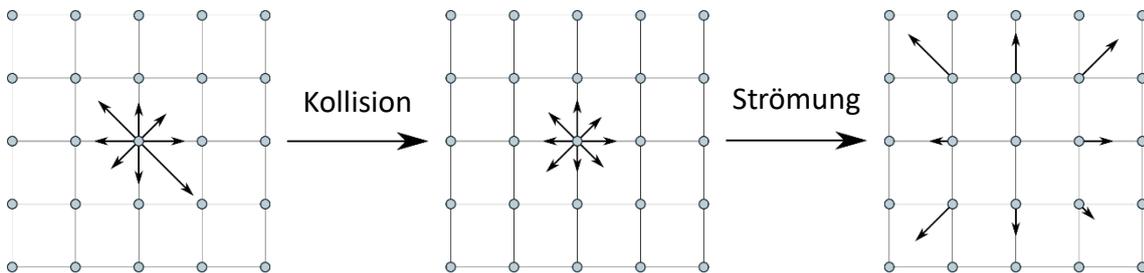


Abbildung 3.13 Ablauf eines Zeitschritts in der LBM. Nach der Berechnung der Kollision wird der Einfluss der Strömung auf die Knoten berücksichtigt.

Die LBM ermöglicht die numerische Lösung unterschiedlicher Differentialgleichungen, wie die kompressible, inkompressible Navier-Stokes Gleichung oder die Poisson-Gleichung. Die Anwendung der LBM auf die Navier-Stokes-Gleichung schafft ebenfalls die Grundlage für die Berechnung von Druck und Geschwindigkeit durch die Berechnung der Momente der Verteilungsfunktion.

Um die Simulation in einem begrenzten Volumen umzusetzen, werden den Knoten des Gitters Anfangs- und Randbedingungen zugeordnet. In einem äquidistanten Gitter können komplexe Strukturen beschrieben werden. Die Knoten können als Randbedingungen äquivalent zu makroskopischen Modellierungsmethoden definiert werden. Diese beinhalten beispielsweise Dirichlet (definierter Wert), Neumann (definierter Gradient), periodische und symmetrische Randbedingungen. Für Partikelsimulationen werden diese noch mit Abprall-Bedingungen (engl.: *bounce back*) erweitert.

In dieser Arbeit wird die Software OpenLB benutzt. Das Programm wurde von der Arbeitsgruppe von M.J. Krause entwickelt und findet in vielen Bereichen Anwendung (z.B.: mehrphasige, Partikeln beladene, turbulente und thermische Strömung) (Krause et al. 2020). Die Partikelbewegung und die Einflüsse des Magnetfeldes auf die Sedimentation der Partikel werden, mit Hilfe existierender Module von OpenLB, untersucht (Lindner et al. 2013). Diese beinhalten Strömung nach der Navier-Stokes Gleichung, Strömung durch poröses Volumen (Kapitel 1.1.1.3) und Partikelströmungen in einem magnetischen Feld (Kapitel 1.1.1.4).

1.1.1.3 Durchströmtes poröses Medium

Für die Lösung der Navier-Stokes Gleichung wird die Formulierung der Gleichgewichtsteilchenverteilung f_i^{eq} angepasst. Basierend auf der LBM (Gl. 3.29) formulierten Guo und Shu die Gleichgewichtsverteilungsfunktion für die Navier-Stokes Gleichung ohne angreifende Kräfte (Guo und Shu 2013):

$$f_i^{eq}(x, t) = w_i \rho \left(1 + \frac{u \xi_i}{c_s^2} + \frac{(u \cdot c_i)^2}{c_s^4} - \frac{u \cdot u}{c_s^2} \right) \quad 3.31$$

Mit der Chapman–Enskog Erweiterung (Chapman und Cowling 1998) kann die LBG in die makroskopische Navier-Stokes Gleichung überführt werden (Guo und Shu 2013). Die kinematische Viskosität ν kann durch die Relaxationszeit und die Schallgeschwindigkeit dargestellt werden:

$$\nu = c_s^2 \left(\tau - \frac{\Delta t}{2} \right) \quad 3.32$$

Die Durchströmung einer porösen Struktur kann mit einer angepassten Navier-Stokes Gleichung nach Brinkmann (Brinkman 1949), basierend auf Darcys' Gesetz, berechnet werden (Guo und Zhao 2002):

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla) \left(\frac{u}{\varepsilon} \right) &= -\frac{1}{\rho} \nabla(\varepsilon p) + \nu \Delta u + F_\varepsilon \\ \nabla \cdot u &= 0 \end{aligned} \quad 3.33$$

Gleichung 3.33 beinhaltet die Kraft F_ε auf das Fluid, aufgrund des durchströmten Körpers mit der Porosität ε , für die gilt:

$$F_\varepsilon = -\frac{\varepsilon}{\alpha} u - \frac{K_f}{\sqrt{\alpha}} u^2 \quad 3.34$$

Die Kraft teilt sich in einen linearen Darcy-Term (laminare Strömung) und den nicht-linearen Forchheimer-Term (turbulente Strömung) auf. Die Permeabilität α und die Forchheimer-Konstante K_f werden experimentell nach Gleichung 3.35 mit dem Partikeldurchmesser d_p und der Porosität ε bestimmt.

$$K_f = \frac{1,75}{\sqrt{150\varepsilon^3}}, \alpha = \frac{d_p^2 \varepsilon^3}{150(1-\varepsilon)^2} \quad 3.35$$

Für eine Porosität von $\varepsilon = 1$ geht die angepasste Navier-Stokes-Gleichung in ihre ursprüngliche Form über. Die Simulation für poröse, durchströmte Medien ermöglicht die Definition von porösen Regionen in

einem Rechenvolumen wie z.B. poröse Schichten. Dies ermöglicht eine Beeinflussung der Strömung durch agglomerierte und abgelagerte Partikeln im Rechenvolumen.

1.1.1.4 Berechnung von Partikeln in einer Strömung

Die Simulation von Partikeln in einer Strömung findet in vielen Bereichen Anwendung. Die Modellierung der Partikeln kann durch die Berechnung diskreter Partikeln (Lagrange Methode) oder als kontinuierliches Medium (Euler Methode) umgesetzt werden. In der Lagrange Methode werden direkte Kräfte und Partikelinteraktionen für jede Partikel beschrieben, was die Massen- und Impulserhaltung erleichtert, aber für erhöhte Partikelanzahl auch rechenaufwändiger wird. In der Euler-Methode bezieht man sich auf ein definiertes Volumen und berechnet die Durchströmung von Partikeln, wobei der Rechenaufwand der Euler-Methode unabhängig von der Anzahl der Partikeln ist.

Zur Simulation mit Partikeln beladenen Strömungen können die beiden Phasen (Fluid und feste Partikeln) unterschiedlich beschrieben werden. In dieser Arbeit wurde der Euler-Lagrange Ansatz gewählt, der die flüssige Phase (Flüssigkeit) als Euler System und die feste Phase (Partikeln) als Lagrange System betrachtet. Für ein System mit geringen Partikelkonzentrationen und hinreichend kleine Partikeln wird der Einfluss der bewegten Partikeln auf die Strömung vernachlässigt (Einweg-Kopplung, engl.: *one-way coupling*). Das Euler System wird mit der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben (Kapitel 1.1.1.3). Die Partikeln des Lagrange Systems werden nach Gleichung 3.36 beschrieben. Die Position r_k der Partikel k mit dem Durchmesser d_p und der Masse m_p wird durch die auf die Partikeln wirkenden Kräfte beschrieben.

$$\frac{d^2 r_k}{dt^2} = \frac{du_k}{dt} = a_k = \frac{F_k}{m_k} \quad 3.36$$

Die auf die Partikeln wirkenden Kräfte werden additiv berechnet und sind systemspezifisch. Diese beinhalten die Partikelkräfte aufgrund von äußeren Bedingungen und benachbarten Partikeln (Kapitel 3.3.1). Die Widerstandskraft (Gl. 3.4) beschreibt den Einfluss des Euler Systems auf die Partikeln. Weitere Kräfte sind die Kraft durch die Erdbeschleunigung (Gl. 3.5) und die magnetischen Kräfte durch ein angelegtes Magnetfeld (Gl. 3.6 und 3.7).

Interpartikuläre Kräfte verhindern das Überlappen zweier Partikel. Diese werden in der klassischen Lagrange Methode mit mechanischen Feder- und Dämpfungsmodellen beschrieben (Gl. 3.10 – 3.15). Bei Partikelbewegungen von superparamagnetischen Partikeln müssen weiterhin die interpartikulären magnetischen Kräfte berücksichtigt werden (Gl. 3.8 und 3.9).

3.5.4 Simulation der Befüllung des Reaktorkanals

Bei Befüllung des Reaktorkanals wird eine wässrige Suspension mit superparamagnetischen Partikeln bei einer Flussrate von $10 \mu\text{L}/\text{min}$ in den Kanal gepumpt. Es bildet sich bei diesem Vorgang ein Partikelbett

am Boden des Kanals (Kapitel 3.4) aus, abhängig vom anliegenden Magnetfeld. Aufgrund der Größe und Anzahl der magnetischen Partikeln ($d_p = 2,8 \mu m$) wird der Anfangsbereich des Kanals mit OpenLB berechnet. Weiterhin wurde die Breite des Kanals reduziert ($2mm \times 200 \mu m \times 20 \mu m$, Länge x Höhe x Breite). Der Ausschnitt ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Das Magnetfeld wurde mit COMSOL® berechnet (Kapitel 3.5.1).

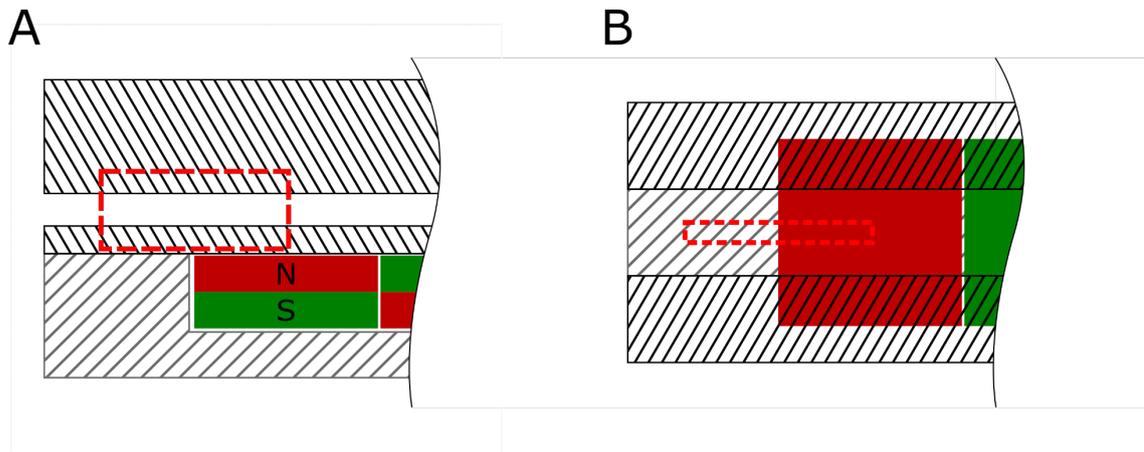


Abbildung 3.14 Skizzierungen der Querschnitte des Berechnungsvolumens mit dem Nord- und Südpol der Dauermagnete (N und S) und der berechneten Region (rot gestrichelt) des Befüllungsvorgangs. Die Größen sind nicht maßstabsgetreu. A: Seitenansicht; B: Sicht von oben.

Die Berechnung der Befüllung eines Kanals wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Ein Überblick über den Ablauf der Simulation ist in einem Flussdiagramm (Abbildung 3.15) dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung des Setups ist im Anhang A9 zu finden. Das Reaktorsetup (Kapitel 3.1) definiert die Abstände und Anordnungen der Reaktorkanäle und der Magnete, sowohl für die Magnetfeldberechnung als auch das Berechnungsvolumen der Partikelsimulation. Für den Kanal im Anfangsbereich wurde ein äquidistantes Knotennetz für die Strömungssimulation erstellt. Für ein entsprechendes äquidistantes Netz wurden sowohl die Magnetfeldstärke als auch der Gradient der Flussdichte aus COMSOL® exportiert und in OpenLB eingelesen.

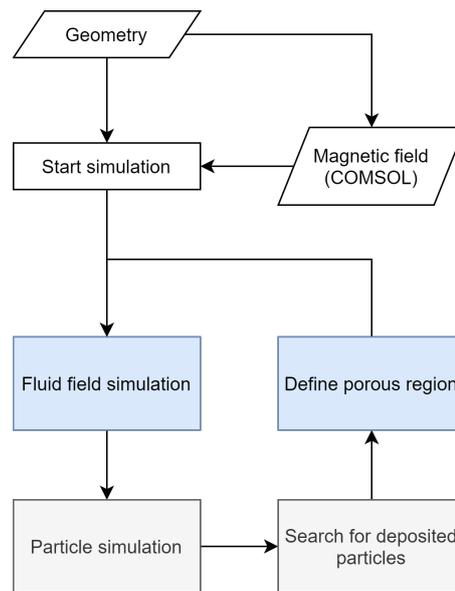


Abbildung 3.15 Ablauf der Simulation einer partikelbeladenen Strömung für die Partikelbettbildung. Die Simulation ist in die Berechnung der kontinuierlichen Phase (Euler-Methode, blau) und der Partikeln (Lagrange-Methode, grau) aufgeteilt.

Die Berechnung der partikelbeladenen Strömung teilt sich in zwei sich wiederholende Simulationsstufen auf: i) Strömungssimulation der mobilen Phase mit der Navier-Stokes-Gleichung für durchströmte, poröse Medien (Kapitel 1.1.1.3) und ii) Partikelsimulation von paramagnetischen Partikeln (Kapitel 1.1.1.4). Nach der Partikelsimulation werden abgelagerte Partikeln ermittelt, die in der darauffolgenden Strömungssimulation als poröse Region berücksichtigt werden.

Für die Strömungssimulation wurden Standard-Randbedingungen gewählt: Einlass: definierte Poisson-Geschwindigkeitsverteilung; Auslass: konstanter Druck; Boden und Decke: Haftbedingung. Für die beiden Seiten wurden ein Geschwindigkeitsgradient von Null angenommen, um einen Ausschnitt in der Mitte des Kanals zu beschreiben (engl.: *slip boundary condition*). Mit dem stationären Strömungsfeld werden die Widerstandskräfte auf die Partikeln berechnet, die für die Partikelsimulation im zweiten Schritt benötigt werden.

In jeder Wiederholung der Berechnung wird eine feste Anzahl uniformer, paramagnetischer Partikeln (2500 Partikeln) zufällig im Anfangsbereich des Kanals erzeugt. Die Anfangsgeschwindigkeit der Partikeln entspricht der durchschnittlichen Geschwindigkeit des Fluids. Die Orientierung des magnetischen Moments wurde mit $(1,0,0)(x, y, z)$ angenommen. Die Partikeleigenschaften wurden nach Kapitel 3.3 implementiert. An den Grenzen des Berechnungsvolumens werden die Partikel mit einem ideal elastischen Stoß reflektiert (engl.: *bounce-back condition*). Die auf die Partikeln wirkenden Kräfte werden nach Kapitel 3.3.1 berechnet und bestimmen die Position und die Orientierung des magnetischen Moments der Partikeln.

Nach Abschluss der Bettbildung der simulierten Partikeln (Abbruchkriterium für die durchschnittliche Position und die Geschwindigkeit der Partikeln) werden Partikelanhäufungen (Agglomerate) im Volumen definiert. Im Idealfall sollte nur ein Agglomerat bzw. eine Anhäufung (das Partikelbett) vorliegen. In einem letzten Schritt wird eine poröse Region definiert, die sich aus den abgelagerten Partikeln des größten Agglomerats ergibt. Partikeln in den obersten beiden Schichten werden als nicht abgelagert angenommen, da sie noch durch neu anströmende Partikeln der nächsten Iteration beeinflusst werden könnten. Anschließend wiederholt sich die Berechnung des Strömungsfeldes mit einem neuen Satz an Partikeln.

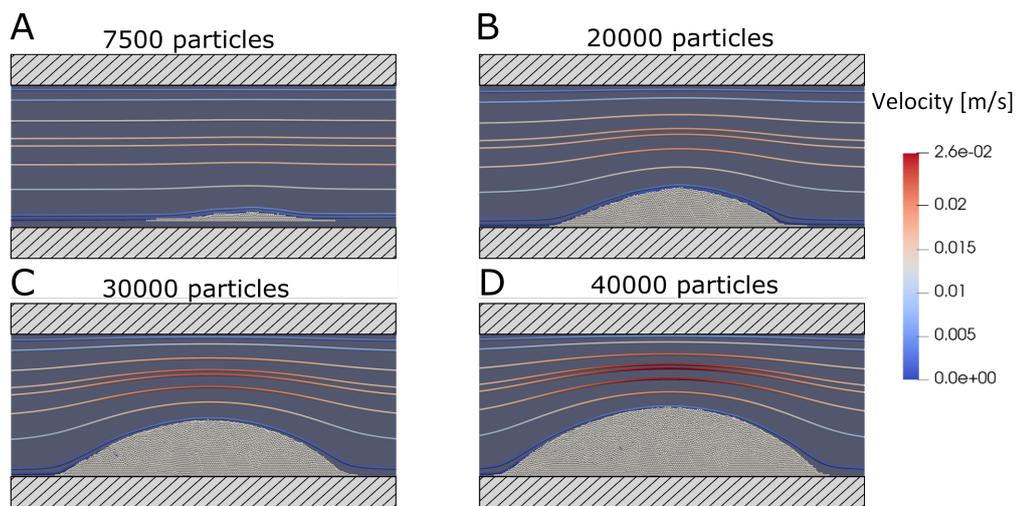


Abbildung 3.16 Partikelbettbildung nach Iteration 3 (A, 7500 Partikeln), 8 (B, 20000 Partikeln), 12 (C, 30000 Partikeln), 16 (D, 40000 Partikeln). Strömungslinien sind eingezeichnet, Boden und Decke sind schematisch eingezeichnet.

Die Ergebnisse der Simulation der partikelbeladenen Strömung nach aussagekräftigen Iterationen sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Das Partikelbett baut sich am Anfang des Magneten durch die magnetische Kraft aufgrund des anliegenden Magnetfeldes auf. Durch den Eintrag der Partikeln erhöht sich die Anhäufung, die den frei durchströmten Querschnitt über dem Partikelbett verkleinert. Nach dem Kontinuitätsgesetz erhöht sich dort die Strömungsgeschwindigkeit und damit die Widerstandskraft (Gl. 3.4) auf die Partikeln und beeinflusst, wie sich das Partikelbett formt. Gleichzeitig werden die strömenden Partikeln über die Partikelschicht umgeleitet, wodurch sich der Abstand zum Magneten erhöht und somit geringere magnetische Kräfte auf die Partikeln wirken. Ab der 16. Iteration und 40000 sedimentierter Partikeln ist die Kraft der Strömung größer als die magnetische Kraft und die Partikeln überströmen das Partikelbett. Das Partikelbett füllt in diesem Zustand ca. die Hälfte des Kanals aus. Die Partikeln nachfolgender Iterationen überströmen das Partikelbett und werden aus dem Berechnungsvolumen ausgetragen. Diese Partikeln strömen weiter durch den Kanal bis sie zum nächsten Bereich über einem Ende oder Anfang eines Magneten gelangen, wo wieder stärkere magnetische Kräfte wirken.

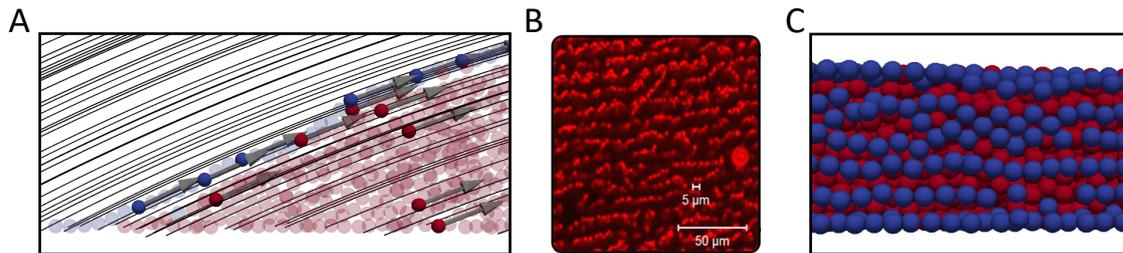


Abbildung 3.17 Effekte der superparamagnetischen Partikeln in einem magnetischen Feld. A: Ausrichtung der magnetischen Momente der Partikeln mit Bildung von Partikelketten. Die Magnetfeldlinien sind schwarz dargestellt und einzelne Partikeln mit ihrem magnetischen Moment sind hervorgehoben. B: Fluoreszenzaufnahme der oberen Schicht (Burgahn 2019). C: Partikelketten der oberen Partikelschicht.

In den Partikelsimulationen richten sich die magnetischen Momente der Partikeln zum magnetischen Feld aus (Abbildung 3.17 A). Durch die magnetischen, interpartikulären Kräfte bilden sich Partikelketten entlang der magnetischen Feldlinien. T. Burgahn (Burgahn 2019) beobachtete diese Ketten auf der Oberfläche parallel zur Strömungsrichtung (Abbildung 3.17 B), die auch in der Simulation abgebildet werden (Abbildung 3.17 C).

Die Dicke der Partikelschicht aus der Partikelsimulation spiegelt die Tendenzen des Anfangs des Partikelbettes aus der Profilometrie (Kapitel 3.4) wider. Die Berechnung der Höhe des Partikelbetts weist einen größeren Wert auf als die optische Untersuchung. Es gibt jedoch eine Reihe von Faktoren, die eine Abweichung vom tatsächlichen System verursachen können. Dazu gehören ungenaue Werte von Materialien, insbesondere von Magneten und magnetischen Partikeln, die zu Unterschieden zwischen Simulationen und der realen Partikelanordnung oder Schichtdicke führen können. Ein in der Simulation nicht berücksichtigter Einfluss auf die Bettbildung ist die Polymerschicht auf den magnetischen Partikeln. Ein weiterer Faktor, der in der Simulation nicht berücksichtigt wurde, ist die Wirkung der Polymerschicht auf die magnetischen Partikel. Die größte Ursache für Abweichungen wird auf geometrische Ungenauigkeiten in der Beschreibung des gesamten Systems zurückzuführen sein. Diese werden in der Simulation nicht berücksichtigt. Sie beinhalten zusätzliche Materialien zwischen dem Chip und den Magneten (Kleber o.Ä.) oder Fertigungsfehler (gebogener Chip), wodurch der Abstand zwischen dem Reaktorkanal und den Magneten erhöht wird. Die magnetische Kraft ist stark abhängig vom Abstand zum Magneten (vgl. Kapitel 3.5.1), wodurch schon kleine Erhöhungen des Abstands zu geringeren Kräften auf die Partikeln und somit zu geringeren Betthöhen führen können.

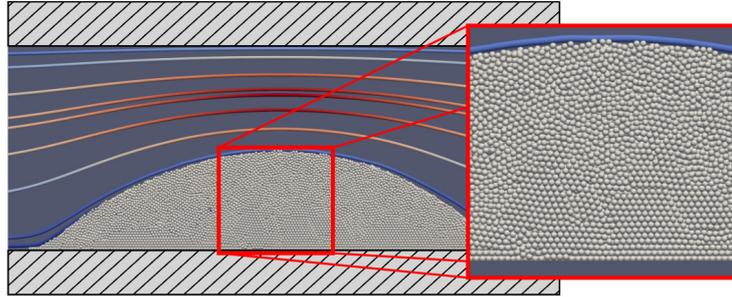


Abbildung 3.18 Darstellung der Partikelanordnung in der Mitte der Anhäufung in der Seitenansicht nach der 16. Iteration und 40000 sedimentierten Partikeln.

Die Partikelsimulation des Beladungsvorgangs zeigt weiterhin Partikelanordnungen auf. In Abbildung 3.18 ist die Partikelanordnung der 16. Iteration in der Mitte der Packung dargestellt. Am Boden des Reaktors, wo die größte magnetische Kraft auf die Partikel wirkt, entsteht eine geordnete Partikelpackung. In Abbildung 3.18 lassen sich Bereiche entdecken, die höchst geordnet sind (dichteste Packung). Bei den oberen Schichten des Partikelbettes verkleinern sich diese Bereiche. Die magnetische Kraft auf die Partikel ist in den oberen Lagen des Partikelbettes geringer, weshalb sich dort mehr Fehler finden und sich somit eine porösere Packung bildet.

Diese Befunde legen nahe, dass die Partikelanordnung im Bett nicht uniform ist, sondern von den wirkenden Kräften abhängt. Bereiche, in denen starke Sedimentationskräfte wie die magnetische Kraft wirken, zeigen eine stark geordnete Partikelpackung. Daher kann die Frage aus Kapitel 3.4.2, wie Sedimentations- oder Kettenbildungskräfte die Eigenschaften des Bettes beeinflussen, aufgrund dieser Beobachtungen beantwortet werden. Über den Übergängen von Magnetfeldern dominiert die Sedimentationskraft insbesondere in den tieferen Schichten. In der oberen Grenzschicht verliert sie jedoch ihre Wirkung und es kommt zur Bildung von Partikelketten.

3.5.5 Partikelbetteigenschaften

Die Simulation der Partikelsuspension ermöglicht die Betrachtung des Aufbaus des Bettes auf Partikelebene. Die Bildung eines längeren Abschnittes des Reaktors ist aufgrund der Anzahl der Partikel sehr rechenaufwändig. Ein solcher Bereich müsste mindestens zwei Magnete umfassen, damit sich zwei Hügel bilden. Erst nachdem die beiden Hügel sich gebildet haben, füllt sich der Bereich dazwischen auf. Die Untersuchung der Partikelverteilung im Bett wurde aus diesem Grund in zwei charakteristischen Bereichen verfolgt. Der Bereich über dem Anfang der Magnete (Ergebnisse aus Kapitel 3.5.4) wurde repräsentativ für Partikelstrukturen mit erhöhter magnetischer Kraft untersucht. Der zweite Bereich befindet sich über der Mitte eines Magneten, in der eine geringere magnetische Kraft vorliegt.

Die Berechnung der Partikelverteilung und letztlich der Porosität in den untersuchten Bereichen wurde mit Matlab durchgeführt. Ein Untersuchungsvolumen in Form eines Quaders wurde im Rechenvolumen definiert. Um eine möglichst genaue Untersuchung des Partikelbetts zu ermöglichen, wurden das Untersuchungsvolumen an die Partikelschicht angepasst. Die Breite des Untersuchungsvolumens (Z-Richtung) ist kleiner als die Breite des Rechenvolumens. Um die Einflüsse von Wänden bzw. Grenzen des Berechnungsvolumens zu minimieren, wurde die Breite des Untersuchungsvolumens um zwei Partikeldurchmesser an beiden Seiten reduziert. Die Länge (X-Richtung) und die Höhe (Y-Richtung) wurden an die Partikelpackung angepasst, so dass möglichst viele Partikel im Volumen eingeschlossen sind. Das Volumen der Partikel im Berechnungsvolumen ergibt mit dem gesamten Volumen die Porosität (Gl. 3.16). Partikeln, die teilweise im Berechnungsvolumen sind, wurden als Kugelsegment berücksichtigt. Der entsprechende Teil des Partikelvolumens im Berechnungsvolumen wurde durch (mehrmaliges) Schneiden mit den entsprechenden Flächen berechnet. Die Porositätsberechnungen wurden in Matlab durchgeführt.

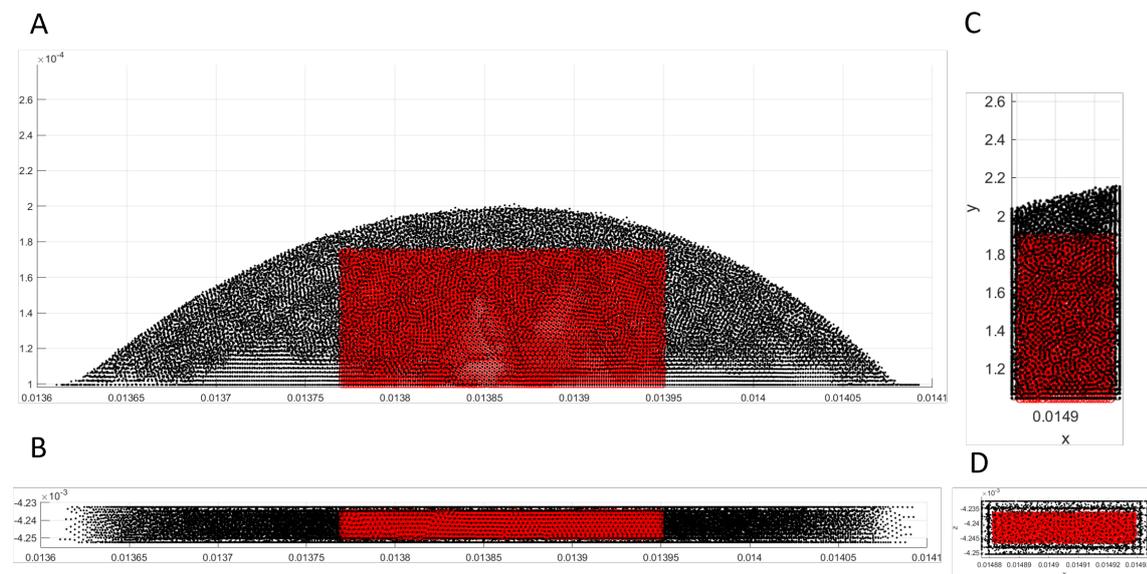


Abbildung 3.19 Verteilung der Partikelmittelpunkte in Seitenansicht (A, C) und Draufsicht (B, D). Das Volumen zur Berechnung der Porosität ist rot gekennzeichnet. Die Partikelberechnungen von Bereich 1 (über dem Anfang des ersten Magneten) sind in A und B dargestellt. Das berechnete Partikelbett in Bereich 2 (mittig über den Magneten) ist in C und D dargestellt.

Das Berechnungsvolumen und die dazugehörige Partikelverteilung über dem Anfang des ersten Magneten (Kapitel 3.5.4) ist in Abbildung 3.19 in der Seiten- (A) und Draufsicht (B) dargestellt. Die Ergebnisse der Porositätsberechnungen des ersten Bereichs finden sich in Tabelle 3.3. Im untersuchten Bereich wurde eine Porosität von 0,287 bestimmt. Dieser Wert ist größer als die minimale Porosität, die einer Packung mit runden Partikeln zu erwarten wäre.

Tabelle 3.3 Ergebnisse der Porositätsbestimmung der Partikelsimulationen für die Bereiche über dem Anfang des ersten Magneten (Bereich 1) und über der Mitte eines Magneten (Bereich 2). Berechnungsvolumen V_{calc} , gesamtes Partikelvolumen $\sum V_p$, Bettporosität ϵ_{bed} und relative, durchschnittliche Überlappung der Partikel und korrigierte Porosität ϵ_{bed}^* .

	V_{calc} [m ³]	$\sum V_p$ [m ³]	ϵ_{bed} [-]	$d_{overlap}/d_p$ [%]	ϵ_{bed}^* [-]
Bereich 1 (Anfang des Magneten)	$2,12 \cdot 10^{-13}$	$1,51 \cdot 10^{-13}$	0,287	1,99	0,353
Bereich 2 (Mitte des Magneten)	$5,44 \cdot 10^{-14}$	$3,49 \cdot 10^{-14}$	0,358	1,84	0,407

Dieses Verhalten kann auf die Berechnung der mechanischen Partikelkräfte (Kapitel 3.3.1) und das Überlappen von Partikeln zurückgeführt werden. Die mechanischen Kräfte werden über eine Federkraft abgebildet. Befinden sich zwei stationäre Partikeln in ständigem Kontakt, so heben sich die wirkenden Kräfte auf. Aufgrund der Federkraft überlappen sich die Volumina der benachbarten Partikeln. Bei Systemen mit geringer Partikelanzahl ist dieser Effekt vernachlässigbar. Bei diesem System sind jedoch mehrere tausende Partikeln im Volumen, wodurch eine geringe Abweichung die Ergebnisse beeinflusst. Für eine genauere Betrachtung der möglichen Einflüsse der Überlappungen wurde die mittlere Überlappungslänge zweier, in Kontakt stehender Partikeln berechnet und eine korrigierte, maximale Porosität ϵ_{bed}^* berechnet. Die korrigierte Porosität stellt mit 0,353 eine obere Grenze der Porosität dar. Durch die hohen magnetischen Kräfte entsteht eine geordnete, dichteste Packung. Einzelne Packungsfehler erhöhen die Partikelabstände, wodurch eine erhöhte Porosität zustande kommen.

Wie in den vorangegangenen Simulationen dargestellt, sammeln sich die Partikeln zuerst am Anfang des ersten Magneten an, da dort große magnetische Kräfte auf die Partikeln wirken. Die Anhäufung vergrößert sich mit weiteren einströmenden Partikeln. Mit mehr Partikeln und höherer Anhäufung verringert sich die durchströmte Querschnittsfläche und somit die Strömungsgeschwindigkeit und die Strömungskraft auf die Partikeln. Die Partikeln überströmen die erste Anhäufung, sobald die Strömungskraft größer als die magnetische Kraft ist. Die magnetische Kraft hinter der Anhäufung (mittig über dem Magneten) ist zu gering, um die Partikeln festzuhalten. Deshalb strömen diese bis zum Ende des Magneten weiter. Hier ist wiederum ein magnetisches Kraftzentrum, das eine Anhäufung erzeugt. Somit bilden sich zuerst zwei Partikeln-Anhäufungen, die anschließend als mechanische Hürden für die Partikeln dienen. Über der Mitte des Magneten, wo vor der Ausbildung der zweiten Anhäufung die magnetischen Kräfte zu gering waren, um die Partikeln zu halten, führen die mechanischen Hürden zum Auffüllen dieses Bereichs, entgegengesetzt zur Strömungsrichtung. Das sich ausbildende Partikelbett ist somit stärker durch die Gewichtskraft und schwächer von der magnetischen Kraft beeinflusst. Des Weiteren werden die Partikeln schwächer magnetisiert und eine Partikelkettenbildung ist unwahrscheinlicher.

Da die Berechnung der Ausbildung des Partikelbetts über die zwei Anhäufungen und dem Bereich dazwischen rechenstechnisch zu aufwändig ist, wurde eine weitere Berechnung für ein Volumen mittig über einem Magneten definiert und untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 C und D dargestellt. Die Partikeln wurden an der Decke des Berechnungsvolumens erstellt. Im Bereich über der Mitte der Magnete hat die Strömung einen sehr geringen Einfluss auf die Partikelanordnung im Bett. Es stellt sich heraus, dass die Gewichtskraft den größten Einfluss auf die Sedimentation hat, weshalb für die Ablagerung über der Mitte eines Magneten die Strömung vernachlässigt wurde. Dadurch kann das Abtragen der Partikel nicht abgebildet werden und somit keine Dicke des Partikelbettes bestimmt werden. Dennoch kann die Anordnung der Partikeln analysiert werden. Das berechnete Partikelbett weist eine Porosität von 0,358 auf. Durch geringe Sedimentationskräfte ordnen sich die Partikeln zufällig an. Durch Fehler in der Partikelpackung erhöht sich weiterhin die Porosität der Packung. Weiterhin reduziert sich die Überlappung der Partikeln aufgrund der geringeren Sedimentationskräfte. Die geringe, gemittelte Überlappung der Partikeln (1,84 %) kann die berechnete Porosität beeinflussen und resultiert in einer maximalen korrigierten Porosität von 0,407.

Wie schon erwähnt wird die Höhe des Partikelbetts in diesem Bereich durch das Verhältnis zwischen den Sedimentationskräften und der Kraft durch die Strömung bestimmt. Die Hügel der Magnetübergangsbereiche dienen als Blockade vor und hinter dem Bereich, wodurch sich Partikeln aufstauen. Somit kann die Höhe des Partikelbettes nicht höher sein als die der Übergangsbereiche. Durch die geringeren magnetischen Kräfte ist eine Mulde im Bereich mittig über den Magneten zu erwarten, wie sie in der Profilometrie beobachtet wurde.

3.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine Untersuchung der geometrischen Eigenschaften des betrachteten Reaktorsystems durchgeführt. Das Reaktordesign wurde detailliert beschrieben und mittels einer optischen Analyseverfahren wurde eine Charakterisierung der Partikelschicht innerhalb eines rechteckigen Reaktorkanals durchgeführt. Das Partikelbett wurde in zwei Reaktorbereichen untersucht (über dem ersten bzw. letzten Magneten und über einem mittleren Magneten). Die Dicke des Partikelbettes an der Bodenfläche des Reaktorkanals ist nicht homogen verteilt. An den Anfängen bzw. Enden der Magnete wurden Anhäufungen beobachtet, wobei die Höhe des Bettes über den Kontaktpunkten zweier Magnete am größten ist. Die optische Analyse ergab eine durchschnittliche Bettstärke von $94,8 \mu\text{m}$ berechnet, die einer durchschnittlichen Porosität von 0,309 entspricht.

Die Berechnung des Magnetfeldes und der magnetischen Kraft auf die Partikeln wurde mit COMSOL durchgeführt. Hierfür wurde eine digitale Kopie des Reaktorsetups erstellt und das magnetische Feld in dem Kanalvolumen berechnet. Die magnetische Kraft, die aus dem Gradienten der magnetischen

Flussdichte resultiert, erklärt die beobachteten Schichtdicken. An den Anfängen und Enden der Magnete ist die magnetische Kraft sehr groß, weshalb sich dort beim Beladungsvorgang Erhöhungen bilden.

Weiteren Aufschluss über die Partikelverteilung im Bett und damit die Porosität in unterschiedlichen Bereichen des Kanals ergab sich durch Partikelsimulationen des Beladungsvorgangs in OpenLB. Bei den Berechnungen wurden die Magnetfelddaten aus den Berechnungen mit COMSOL genutzt, um die Bildung des Partikelbettes über dem Anfang des ersten Magneten darzustellen. Der Partikelhügel am ersten Magneten baut sich am Kraftzentrum auf bis ca. 40000 Partikeln sedimentiert waren. Die Höhe des Partikelbetts ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen der Widerstandskraft durch die Strömung über dem Bett und den dort herrschenden Sedimentationskräften. Nach der vollständigen Ausbildung der Partikelanhäufung überströmen neue, anströmende Partikel diese und gelangen zum nächsten Kraftzentrum. Die Bereiche über der Mitte der Magnete werden aufgefüllt, sobald die Anhäufungen über den Magnetübergängen ausgebildet sind.

In einem letzten Schritt wurden die Eigenschaften des Partikelbetts untersucht. Dafür wurden zwei exemplarische Bereiche simuliert und die Partikelanordnung der Anhäufungen analysiert. Im ersten Bereich wurde die Partikelanordnung über dem Anfang des ersten Magneten untersucht, der Fälle mit hohen magnetischen Sedimentationskräften repräsentiert. In diesem Bereich (über dem Anfang des ersten Magneten) stellt sich eine Partikelschicht von ca. $100 \mu\text{m}$ ein. Die Schichtdicke ist größer als die in der Profilometrie beobachtete Schichtdicke. Gründe dafür sind Unterschiede in der Geometrie und in den Eigenschaften der Materialien, die für die Simulationen angenommen wurden. Weiterhin konnte durch die Berücksichtigung der intermolekularen Kräfte in den Modellierungen eine Überlappung der Partikeln beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Überlappung berechnet sich eine Porosität im ersten Bereich zwischen 0,287 und 0,353. Dieser Wert deckt sich mit der Beobachtung, dass sich die Partikel in Bereichen mit hohen magnetischen Kräften möglichst dicht anordnen.

Der zweite Bereich ist mittig über den Magneten und repräsentiert Fälle mit geringen magnetischen Sedimentationskräften. Die Partikelpackung in diesem Bereich wurde in einer separaten Simulation ohne den Einfluss der Strömung untersucht. Die Wahrscheinlichkeit von Fehlern in der Partikelpackung ist für diesen Bereich aufgrund geringerer magnetischer Kräfte höher, wodurch sich die Porosität erhöht. Unter Berücksichtigung der Partikelüberlappung berechnet sich eine Porosität zwischen 0,358 und 0,407, die auf eine Packung mit zufälliger Anordnung mit Gitterfehlern hinweist.

Die Untersuchung der geometrischen Eigenschaften des in dieser Arbeit untersuchten Reaktors ist ein essenzieller Teil des Optimierungsprozesses. Die Informationen über den Zusammenhang der Anordnung der Magnete, deren Stärke und Einfluss auf das Partikelbett stellen die Grundlage einer detaillierten Reaktormodellierung dar.

4 Reaktormodellierung

Die mathematische Modellierung eines Reaktors basiert auf dem Verständnis der geometrischen Eigenschaften des Reaktors und seiner Reaktions- und Transportvorgänge. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Reaktor mit überströmtem Partikelbett und immobilisierten Enzymen in unterschiedlichen Modellen dargestellt und untersucht. Die zugrundeliegenden physikalischen und chemischen Prozesse und deren Modellierung werden in Kapitel 4.1 beschrieben. Ein pseudo 2D-Modell basierend auf einem Zellmodell wurde in Matlab erstellt (Kapitel 4.4). Über angepasste Reaktionsparameter wurde der Einfluss der Immobilisierung auf die KRED mit in-situ experimentellen Daten (erstellt von IBG-1 (Burgahn 2019)) und mit einem nichtlinearen Fit ermittelt. Für eine realistischere Darstellung des Reaktors wurden außerdem ein 2D und ein 3D Modell in ANSYS Fluent (Finite-Volumen-Methode (FVM)) erstellt (Kapitel 4.6). Die Reaktionskinetik aus Kapitel 2.3 wurden in allen Modellen implementiert. Die Vor- und Nachteile der Modelle wurden herausgearbeitet und für die Anwendbarkeit einer Optimierungsstudie bewertet (Kapitel 4.7).

4.1 Modellierung der physikalischen Prozesse

Die mathematische Beschreibung von physikalischen Prozessen ist die Grundlage für numerische Methoden in der Reaktormodellierung. Diese Formulierungen ermöglichen die Berechnung des Verhaltens von einphasigen, mehrphasigen, kompressiblen, inkompressiblen und reaktiven Medien mit unterschiedlichen Methoden und Programmen. Die Erhaltungssätze für Impuls, Masse und Energie gewähren Kontinuität im Simulationsvolumen und den enthaltenen Medien. Ein Medium kann aus unterschiedlichen Komponenten bestehen, die auf makroskopischer Ebene als ein Kontinuum angenommen werden können. In diesem Kapitel wird auf die Erhaltungssätze (Kapitel 4.1.1) und die Diffusion (Kapitel 4.1.2) in Flüssigkeiten und in porösen Medien (Kapitel 4.1.3) eingegangen, die als Grundlage für die Reaktormodelle dienen.

4.1.1 Erhaltungssätze

Zur Modellierung eines Reaktors mit dem beschriebenen Reaktionssystem werden physikalische und chemische Prozesse miteinander gekoppelt. Die Modellierung von Reaktionen ist in Kapitel 2.3.2 dargestellt. Um physikalische Prozesse in einem makroskopischen System zu beschreiben, werden Modelle genutzt. Für die Systeme gelten die Erhaltungssätze für Impuls, Masse und Energie des Mediums bzw. Kontinuums.

Die Impulserhaltung und damit das Strömen des Mediums wird durch die Navier-Stokes Gleichung (Gl. 4.1) mathematisch beschrieben. Sie beschreibt das Verhalten der Geschwindigkeit \mathbf{u} und Dichte ρ des Mediums, abhängig von Druck p , kinematischer Viskosität η_K und möglichen angreifenden Massenkräften \mathbf{f} .

$$\frac{D(\rho\mathbf{u})}{Dt} = \frac{\partial(\rho\mathbf{u})}{\partial t} + \nabla(\rho\mathbf{u}\mathbf{u}) = \rho \frac{\partial(\mathbf{u})}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = -\nabla p + \eta_K \nabla^2 \mathbf{u} + \mathbf{f} \quad 4.1$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla(\rho\mathbf{u}) = \nabla\mathbf{u} = 0 \quad 4.2$$

Die Massenerhaltung (Gl. 4.2) gewährleistet, dass keine Masse im System verloren oder erzeugt wird. Die Dichte inkompressibler Medien kann als konstant angenommen werden.

Die Energieerhaltung ist für Fälle mit großen Temperaturschwankungen, energetischen Quellen oder Senken wichtig. Die Temperatur beeinflusst die Materialeigenschaften des Mediums, die Diffusion gelöster Stoffe und die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Berechnungen in dieser Arbeit wurden für ein isothermes System aufgrund der Temperierung des Reaktors durchgeführt. Ein guter Überblick über die Energieerhaltung ist in Baehr und Stephan dargestellt (Baehr und Stephan 2010).

Die Durchströmung von porösen Packungen wird hier mit dem Modell von Ergun (Gl. 4.3) angenommen (Ergun 1952). Aus dieser Gleichung geht die Berechnung der Widerstandskraft für die Durchströmung des Partikelbetts analog der LBM aus Kapitel 1.1.1.3 hervor. Die Gleichung beschreibt den Druckverlust Δp , abhängig vom Partikeldurchmesser d_p , der Porosität der Packung ε_{bed} mit der Permeabilität α und dem Forchheimer-Koeffizienten K_f . Dabei beschreibt der Term mit der Permeabilität die laminare Durchströmung und der Term mit dem Forchheimer-Koeffizienten die turbulente Durchströmung der Packung.

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{150 \nu (1 - \varepsilon_{bed})^2}{d_p^2 \varepsilon_{bed}^3} \mathbf{u} + \frac{1.75 \rho (1 - \varepsilon_{bed})}{d_p \varepsilon_{bed}^3} \mathbf{u}^2 = \alpha \cdot \nu \cdot \mathbf{u} + K_f \cdot \rho \cdot \mathbf{u}^2 \quad 4.3$$

Die aus den Erhaltungssätzen resultierenden partiellen Differentialgleichungen können mit unterschiedlichen numerischen Methoden gelöst werden. Konventionelle Lösungsmethoden zur numerischen Berechnung des makroskopischen Fluidsystems sind die Finite-Differenzen-Methode (FDM), die Finite-Elementen-Methode (FEM) und die Finite-Volumen-Methode (FVM). Wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, ist die Lösung auch mit der LBM möglich. Die kommerziell meistgenutzten Programme wie ANSYS Fluent, ANSYS CFX, Siemens STAR-CCM+ oder OpenFoam basieren auf der FVM. In dieser Arbeit wird ANSYS Fluent zur Reaktormodellierung in 2D und 3D genutzt (Kapitel 4.6).

4.1.2 Diffusion in Flüssigkeiten

Die Bewegung einzelner Moleküle in einem Volumen im stationären Zustand kann mit dem 1. Fick'schen Gesetz (Gl.4.4) beschrieben werden. Der Stoffstrom \dot{N}_i der Komponente i ist durch die Konzentrationsunterschiede und die komponentenspezifischen Diffusionskoeffizienten D_i definiert. Mit einer Erweiterung des Fick'schen Gesetzes mit einem Quellterm können zusätzliche Einflüsse auf den Stofftransport abgebildet werden (z.B. aufgrund einer Reaktion R_i).

$$\dot{N}_i = -D_i \nabla c_i + R_i \quad 4.4$$

Unter der Voraussetzung, dass ein diffundierendes Molekül wesentlich größer ist als das Molekül des Mediums, kann es als Fremdkörper in einem Kontinuum betrachtet werden, der die Strömung des Fluids nicht beeinflusst. Albert Einstein formulierte unter Verwendung der Stokes'schen Reibung den Diffusionskoeffizienten für ein kugelförmiges Molekül mit dem Radius R_M bei der Temperatur T und der dynamischen Viskosität η_K des Kontinuums (Stokes-Einstein Gleichung):

$$D_i = \frac{k_b T}{6\pi\eta_K R_M} \quad 4.5$$

Basierend auf der Stokes-Einstein Gleichung haben sich viele Korrelationen entwickelt. Eine weit verbreitete ist das Modell von Wilke und Pin Chang (Wilke und Chang 1955), das in den Berechnungen dieser Arbeit genutzt wurde.

$$D_i = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(xM_K)^{0,5} T}{\eta_K V_m^{0,6}} \quad 4.6$$

M_s : Molekulargewicht des Lösemittels $\left[\frac{g}{mol} \right]$

x : Lösemittelspezifischer Faktor (Wasser:2,6)

V_m : Molekularvolumen der diffundierenden Komponente i $\left[\frac{m^3}{kmol} \right]$

Der Stofftransport aus einem Phasenkernel zu einer Oberfläche wird als Stoffübergang bezeichnet und mit dem Stoffübergangskoeffizienten β beschrieben. Der Stoffübergangskoeffizient β kann gemäß der Filmtheorie mit der Sherwood-Zahl berechnet werden. Die Sherwood-Zahl stellt das Verhältnis aus konvektivem zu natürlichem, diffusivem Stofftransport dar und wird empirisch abhängig von der Geometrie, den Materialeigenschaften und der Geschwindigkeit der strömenden Phase für unterschiedliche Fälle bestimmt. Diese können durch die Reynolds- und die Schmidt-Zahl zusammengefasst werden. Im Falle der Filmtheorie wird die Änderung der Konzentration zwischen der Bulkphase und der Phasengrenze als linear angenommen. In dieser Arbeit wird der Stofftransport zwischen dem strömenden Medium und der porösen Schicht unbeeinflusst von den seitlichen Rändern angenommen. Somit kann der Stofftransportkoeffizient β gemäß einer überströmten Schicht und einer mobilen Phase angenommen werden und wie folgt nach Kockmann berechnet werden (Gl. 4.7) (Kockmann 2007, S. 243).

$$Sh = B \left(1 + 0,095 \frac{d_h}{L} Re \cdot Sc \right)^{0,45} = \frac{\beta \cdot L}{D_i} \quad 4.7$$

Mit:

$B = 7,54$ für parallele Platten

$d_h = 4 \frac{A}{U}$: Hydraulischer Durchmesser

L : Länge des Kanals

$Re = \frac{u d_h}{\nu}$: Reynolds-Zahl

$Sc = \frac{\nu}{D}$: Schmidt-Zahl

ν : kinematische Viskosität $\left[\frac{m^2}{s} \right]$

4.1.3 Diffusion in porösen Medien

Die Charakterisierung des Stofftransports im porösen Bett oder in der Packung ist von entscheidender Bedeutung für die Überführung des Reaktors in ein mathematisches Modell, da die Eigenschaften der Packung die Verweilzeit und Diffusion einzelner Komponenten beeinflussen. Die makroskopische Betrachtung des Reaktors ermöglicht keine Auflösung der magnetischen Partikeln und stellt die Partikelpackung als poröses Bett mit den Merkmalen Porosität ε_{bed} und Tortuosität τ_{bed} dar.

Für uniforme Partikel in einer Packung können sich – orientiert an Kristallgittern – unterschiedliche Nahordnungen einstellen. Die optische Analyse (Kapitel 3.4.2) ergab eine Partikelbettanordnung, mit geringer Porosität, die sich im Bereich einer dichtesten und raumzentrierten Packung bewegt. Die modellhafte Beschreibung der Tortuosität ist für Partikelpackungen, die sich unter magnetischen Kräften bilden, schlecht erforscht. Deshalb wurde, auf Korrelationen von Packungen mit kristallinen Anordnungen zurückgegriffen. Da die Kräfte im Kanal sehr groß sind, kann von einer geringeren Porosität ausgegangen werden. Darum wurde dem porösen Bett eine homogene Porosität $\varepsilon_{bed} = 0,259$ (entsprechend einer kubisch dichtesten (FCC) Packung) zugesprochen.

Die Diffusion einer Komponente kann mit Hilfe der Porosität ε_{bed} und der Tortuosität τ_{bed} mit dem Kapillarmodell (Gl. 4.8) bestimmt werden. Das freie Volumen in der Packung kann als viele kleine Kapillaren betrachtet werden, durch die eine Komponente diffundiert. Nach dem Kapillarmodell (Hagen 1839) wird die Diffusion durch die Packung gehemmt. Das Modell nimmt an, dass sich die Diffusionswege in einem porösen Volumen aufgrund der Windung und der Größe der Kapillare verlängern (Baehr und Stephan 2010, S. 281).

$$D_{i,eff} = D_i \cdot \frac{\varepsilon_{bed}}{\tau_{bed}} \quad 4.8$$

Weissberg untersuchte die Tortuosität abhängig von der Partikelanordnung einheitlicher Partikeln (Weissberg 1963). Er formulierte eine mathematische Korrelation (Gleichung 4.9) und validierte diese für unterschiedliche Partikelpackungen. Die Tortuosität für eine dichteste Packung berechnet sich zu $\tau = 1,67$.

$$\tau = 1 - \frac{1}{2} \ln(\varepsilon_{bed}) \quad 4.9$$

4.2 Kinetische Hemmung im Partikelbett

Die Immobilisierung von Enzymen beeinflusst ihr kinetisches Verhalten. Im Allgemeinen verliert das immobilisierte Enzym an Aktivität und die Immobilisierung wirkt sich auf unterschiedliche Enzyme und Immobilisierungsmethoden verschieden aus (Peschke et al. 2018; Burgahn 2019). Dieses Verhalten beruht

auf unterschiedlichen chemischen und physikalischen Phänomenen. Einerseits können Konformationsänderungen durch die Fusionierung der Enzyme mit den Bindetags auftreten, die die Assoziationsprozesse beeinflussen können (Burgahn 2019). Die intrinsischen kinetischen Schätzparameter beziehen sich auf die Fusionsenzyme, die auf den Partikeln immobilisiert werden. Da nur das Binde-Tag Protein bei der Immobilisierung mit der Zieloberfläche interagiert, ist die Konformationsänderung des funktionellen Enzyms sehr gering. Aus diesem Grund kann eine Verringerung der Aktivität durch Konformationsänderung vernachlässigt werden. Des Weiteren können nahe gelegene Oberflächen oder Moleküle die Reaktion beeinflussen. Solche Oberflächen bzw. Hindernisse erhöhen die Diffusionswege einzelner Komponenten und können somit die Komplexbildungen der Reaktion verlangsamen.

In der makroskopischen Modellierung dieser Effekte ändern sich die Assoziationskonstanten K_M^i der beteiligten Komponenten unter der Annahme, dass die Immobilisierung einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Konformation des Enzyms hat. In dieser Arbeit wurden neue, gehemmte Assoziationskonstanten für die bei der Reduktion beteiligten Komponenten bestimmt.

4.3 Reaktorkenngrößen

Im Rahmen der Charakterisierung eines Flussreaktors werden in dieser Studie verschiedene Kenngrößen definiert, die zur Darstellung, Analyse und Optimierung des Reaktorsystems verwendet werden. Kenngrößen, die sich auf den Umsatzgrad X von Komponenten beziehen, sind die Ausbeute Y , die Selektivität S , die Raumzeitausbeute (STY; engl.: *space-time yield*) (Gl. 4.10) und die (enzymatische) katalysatorbezogene Produktivität (Gl. 4.11).

$$STY = \frac{\dot{m}_P}{V_R} = \frac{\dot{V}_{c_P} \tilde{M}_P}{V_R} \quad 4.10$$

$$prod_{cat} = \frac{m_P}{m_E} = \frac{\dot{V}_{c_P} \tilde{M}_P \cdot OT}{m_E} \quad 4.11$$

Die STY beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Produktstrom \dot{m}_P und dem Reaktorvolumen V_R . Das Reaktorvolumen setzt sich aus dem freien Kanalvolumen und dem Partikelbettvolumen zusammen.

Die katalytische Produktivität $prod_{cat}$ beschreibt, wie viel Produkt über eine bestimmte Betriebszeit OT im Verhältnis zur eingesetzten Menge an Enzym im Reaktor produziert wird. Für die Reaktoranalysen wurden die STY und die Produktivität auf das Intermediat der Reduktion (HK) und die entsprechend Menge an Gre2-HOB bezogen.

Eine Kenngröße, die Informationen über das Reaktorsystem gibt, ist der enzymatische Wirkungsgrad η_R (EU; engl.: *enzymatic utilization*). Diese Kenngröße bezieht sich auf den kompletten Reaktor und beschreibt, wie gut die immobilisierten Enzyme im Reaktor genutzt werden (Gl. 4.12). Die Definition bezieht

sich auf den durchschnittlichen Wirkungsgrad einzelner Segmente $\bar{\eta}_j$, die seriell in Strömungsrichtung angeordnet sind (Gl. 4.12). Der durchschnittliche Wirkungsgrad $\bar{\eta}_j$ berechnet eine volumenbezogene Abweichung der Reaktionsraten im Segment zur durchschnittlichen Reaktionsrate im Segment. $\bar{\eta}_j$ kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Kleine Werte beschreiben ein Segment, in dem die Reaktion hauptsächlich in einem kleinen Bereich des Segments stattfindet. Dies würde einer Oberflächenreaktion an der Phasengrenze entsprechen. Bei einem Wert von 1 sind die Reaktionsraten im gesamten Bett konstant. Somit hat jedes Enzym gleiche Reaktionsbedingungen. In diesem Fall liegt keine Stofftransportlimitierung im Bett vor.

$$\eta_R = \sum_{i=0}^{L_{end}} \frac{\bar{\eta}_i \Delta x}{L_{end}} \quad 4.12$$

$$\bar{\eta}_j = \frac{1}{\bar{R}_j d_{bed}} \sum_{i=0}^M R(c_{i,j}) \Delta y_i \quad 4.13$$

4.4 Pseudo 2D-Modell

Das Pseudo 2D-Modell basiert auf der Idee des Zellenmodells, das den Flussreaktor in einzelne, seriell angeordnete Segmente unterteilt (Baerns et al. 2013). Die einzelnen Segmente werden als ideal durchmischte Volumina berechnet. Im einfachsten Fall wird ein eindimensionales Modell erstellt. Diese Art von Modell ist in der Anwendung für Reaktoren mit homogenen Reaktionen oder durchströmten Packungen weit verbreitet (Baronas et al. 2018). Für die Untersuchung von Reaktoren mit überströmter Partikelpackung und immobilisierten Enzymen mit komplexeren Reaktionssystemen ist diese Herangehensweise nur bedingt ausreichend. Mehrsubstrat Reaktionen können erliegen, sobald eines der Substrate nicht vorhanden ist. Verschiedene Szenarien können dies bewirken wie z.B. verschiedene Anfangskonzentrationen der Substrate oder Mangel durch Stofftransport. Im Falle dieser Arbeit können beide Szenarien auftreten. Für diesen Reaktor ist der Strömungswiderstand im Bett, bedingt durch den kleinen Durchmesser der Partikeln, so groß, dass dort der Stofftransport von der Diffusion dominiert wird. Aus diesem Grund wird jedes Segment in zwei Volumina (Bettvolumen V_{bed} und freies Kanalvolumen V_{ec}) aufgeteilt (Abbildung 4.1 A). Die beiden Volumina sind über den Stofftransport miteinander verknüpft und im Bettvolumen wird allein die Diffusion quer zur Strömungsrichtung berücksichtigt. Die einzelnen Segmente sind über das freie Kanalvolumen über einen konvektiven Strom miteinander verbunden. Mit diesen Annahmen resultiert ein pseudo 2D-Modell.

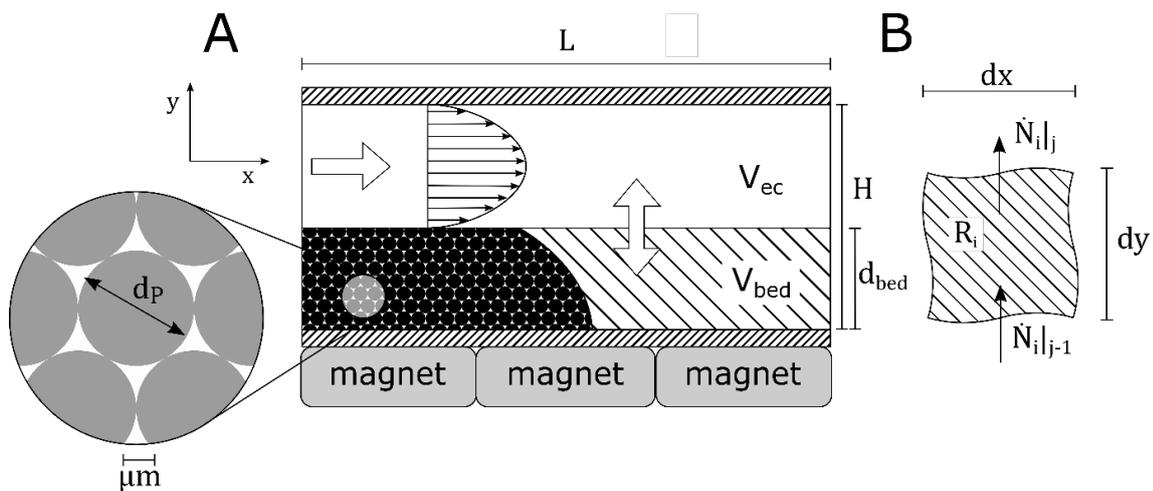


Abbildung 4.1 A) Schematische Darstellung des Reaktors mit Stoffübergang vom freien Kanalvolumen V_{ec} zur Oberfläche des Partikelbetts V_{bed} . B) Infinitesimales Volumen im Bettvolumen mit Transport- und Quelltermen.

Ein finiter Stoffübergang zwischen dem porösen Bett und dem freien Kanalvolumen wurde mit Hilfe einer Sherwood-Korrelation nach Kockmann (Kockmann 2007, S. 243) für überströmte Partikelbetten zwischen parallelen Platten gelöst. Das poröse Bett wird als homogene Partikelschüttung aus gleichförmigen Partikeln mit einer kubisch raumzentrierten Partikelanordnung modelliert. Die Berechnung der Schicht erfolgt über das Lösen der gewöhnlichen Differentialgleichung mit Fick'schem Stofftransport (Gl. 4.4). Die Konzentrationen im Partikelbett wurden mit einer Finite-Differenzen-Methode in Matlab (Randwertproblemlöser *bvp4c*) bestimmt. Um Diskretisierungsungenauigkeiten zu vermeiden und die Berechnung der einzelnen Zellen zu beschleunigen, wurde das Bettvolumen quer zu Strömungsrichtung in 60 Elemente unterteilt. Anhand der zu erwarteten Gradienten und Reaktionsraten wurden die Elemente zur Phasengrenze und eine entsprechende Matrix als Puffer für den Solver erstellt. Das Modell beschreibt jede Zelle im Bett nach Gleichung 4.14 bzw. 4.15 und ist in Abbildung 4.1 B dargestellt. Die Stoffmenge bzw. die Konzentration in einer Zelle mit konstantem Volumen wird durch die eingehenden Stoffströme benachbarter Zellen und einem Reaktionsquellterm beschrieben (Gl. 4.14). Die Packungseigenschaften verlängern den Diffusionsweg der Komponenten, was mit dem effektiven Diffusionskoeffizienten $D_{i,eff}$ (Kapillarmodell) berücksichtigt wird. Eine axiale Diffusion zwischen benachbarten Segmenten ist nicht berücksichtigt.

$$\left. \frac{dN_i}{dt} \right|_j = \dot{N}_i|_{j-1} - \dot{N}_i|_j + R_i dV \quad 4.14$$

$$dV \frac{dc_i}{dt} = D_{i,eff} \left(\left. \frac{\partial c_i}{\partial y} \right|_{j-1} - \left. \frac{\partial c_i}{\partial y} \right|_j \right) dx W + R_i dV \quad 4.15$$

Mit:

c_i : Konzentration der Komponente i $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$

R_i : Reaktionsrate der Komponente i $\left[\frac{mol}{Ls} \right]$

Das Partikelbett wird als quasihomogen angenommen, wodurch die Konzentration der immobilisierten Enzyme als durchschnittliche Konzentration berechnet wird (Gl. 4.16). Die durchschnittliche Enzymkonzentration $c_{E,imm.}$ berechnet sich aus der Enzymbeladung EL , der eingesetzten MB Masse m_{MB} bezogen auf das Volumen V_{Bett} und der Porosität des Betts ε .

$$\bar{c}_{E,imm.} = \frac{EL \cdot m_{MB}}{V_{Bett}} \cdot \frac{1}{\varepsilon} \quad 4.16$$

Mit:

$\bar{c}_{E,imm.}$: Durchschnittliche Enzymkonzentration $\left[\frac{mol}{L} \right]$

EL : Enzymbeladung $\left[\frac{mol}{kg(MB)} \right]$

Für die Lösung der Differentialgleichung werden Randwerte bzw. Randbedingungen benötigt. Am Boden des Reaktors wird eine Neumann-Bedingung (siehe Gl. 4.17) definiert. An der Phasengrenze ist ein finiter Stoffübergang als Randbedingung 3. Art (Gl. 4.20) angenommen. Die Reaktorbilanz wird mit der Randbedingung und der idealen Durchmischung verbunden und ist als Dirichlet-Randbedingung implementiert. Die Randbedingung wird iterativ mit einem Schwellenwert ermittelt. Die konvergierte Lösung eines Segments wird an das darauffolgende Segment als Startwerte übergeben, um die Berechnung zu beschleunigen. Für das erste Element wurden Startwerte berechnet, die das Konvergenzverhalten der Berechnung verbessern sollen.

$$\left. \frac{dc_i}{dy} \right|_{y=0} = 0 \quad 4.17$$

Reaktorbilanz:

$$0 = u H_{eff}(c_{i,in} - c_{i,out}) - \beta(c_{i,out} - c_i|_{y=1})\Delta x + R(c_{i,out}) \cdot \Delta x H_{eff} \quad 4.18$$

Randbedingung:

$$c_i|_{y=1} = c_{i,out} \quad 4.19$$

$$D_{i,eff} \left. \frac{dc_i}{dy} \right|_{y=1} = \beta(c_{i,out} - c_i|_{y=1}) \quad 4.20$$

4.4.1 Systembedingungen

Das beschriebene Modell wurde in Matlab objektorientiert implementiert und automatisiert. Um das Reaktorverhalten nach den entsprechenden Experimenten zu reproduzieren bzw. vorherzusagen, müssen die richtigen Rand- und Anfangsbedingungen spezifiziert und übergeben werden.

Enzymimmobilisierung. Je nach Reaktorfall werden Systeme entweder mit alleiniger immobilisierten Gre2-HOB und gelöster GDH(ST) (Standardfall) oder Immobilisierung beider Enzyme (Kapitel 2.1)

untersucht. Bei der gleichzeitigen Immobilisierung werden die Enzyme auf separaten magnetischen Partikeln immobilisiert und über das Partikelverhältnis wird eine durchschnittliche Enzymkonzentration berechnet. Dafür wird eine ideale Durchmischung der Partikel angenommen. Die Enzymbeladung für Gre2-HOB auf M-280 dynabeads beträgt 24 pmol/mg und für GDH(ST) auf M-270 dynabeads 55 pmol/mg . Die Enzymbeladungen wurden von Teresa Burgahn (Burgahn 2019) und Sandra Kröll des IBG-1 experimentell bestimmt.

Isothermie. Die stoffspezifischen Eigenschaften wie Viskosität, Dichte des Mediums (Verein Deutscher Ingenieure 2013) und Diffusionskoeffizient (Wilke und Chang 1955) wurden für eine konstante Temperatur von 30°C berechnet. Aufgrund der Temperierung des Reaktors und der geringen Reaktionsumsätze ist die Annahme eines isothermen Reaktors gerechtfertigt.

Partikelschichtdicke. Diese Experimente wurden für einen Kanal durchgeführt, der mit einer Partikelmasse von $4,5 \text{ mg}$ über die maximale Partikelbettlänge ($48,5 \text{ mm}$) beladen wurde. Der Reaktorkanal befindet sich direkt über den Magneten, entsprechend zu Kapitel 3.4.2. Komplementär zu den optischen Untersuchungen des Partikelbettes wurde eine dichteste Packung angenommen, womit sich eine Bett Höhe von $88 \text{ }\mu\text{m}$ ergibt (Gl. 3.20). Die immobilisierten Enzyme sind als ideal verteilt betrachtet. Im Modell wird der Stofftransport an der Kopffläche des Betts vernachlässigt.

Feed-Konzentrationen. Der Feed ist eine wässrige Lösung aus dem Edukt (NDK), Glucose, NADP+, GDH (Tetramer) und T-TEMg-Puffer (vgl. Tabelle 4.1). Der Puffer hält den pH-Wert konstant auf 7,6. Die Konzentration bzw. Konzentrationsverteilung des Puffers wurde in den Berechnungen nicht untersucht. Durch das gelöste Regenerationsenzym wird der Feed vorinkubiert, wodurch am Anfang des Betts NADP+ und NADPH im Gleichgewicht vorliegen.

Tabelle 4.1 Reaktoreintrittskonzentrationen für den Standardfall. NADPH und NADP+ sind nicht im Gleichgewicht.

Komponente	NDK	Glucose	NADP+	GDH(ST)
Konzentration [mmol/L]	5	100	1	$5 \cdot 10^{-3}$

Strömungsgeschwindigkeit. Die Feed-Lösung wurde mit $0,5 \text{ }\mu\text{L/min}$ (Standardfall) mit Spritzenpumpen in den Reaktor gepumpt. Der reduzierte Querschnitt durch das Partikelbett ergibt eine Strömungsgeschwindigkeit von $74,94 \text{ }\mu\text{m/s}$, eine Reynoldszahl von $Re = 0,005$. Dies entspricht einer mittleren hydrodynamische Verweilzeit von $\tau_R = \frac{V_{ec}}{v} = 787 \text{ s}$. Die hydrodynamische Verweilzeit beschreibt, wie lange die Strömung braucht, um über die Partikelschicht zu strömen und ergibt sich aus dem Volumenstrom \dot{V} und dem freien Kanalvolumen V_{ec} . Die konvektive Strömung durch die poröse Schicht ist aufgrund des Widerstands vernachlässigbar.

Diffusionskoeffizienten. Für die berechneten Komponenten wurde der Diffusionskoeffizient nach Wilke und Chang (Gl. 4.7) bestimmt (Tabelle 4.2). Nach Gleichung 4.8 ist der effektive Diffusionskoeffizient für eine dichteste Packung berechnet worden.

Tabelle 4.2 Molekülmasse M_i und molekularer Diffusionskoeffizient D_i nach Wilke und Chang für die berechneten Komponenten. GDH(ST) liegt als Tetramer vor.

Komponente	NDK	Glucose	NADP+	NADPH	GDH(ST)	GluAcid	HK	Diol
$\tilde{M}_i \left[\frac{g}{mol} \right]$	201,22	180,16	745,42	743,41	104705	178,14	202,22	203,22
$D_i \left[\frac{\mu m^2}{s} \right]$	828,32	1168,31	588,42	588,40	22	1171	828	828

Segmentgröße. Die segmentweise Berechnung des Pfropfstromreaktors (PFR) bedingt, dass die Segmentgröße angepasst wird, sodass im freien Kanalvolumen eine ideale Durchmischung erfüllt wird. Im Zellmodell wird weiterhin der konvektive Transport im freien Kanalvolumen als Pfropfströmung angenommen, die mit einer hinreichend kleinen Segmentgröße gewährleistet wird. Die theoretische, maximale Segmentgröße kann mit der Bodenstein-Zahl Bo (Gl. 4.21) berechnet werden. Mit dieser Segmentgröße kann außerdem die axiale Diffusion abgebildet werden. Für den Standardfall berechnet sich die Bodensteinzahl für NADPH auf $Bo = 12400$. NADPH ist das größte Molekül mit der geringsten Diffusionsgeschwindigkeit, das bei den Reaktionen umgesetzt wird. Für NADPH ergibt sich somit die höchsten Bo -Zahl. In der Literatur wird die Segmentgröße mit $N = \frac{Bo}{2} = 6200$ berechnet (Baerns et al. 2013, S. 192). Eine Analyse der Länge der Segmente ergab, dass für dieses System schon eine Segmentanzahl von $N = \frac{Bo}{8} \approx 800$ ausreicht, sodass der Fehler geringer als 0,025% ist (Anhang A10). Diese Erkenntnis lässt sich auf das diffusionsbestimmte Reaktorverhalten zurückführen. Da im freien Kanalvolumen geringe Quellterme zu erwarten sind, wird eine ausreichende Durchmischung des Volumens auch schon bei größerer Segmentlänge erreicht.

$$Bo = \frac{uL}{D_{ax}} \quad 4.21$$

Reaktion. Die mathematische Beschreibung der Reaktionen (Kapitel 2.3) wurde in das Modell implementiert. Die intrinsischen, kinetischen Parameter wurden bei der Ermittlung der gehemmten Parameter als Startwerte genutzt.

Stationarität. Die partielle Differentialgleichung Gl. 4.15 beschreibt das Diffusions- und Reaktionsverhalten in jedem Segment. Diese Gleichung kann in Matlab mit der der Funktion pdepe (The MathWorks, Inc. 2020) mit entsprechenden Randbedingungen gelöst werden. Somit lässt sich das transiente Verhalten der Konzentrationen im eindimensionalen Raum (senkrecht zur Strömungsrichtung) berechnen. Die transiente Lösung nähert sich mit fortschreitender Zeit einer stationären Lösung an. Für eine stationäre

Lösung wird dc_i/dt in Gl. 4.15 Null und aus der partiellen Differenzialgleichung wird eine gewöhnliche Differentialgleichung, die in Matlab mit der Funktion `bvp4c` und entsprechenden Randbedingungen (The MathWorks, Inc. 2020) gelöst werden kann. Ein Vergleich der transienten und stationären Lösung des Systems ergab identische Ergebnisse ab einer Reaktorlaufzeit von 2000 s (*ca.* $3 \cdot \tau_R$), was in den Experimenten gewährleistet ist (Anhang A11). Somit werden in den Berechnungen nur stationäre Lösungen betrachtet.

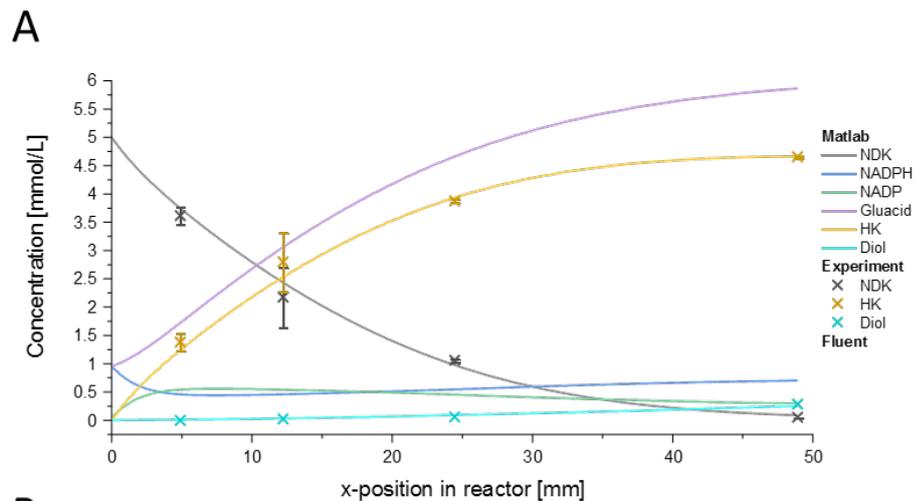
Extra Module. Für das pseudo 2D-Modell wurden weitere Funktionen bzw. Module implementiert, die in Zukunft genutzt werden können. Diese sind fallspezifisch und wurden aufgrund von fehlenden Informationen und zeitlichen Gründen nicht in dieser Arbeit genutzt. Ein Überblick der Module und deren Anwendungsfällen ist im Anhang A12 dokumentiert.

4.4.2 Bestimmung gehemmter kinetischer Parameter

Mit Hilfe des pseudo 2D-Modells kann das Reaktorverhalten vorhergesagt werden. Um den Einfluss der Immobilisierung zu untersuchen, wurden kinetische Parameter (Kapitel 4.2) für die Hemmung aufgrund der Immobilisierung von Gre2-HOB auf den magnetischen Partikeln bestimmt. Die Untersuchungen zu effektiven Aktivität von Gre2-HOB, immobilisiert auf den magnetischen Partikeln im Reaktor, wurden experimentell von der Arbeitsgruppe von C. Niemeyer durchgeführt (Burgahn 2019). In den Experimenten wurden vier unterschiedliche Bettlängen mit entsprechenden Partikelmassen untersucht. Dies ermöglicht eine orts aufgelöste Betrachtung des Umsatzes im Reaktor. Die daraus bestimmten Daten ermöglichen die Bestimmung von Parameterschätzwerten für die beiden gehemmten Reduktionsreaktionen. Die Immobilisierung der Enzyme auf den Partikeln verändert die Konformation der Enzyme nicht, weshalb die elementare Umsatzreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes sein Verhalten nicht verändert. Aus diesem Grund wurden die Schätzwerte für die Geschwindigkeitskonstanten der Reduktionen (k_1^+ und k_2^+) als identisch zu den intrinsischen angenommen. Die Parameter umfassen die gehemmten Assoziationskonstanten der Edukte und Inhibierungskonstanten der Produkte.

In der Reaktormodellierung werden häufig 1D-Modelle genutzt, um das Reaktorverhalten zu untersuchen. Obwohl solche Modelle oft eine schnelle Berechnung des Umsatzes ermöglichen, werden viele Annahmen zur Dimensionsreduktion getroffen. Insbesondere wird hierbei der Stofftransport in orthogonaler Richtung zur Strömung vernachlässigt. Das katalytische Reaktorbett in dem hier untersuchten Reaktordesign wird überströmt. Aufgrund der Partikelgröße und der daraus folgenden Widerstandskraft des Betts gegen eine Durchströmung, wird der Stofftransport größtenteils durch Diffusion geprägt. Aus diesem Grund ist die 2D-Betrachtung und die damit verbundene Diffusion im Reaktorbett essenziell für eine fundierte Berechnung des Reaktorverhaltens. Darüber hinaus ermöglicht die Berücksichtigung der Diffusion die Ermittlung des Einflusses der Immobilisierung auf das katalytische Verhalten der Enzyme.

Die Untersuchung einzelner Partikeln mit immobilisierten Enzymen wurde ebenfalls betrachtet. Jedoch ist der Umsatz von wenigen Partikeln sehr gering und konnten nicht gemessen werden. Bei Experimenten mit mehreren Partikeln verklumpten sich diese. Somit bildet sich wiederum ein System mit möglicher Stofftransporthemmung.



B

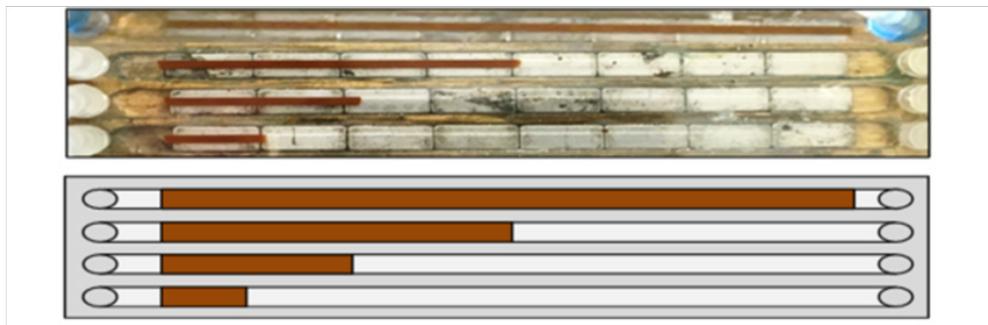


Abbildung 4.2 A: Ergebnis der Bestimmung der gehemmten Reaktionsparameter mit dem pseudo 2D-Modell. Dargestellt ist die Komponentenkonzentration im freien Reaktorvolumen im Verlauf des Reaktors und die experimentellen Werte. B: Bild und schematische Darstellung der unterschiedlichen Reaktorsetups mit unterschiedlich langen Partikelschichten (braun) von oben (Burgahn et al. 2020).

Analog zu den Parameterbestimmungen in Kapitel 2.3.3 wurde ein nichtlinearer Solver in Matlab mit der Methode der kleinsten Quadrate verwendet, um Parameterschätzwerte zu bestimmen. Die Berechnung der Abweichung wurde mit der Konzentration im freien Reaktorvolumen an der entsprechenden Position des Reaktors durchgeführt. Der Verlauf der Konzentrationen entlang des Reaktors in Strömungsrichtung

mit den neuen Parameterschätzwerten (Tabelle 4.15) ist in Abbildung 4.2 dargestellt und zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Werten.

Die neuen geschätzten Assoziationskonstanten haben sich im Vergleich zu den intrinsischen Parameterschätzwerten erhöht, was auf einen erhöhten Widerstand in den Assoziationsprozessen zurückzuführen ist. Dadurch sinkt bei gleichen Bedingungen die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Werte vergrößern sich um bis zu einer Potenz. Die Vertrauensbereiche der Parameter weisen eine große Varianz auf. Die Parameter der zweiten Reduktion zeigen einen relativ großen Vertrauensbereich auf, was auf die niedrigen Umsätze in den Experimenten zurückzuführen ist. Die Untersuchung einer langsamen Folgereaktion benötigt lange Verweilzeiten oder einen Feed mit hohem Anteil an Zwischenprodukt. Die Ausbeute der zweiten Reduktion (Diol) macht nur ca. 2 % aus. Dieser Wert ist im Bereich der Ungenauigkeit der Modellierungsergebnisse, wodurch die Signifikanz der kinetischen Parameterschätzwerte der zweiten Reduktion sinkt.

Tabelle 4.3 Bestimmte kinetische Parameterschätzwerte am freien Enzym (aus Tabelle 2.6) und für die gehemmte zweistufige Reduktionsreaktion mit den entsprechenden Vertrauensbereichen (95%). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der beiden Stufen entsprechen den intrinsischen, kinetischen Parameterschätzwerte (*).

Parameter	1. Reduktion			2. Reduktion	
	K_M^A [mM]	K_M^B [mM]	$k_{1,red}^+$ [1/s]	K_M^A [mM]	$k_{2,red}^+$ [1/s]
intrinsische Reaktion	6,57	0,10	11,27	0,17	0,027
Vertrauensbereich [min; max]	[3,76; 9,37]	[0,03; 0,17]	[7,66; 14,88]	[0,09; 0,42]	[0,019; 0,034]
gehemmte Reaktion	36,09	0,32	11,27*	2,75	0,027*
Vertrauensbereich [min; max]	[11,09; 61,09]	[0,04; 0,60]	[7,66; 14,88] *	[1,03; 6,53]	[0,019; 0,034] *

Tabelle 4.15 zeigt die bestimmten, gehemmten, kinetischen Parameterschätzwerte der Assoziationskonstanten K_M^A und K_M^B für die zweistufige Reduktion mit an magnetischen Partikeln immobilisierten Gre2-HOB im Vergleich zu den Parameterschätzwerten, die mit den freien Enzymen im Satzreaktor bestimmt wurden. Weiterhin sind die entsprechenden Vertrauensbereiche (95 %) dargestellt. Die kinetischen Konstanten $k_{1,red}^+$ und $k_{2,red}^+$ wurden als unbeeinflusst durch die Immobilisierung angenommen. Durch die Symmetrie von NDK und die Möglichkeit beider Ketogruppen zur Assoziation mit dem aktiven Zentrum erhöht sich die Assoziationsrate, womit sich der Wert der Assoziationskonstante verringert. HK hat nur eine Möglichkeit der Assoziation, weshalb dessen Assoziationskonstante größer ist als die von NDK. Die Parameter der zweiten Reduktion für HK und die Inhibierungskonstante des Diols haben einen

weiten Vertrauensbereich, da die experimentellen Daten nur geringe Umsätze der zweiten Reaktion beschreiben.

Wie oben erwähnt bietet das Pseudo-2D-Modell im Vergleich zu herkömmlichen 1D-Modellen von enzymatisch katalysierten Reaktoren einen Vorteil in Bezug auf die Modellierung des Katalysators oder in diesem Fall des Katalysatorbettes. Der Einfluss der Diffusion auf das Reaktorverhalten und die entsprechenden Konzentrationen und Reaktionsraten im Reaktor und im Katalysatorbett ist in Abbildung 4.3 für den Standardfall gezeigt.

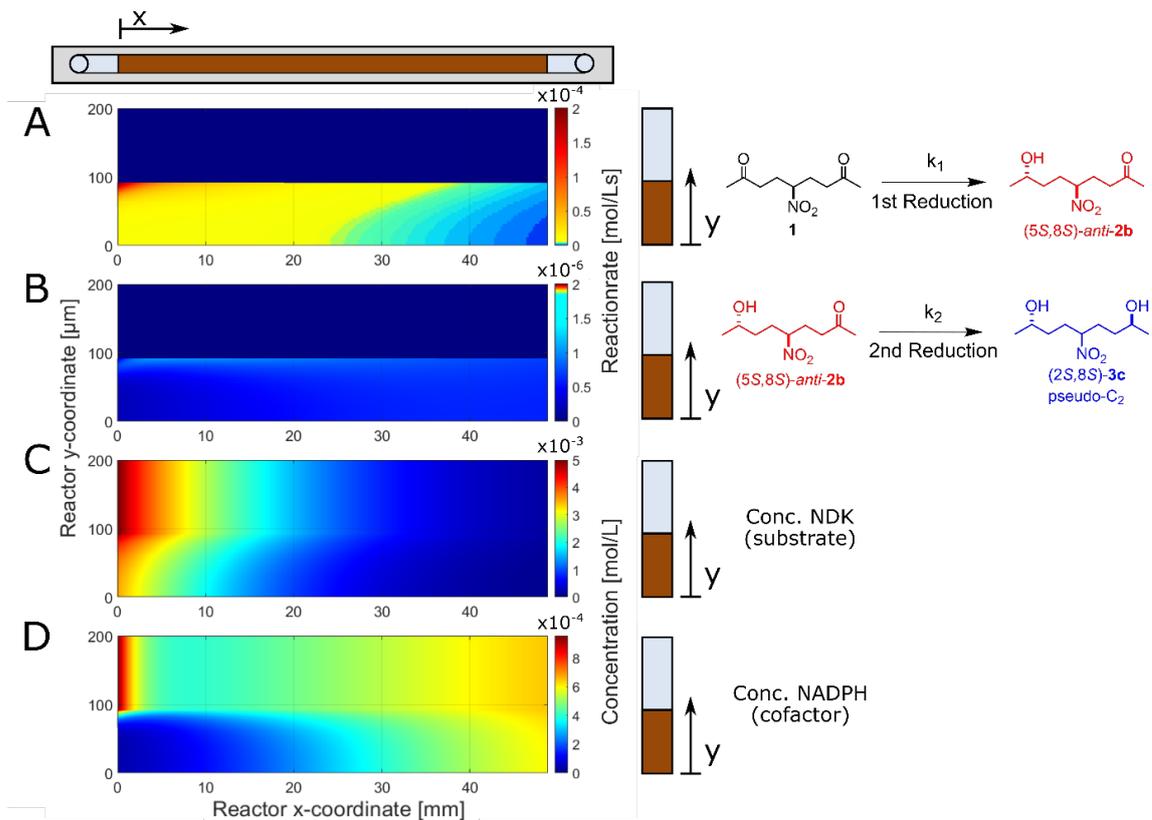


Abbildung 4.3 Zweidimensionale Darstellung der Reaktionsraten der Reduktionen (A: erste Reduktion, B: zweite Reduktion) und der Konzentrationen von NDK und NADPH. Die Kanalprojektionen mit dem Partikelbett (braun) sind schematisch dargestellt (oben: Draufsicht; rechts: Seitenansicht). Abbildung aus Burgahn et al. (Burgahn et al. 2020).

Die Reaktionsrate der ersten Reduktion (Abbildung 4.3 A) erreicht aufgrund der maximalen Edukt-Konzentrationen am Anfang des Reaktors ihre höchsten Werte. Im Verlauf des Reaktors sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit mit fallender NDK-Konzentration (Abbildung 4.3 C). Im gesamten Reaktorbett sind die Reaktionsgeschwindigkeiten an der Phasengrenze zum freien Kanalvolumen am größten. Der Grund dafür ist eine in die Tiefe des Bettes niedriger werdende Cofaktor (NADPH) Konzentration (Abbildung 4.3 D). Die Regeneration von NADPH und der Stofftransport aus dem freien Kanalvolumen reicht nicht aus, um hohe Reduktionsraten in der Schicht aufrecht zu erhalten (Cofaktor-Regenerationsreaktion Limitierung). NADPH wird in der porösen Schicht fast komplett aufgebraucht. Es stellt sich ein Gleichgewicht aus

Stofftransport und Reaktion des Cofaktors ein. Die zweite Reduktion (Folgereaktion) wird in Abbildung 4.3 B dargestellt und zeigt in der Schicht die gleiche Tendenz wie die erste Reduktion. Die Folgereaktion ist am Anfang des Reaktors langsamer, da zunächst kein Edukt (HK) vorhanden ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit der zweiten Reduktion ist im letzten Drittel des Reaktors konstant im Bett, da ausreichend NADPH und HK vorhanden sind und die Geschwindigkeit für die parallele erste Reduktion aufgrund kleiner NDK-Konzentrationen kaum noch stattfindet.

Die Konzentrations- und Reaktionsratenverteilungen zeigen weiterhin die Limitierungen bzw. das mögliche Optimierungspotential des Standardfalls. In diesem Fall sind die Reaktionen im Partikelbett aufgrund der geringen NADPH-Konzentration limitiert. Diese kann sowohl durch Verstärkung der Regeneration oder durch Erhöhung des Stofftransports erreicht werden. Für dieses Ergebnis der Reaktorberechnung sind in Tabelle 4.4 die Reaktorkenngrößen aus Kapitel 4.3 angegeben. Neben den üblichen Reaktorkenngrößen (Raumzeitausbeute (STY, engl.: *space-time yield*), Produktivität, dem Reaktorumsatz, Reaktorselektivität etc.) ist auch der (enzymatische) Katalysatornutzungsgrad (EU, engl.: *enzymatic utilization*) festgehalten.

Tabelle 4.4 Reaktorkenngrößen für den Standardfall mit gehemmten, kinetischen Parametern: Verweilzeit τ_R , STY, Produktivität (bezogen auf einen Tag) und enzymatischer Nutzungsgrad.

	Verweilzeit τ_R [s]	STY [$gL^{-1}day^{-1}$]	Produktivität [$g(HK)g(Gre2)^{-1}$]	Enzym Nutzungsgrad (EU) $\eta_R[-]$
Wert	787	53,90	155,9	0,74

Ein Vergleich zwischen dem Flussreaktor und einem konventionellen Satzreaktor (0D transiente Reaktionsmodellierung) zeigt die Vorzüge eines kontinuierlichen Systems. Das theoretische Verhalten eines Satzreaktors mit nicht immobilisierten Enzymen wurde ebenfalls untersucht und mit dem des Flussreaktors im Standardfall (Kapitel 4.4.1) verglichen. Nach einer Betriebszeit von zwei Stunden erreicht der Satzreaktor seine maximale HK-Ausbeute, womit sich eine Produktivität von $63,2 g(HK)g(Gre2)^{-1}$ und einer STY von $11,6 gL^{-1}day^{-1}$ berechnet. Um diese Werte aufrecht zu halten, müsste die Wiederverwendbarkeit der Enzyme gewährleistet werden. Weiterhin muss die Rüstzeit für einen neuen Ansatz berücksichtigt werden. Die Produktivität eines kontinuierlichen Reaktors steigt mit der Betriebszeit. Für den in diesem Unterkapitel beschriebenen Reaktor (Standardfall) ergibt sich ein Break-Even-Point nach einer Betriebszeit von fünf Stunden.

4.5 Modellvalidierung

Die Modellierung eines Flussreaktors ist für eine systematische Optimierung essenziell und erfordert nach der Ermittlung der nötigen kinetischen Parameter eine experimentelle Validierung. Das Reaktorverhalten mit unterschiedlichen Volumenströmen und Partikelmassen wurde untersucht und mit den Ergebnissen

des pseudo 2D-Modells verglichen. Die Experimente wurden von T. Burgahn durchgeführt und analysiert (Burgahn 2019).

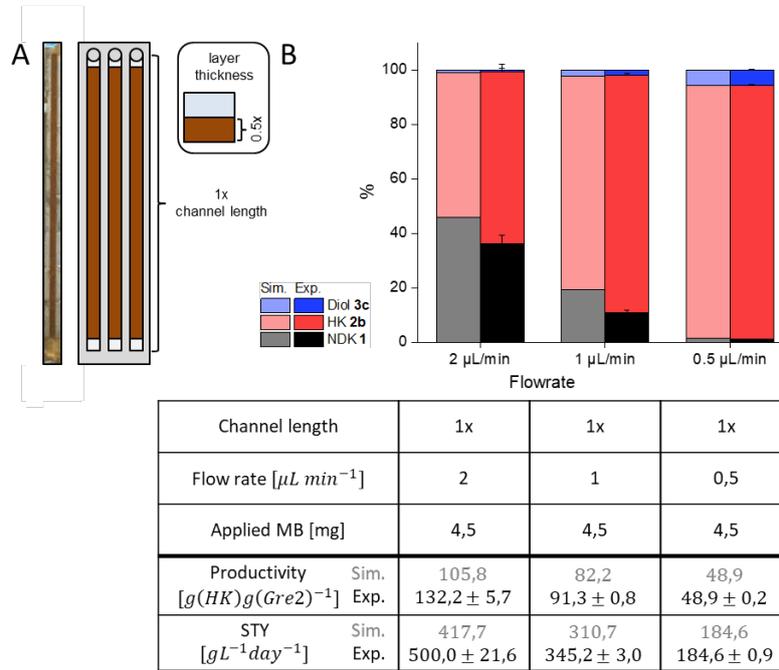


Abbildung 4.4 Austrittskonzentrationsverteilung und Reaktorkenngrößen (STY, Produktivität und EU) für Volumenströme von 0,5 bis 2,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Der Reaktorkanal ist beladen mit 4,5mg Partikeln mit immobilisierter Gre2-HOB. A: Bild und Schema des Reaktorkanals. B: Austrittskonzentrationsverteilung für die Experimente und die Berechnungen mit dem pseudo 2D-Modell. Abbildung adaptiert aus Burgahn et al. (Burgahn et al. 2020).

Der Volumenstrom wurde von 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Standardfall) bis zu 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ für einen voll beladenen Reaktorkanal mit 4,5 mg MBs mit immobilisierter Gre2-HOB variiert. Entsprechende Simulationen wurden mit dem pseudo 2D-Modell durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Die Berechnungen mit dem Modell stimmen qualitativ mit den Experimenten überein. Das Modell sagt für erhöhte Volumenströme einen niedrigeren Umsatz vorher. Die Menge an produziertem Diol und HK deckt sich gut mit den Experimenten. Die Erhöhung des Volumenstroms reduziert die Verweilzeit der Komponenten im Reaktor. Damit sinkt deren Kontaktzeit mit der porösen Schicht und letztlich der Umsatz von NDK, die Produktivität und der Enzymnutzungsgrad *EU*. Für größere Volumenströme erhöht sich die STY, da die Verweilzeit sinkt. Für Aufreinigungsverfahren, die nach dem Reaktor geschaltet sind, bedeutet ein geringerer Umsatzgrad des Edukts einen erhöhten Aufwand an Separations- und Aufreinigungsstufen.

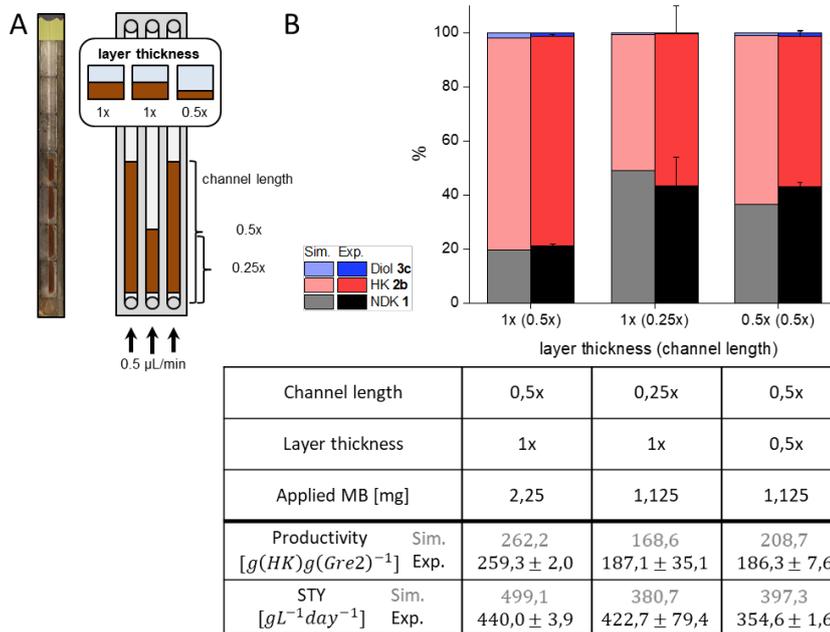


Abbildung 4.5 Austrittskonzentrationsverteilung und Reaktorengrößen (STY, Produktivität und EU) für Fälle mit unterschiedlichen durchschnittlichen Schichtdicken (1x entspricht dem Standardfall). Auf den Partikeln ist Gre2-HOB immobilisiert. A: Bild und Schema des Reaktorkanals. B: Austrittskonzentrationsverteilung für die Experimente und die Berechnungen mit dem pseudo 2D-Modell. Abbildung adaptiert aus Burgahn et al. (Burgahn et al. 2020).

In einer zweiten Verifikationsreihe wurde der Einfluss der Bett Dicke auf das Reaktorverhalten untersucht. Hierfür wurde im Experiment ein Objektträger der Dicke 100 μm zwischen den Reaktorchip und die Magnete gelegt. Die magnetischen Kräfte auf die Partikeln im Kanal sind geringer, wodurch sich eine dünnere Partikelschicht aufbaut. Bei dem Befüllungsvorgang wurde der Kanal mit 1,125 mg Partikel beladen. Das entstehende Partikelbett (Abbildung 4.5 A) verläuft über 4 Magnete (halbe maximale Befüllungslänge). In der Modellierung wurde eine Schichtdicke d_{bed} von 44 μm (die Hälfte des Standardfalls) angenommen. Wie Abbildung 4.5 A zeigt, sind die Betten nicht komplett kontinuierlich. Dies bestätigt ein weiteres Mal das Auffüllungsverhalten, beschrieben in Kapitel 3.4.2. Die experimentell bestimmten und mit dem pseudo 2D-Modell vorhergesagten Reaktoraustrittskonzentrationsverteilungen sind in Abbildung 4.5 B dargestellt. Die Simulation überschätzt für ein dünneres Partikelbett den NDK-Umsatz. Dies legt nahe, dass der Stofftransport in die Schicht leicht überschätzt wird und in der Folge ein erhöhter NDK-Umsatz berechnet wird.

Abbildung 4.5 zeigt außerdem Vergleichsfälle mit der Standard-Partikelbettdicke aus der Parameterbestimmung (Kapitel 4.4.2) mit gleicher Partikelbettlänge (links) und gleicher Partikelmasse (halbe Partikelbettlänge). Der Vergleich zwischen den Fällen mit gleicher Partikelbettlänge (linke und mittige Spalte in Abbildung 4.5) verdeutlicht, dass für die höhere Partikelmenge auch ein erhöhter Umsatzgrad erzielt wird. Die Versuche mit gleicher Partikelmenge (mittige und rechte Spalte in Abbildung 4.5) weisen geringe

Unterschiede auf. Zu bemerken ist eine größere Standardabweichung für das dickere Bett, das einen experimentellen Fehler nahelegt. Die Simulation stellt ein plausibles Verhalten dar. Mit geringerer Schichtdicke ist die Schichtoberfläche geringer und somit sind Enzyme in tieferen Schichten des Partikelbetts einfacher erreichbar (geringere Diffusionslänge). Des Weiteren wird dieser Effekt durch eine erhöhte hydrodynamische Verweilzeit verstärkt. Durch das dünnere Bett erhöht sich die Verweilzeit um 40 % auf 1100 s (bezogen auf eine maximale Länge des Reaktorbetts). Dadurch haben die Komponenten länger Zeit in die Partikelschicht zu diffundieren und somit eine längere Kontaktzeit mit den Enzymen. Dadurch steigt der Umsatz, Produktivität und damit der Enzymnutzungsgrad für dünnere Partikelschichten.

Die Unterschiede zwischen der Simulation und den Experimenten können unterschiedliche Gründe haben. Wie in optischen Untersuchungen der Partikelschicht beobachtet, sind die Partikelschichten i) nicht homogen dick und ii) weisen Verkettungen der Partikel auf, die aus interpartikulären magnetischen Kräften resultieren. Durch i) verändert sich die theoretische Grenzfläche zwischen dem Partikelbett und dem freien Kanalvolumen. Darüber hinaus können sich durch die Verkettung Lücken im Partikelbett bilden und die Porosität und somit die Diffusion der Komponenten beschleunigen.

Die Validierung zeigt, dass das Modell Trends für erhöhte Volumenströme und dünnere Partikelbettdicken abbilden kann. Außerdem zeigen die Untersuchungen, dass der Standardfall ein großes Verbesserungspotential aufweist. Vor allem die Reduktionsreaktion in der Schicht ist durch die sinkende NADPH-Konzentration im Partikelbett limitiert. Die Regulierung der Cofaktorregenerations- und Reduktionsreaktion ist eine der zentralen Aufgaben bei der Optimierung dieses Systems.

4.6 Numerische FVM-Modelle

Das Pseudo-2D Modell in Matlab basiert auf der Projektion des dreidimensionalen Reaktors auf eine 1D- bzw. Pseudo-2D Ebene. Diese Vereinfachungen können einen Einfluss auf das Reaktorverhalten haben. So müssen in Modellen mit reduzierter Dimension komplexe Strömungen und Einflüsse von geometrischen Formen durch Annahmen und Vereinfachungen dargestellt werden. Speziell im Pseudo-2D Modell sind die Annahmen der Hydrodynamik, des Stoffübergangs mittels der Sherwood-Korrelation, die axiale Diffusion (in Strömungsrichtung) und die homogene Komponentenverteilung über die Breite des Kanals diskussionswürdig. Um die Einflüsse dieser Annahmen zu untersuchen, wurde der Reaktor und die Modellgrundlage für das Pseudo-2D Modell in ein 2D und 3D Modell in ANSYS Fluent® überführt. Diese werden im Folgenden „Fluent 2D“ und „Fluent 3D“ genannt.

4.6.1 Numerisches Setup

Die Reaktormodellierung mit ANSYS Fluent und die Reaktorberechnung basieren auf den Erhaltungssätzen aus Kapitel 4.1. Diese vollständige Beschreibung der Hydrodynamik im Reaktor ermöglicht eine physikalisch genauere Beschreibung des experimentellen Reaktors. Die Erstellung der Reaktormodelle für den 2D bzw. 3D Fall teilt sich in verschiedene Stufen auf: Erstellen der Geometrie, Diskretisierung des Berechnungsvolumens (Gittererstellung), Definition von System-, Anfangs- und Randbedingungen und numerische Berechnung. Die Systembedingungen für Enzymimmobilisierung, Isothermie und Feed-Konzentrationen entsprechen denen aus dem Pseudo-2D Modell (Kapitel 4.4.1).

Geometrie. Die Modelle bilden einen Reaktor mit der Höhe $200 \mu\text{m}$ und der Breite 2 mm (3D-Modell) ab. Die Länge des untersuchten Kanals wurde abhängig von der Zellenanzahl des Gitters und dem Rechenaufwand angepasst (2D: 25 mm 3D: 1 mm). Im Reaktorkanal wurden Regionen definiert, die zwischen dem freien Volumen und der Partikelschicht unterscheiden. In der zweidimensionalen Betrachtung sind die Volumina in der Breite als infinitesimal dünn betrachtet. Die Partikelschicht ist als homogene, poröse Schicht mit einer konstanten Höhe von $88 \mu\text{m}$ angenommen. Die Porosität der Schicht wird mit der Permeabilität $\alpha = 1,9 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2$ und der Porosität $\varepsilon_{bed} = 0,269$ berücksichtigt. Der turbulente Term wird aufgrund der geringen Strömungsgeschwindigkeiten ($\text{Re} < 1$) vernachlässigt. Die Stirnflächen der Partikelschicht werden in den Modellen vernachlässigt und lediglich das Überströmen der Schicht betrachtet.

Diskretisierung. Die Diskretisierung bzw. die Erzeugung des Rechengitters teilt das Volumen des Reaktors in Zellen auf. Größe und Anzahl der Zellen haben einen Einfluss auf die Berechnungszeit, die Stabilität aber auch auf die Ergebnisse, falls zu grob gewählt. Die Bereiche für den freien Kanal und die Partikelschicht wurden mit rechteckigen (2D) bzw. quaderförmigen Zellen (3D) beschrieben. Die Höhe der Zellen wurde abhängig von den zu erwartenden Gradienten in der Konzentration und der Geschwindigkeit angepasst. Im 3D-Modell wurde die Breite der Zellen an den Wänden adaptiert. Somit ergaben sich Verfeinerungen an den Wänden des Kanals und an der Phasengrenze zwischen freiem und porösem Bereich. Die Länge der Zellen wurde in allen Fällen konstant gehalten ($2 \mu\text{m}$). Die entstehenden Gitter der Modelle umfassen 3 Millionen Zellen für 25 mm des 2D-Modells und 8 Millionen Zellen für 1 mm des 3D-Modells. Am Anfang des Reaktors sind die größten Gradienten und Reaktionsumsätze zu erwarten. Deshalb wurde dieser als repräsentativ für die Modelle untersucht.

Diffusion. Die molekularen und effektiven Diffusionskoeffizienten wurden wie in Kapitel 4.4.1 für die beteiligten Komponenten berechnet. Die Implementierung der Diffusionskoeffizienten wurde mittels einer User-Defined-Function (UDF) und dem Makro „DEFINE_DIFFUSIVITY“ den Komponenten und Bereichen zugeschrieben.

Randbedingungen. Die Zweckmäßigkeit von Randbedingungen besteht darin, eine Über- oder Unterbestimmtheit des mathematischen Modells zu vermeiden und die Interaktion zwischen den Gitterbereichen zu gewährleisten. Das freie Volumen über dem Partikel Aufbau wurde als ein rechteckiger Durchströmungskanal betrachtet. Eine Dirichlet-Randbedingung (feste Eintrittsgeschwindigkeit) und eine Neumann-Randbedingung (fester Druckgradient) wurden am Einlass des Kanals angewendet. Im Gegensatz dazu wurde am Auslass eine Referenzdruckbedingung von Null bar (Umgebungsdruck) für den Druck angenommen. Eine Haftbedingung wurde für die Wände des Kanals und an der Oberfläche des porösen Mediums definiert. Beim Einlass und Auslass wurden die Stoffströme im Bereich der Partikelschicht aufgrund der geringen Permeabilität vernachlässigt.

Strömungsgeschwindigkeit. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit wurde nach der Kontinuitätsgleichung für einen Volumenstrom von $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ berechnet und in die Modelle eingearbeitet. Die Eintrittsgeschwindigkeitsverteilung wurde in einer separaten Strömungssimulation mit dem Modell bestimmt.

Reaktionskinetik. In Fluent kann auf Standard-Reaktionsmechanismen in Form von n-ter Reaktionsordnung zurückgegriffen werden. Spezifische Reaktionsmechanismen - wie in dieser Arbeit - müssen über eine User-Defined-Function (UDF) beschrieben und implementiert werden. Fluent ermöglicht zwei unterschiedliche Methoden für die Implementierung von Reaktionen mit UDFs. In einem Vergleich der Methoden (Kapitel A13.1) wurde die Implementierung der Reaktionskinetik untersucht und bewertet. Für den Fall einer schnellen Reaktion im Vergleich zum Stofftransport wird der „stiff-chemistry Solver“ in Fluent empfohlen, der eine sehr gute Übereinstimmung mit Berechnungen aus Matlab zeigt. Parameterschätzwerte für die Assoziationskonstanten gemäß Tabelle 4.15 wurden in der UDF angegeben.

Numerische Berechnung. Die Berechnung der Lösung der Reaktormodelle wurde in zwei separate Schritte aufgeteilt. Die Strömung des Mediums wurde in einem ersten Schritt ohne die Berücksichtigung des Stofftransports der Komponenten berechnet. Das resultierende Strömungsfeld wurde als unbeeinflusst von der Komponentenverteilung angenommen. In einem zweiten Schritt wurde die Komponentenverteilung unter Vernachlässigung der Impulsberechnung ermittelt. Für die Vergleichbarkeit der Modelle wurden stationäre Zustände mit dem transienten Lösungsverfahren berechnet. Die stationäre Berechnungsmethode, die in ANSYS Fluent verfügbar ist, hat zu keinem konvergierten Ergebnis geführt, das physikalisch schlüssig war. Dies wurde auf eine schnelle Reaktionskinetik im Vergleich zum Stofftransport zurückgeführt. Daher wurde eine transiente Berechnung des Reaktorverhaltens verwendet. Die Stationarität der Berechnungen wurde durch die Berechnung des Mittelwerts der Komponentenkonzentration im Berechnungsraum definiert.

Weitere Details über die numerischen Hintergründe der FVM-Modelle sind im Anhang A13 für das 2D und 3D-Modell zu finden. Die Berechnungen mit den Fluent Modellen wurden auf einem Hochleistungsrechner mit 16 Kernen und 128 GB RAM durchgeführt.

4.7 Modellvergleich

In diesem Kapitel werden die beschriebenen Modelle Pseudo-2D, Fluent 2D und Fluent 3D verglichen. Die Evaluierung der Modelle erfolgt auf Basis ihrer Genauigkeit und numerischen Effizienz, um zu beurteilen, ob der höhere numerische Aufwand der Finite-Volume-Methoden (FVM) gerechtfertigt ist. Die Implementierung der kinetischen Modelle (Kapitel 2.3.2) wurde erfolgreich über eine UDF durchgeführt und mit einem Satzreaktormodell in Fluent validiert (Kapitel A13.1).

Die Pseudo-2D und Fluent 2D Modelle beschreiben den Reaktor in zwei Dimensionen und weisen nur geringe Unterschiede auf. Dies macht es möglich, die Modelle direkt miteinander zu vergleichen und die getroffenen Annahmen bzw. Vereinfachungen des Matlab Modells zu beurteilen. Im Folgenden werden Konzentrationen im freien Kanal als gemittelte Konzentrationen über die Höhe des Kanals verglichen.

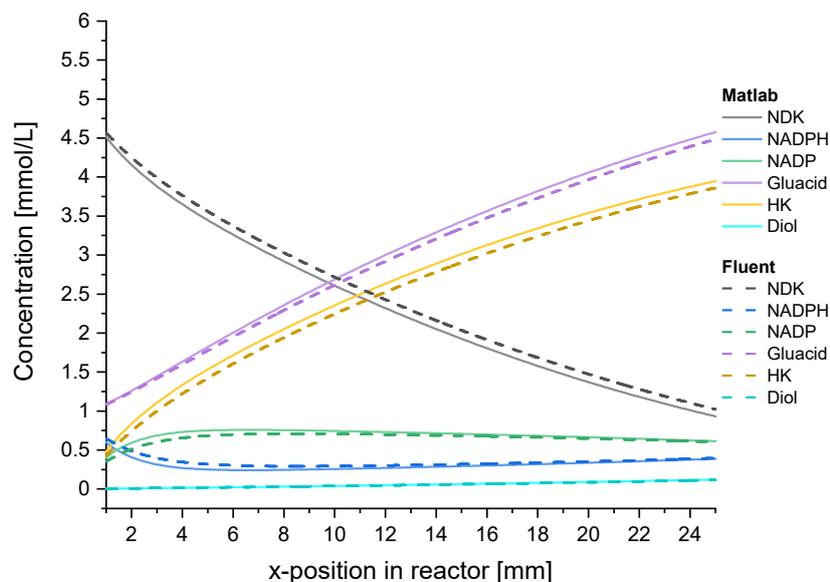


Abbildung 4.6 Verlauf der durchschnittlichen Konzentrationen im freien Kanalvolumen über die Hälfte der Reaktorlänge für die beiden zweidimensionalen Modelle aus Matlab (durchgehende Linien) und Fluent (gestrichelte Linien).

Das berechnete Reaktorverhalten beider Modelle wird durch die Konzentrationen im freien Kanalvolumen beschrieben (Abbildung 4.6). Um einen Vergleich zwischen dem pseudo 2D-Modell in Matlab und dem Fluent 2D Modell zu ermöglichen, wurde eine gemittelte Konzentration der Komponenten im freien Kanalvolumen berechnet. Für das Fluent 2D Modell wurden dafür die Konzentrationen in den Zellen, abhängig von der Geschwindigkeit und bezogen auf die mittlere Geschwindigkeit im freien Kanalvolumen, gewichtet und gemittelt. Die ermittelten Konzentrationen der beiden Modelle weichen leicht voneinander ab. Die Unterschiede vergrößern sich nicht im Verlauf des berechneten Reaktors. Nach 25 mm der

Reaktorkanallänge beträgt die Abweichung der HK-Konzentration 3,4 % des Pseudo-2D Modells im Vergleich zum Fluent 2D Modell. Die Konzentrationen für NADPH und NADP+ weichen anfangs ab und nähern sich wieder an. Durch die geringeren Umsatzraten der Reduktionsreaktionen erreicht die Regenerationsreaktion ihr Gleichgewicht, wodurch die Annäherung der Konzentrationen erklärt wird. Die Gründe für die Unterschiede der Konzentrationsverläufe beider Modelle basieren auf den zusätzlichen Annahmen des Pseudo-2D Modells. Die Veranschaulichung der Gründe wird im Anfangsbereich des Reaktors sichtbar. Die Komponentenkonzentrationen am Anfang des Reaktors sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

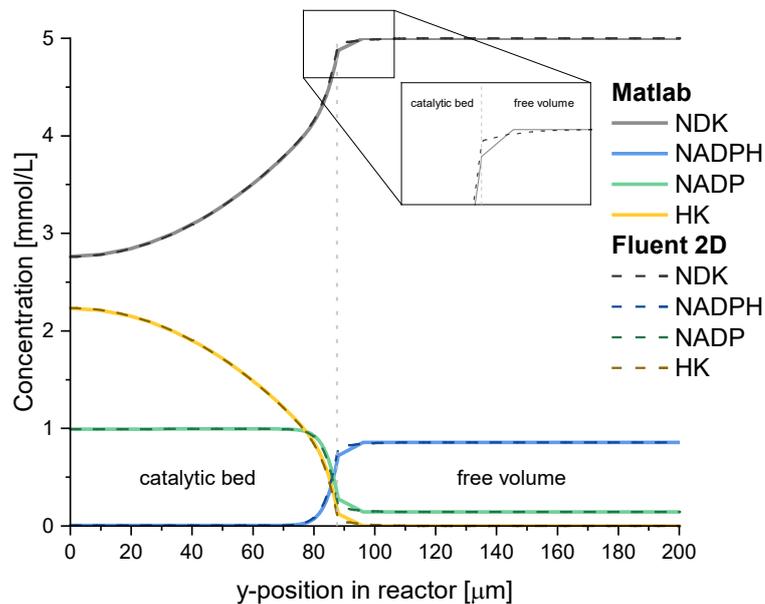


Abbildung 4.7 Konzentrationsverlauf am Anfang des Reaktors im porösen Bett und im freien Kanalvolumen für das pseudo 2D-Modell in Matlab (durchgehende Linien) und das Fluent 2D Modell (gestrichelte Linien). Die Phasengrenze ist mit einer vertikalen, gestrichelten, grauen Linie gekennzeichnet. Die Phasengrenze ist vergrößert dargestellt.

Der Vergleich zwischen dem Pseudo-2D-Modell und dem Fluent 2D-Modell ergab, dass es bei den Konzentrationsverläufen im Partikelbett keine signifikanten Unterschiede gibt. Der Hauptunterschied zwischen den Modellen zeigt sich jedoch an der Phasengrenze, insbesondere im strömenden Medium. Für das Pseudo-2D Modell ist die modellierte Filmschicht dargestellt. Dadurch ergeben sich eckige Verläufe der Konzentration. Die Filmschichtdicke ist mit dem Stoffübergangskoeffizienten β und dem Diffusionskoeffizienten D berechnet und in der Abbildung zu erkennen. Der Verlauf der Berechnungen vom Fluent 2D-Modell ist kontinuierlich und benötigt keine Sherwood-Korrelation zur Berechnung des Stoffübergangs. Der Konzentrationsverlauf der beiden Methoden zur Berechnung des Stoffübergangs an der Phasengrenze ist in Abbildung 4.7 vergrößert. Im Fluent 2D-Modell ist die NDK-Konzentration leicht erhöht, was für einen geringeren Stofftransport zwischen den beiden Bereichen bzw. Phasen spricht. Dies legt

nahe, dass die angewendete Sherwood-Korrelation den Stofftransport überschätzt und somit die Reduktionen in der Partikelschicht beschleunigt.

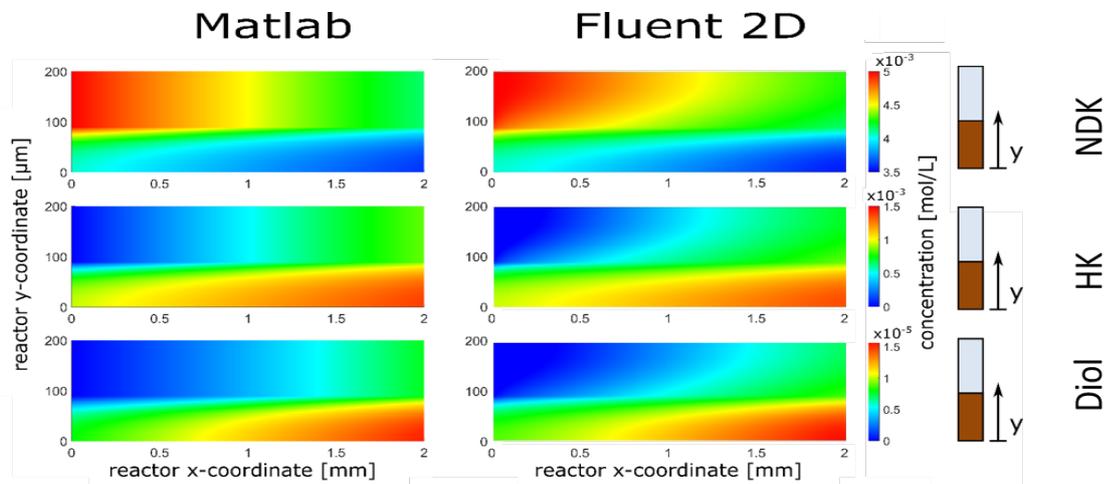


Abbildung 4.8 Konzentrationsverteilungen des Pseudo-2D Modells in Matlab und des Fluent 2D Modells für die ersten zwei Millimeter des Reaktors für NDK, HK und Diol. Ein Schema der Bereiche und die Farbskalen sind rechts neben den Plots dargestellt.

Die Modelle können weiterhin bzgl. der Konzentrationsverteilung der einzelnen Komponenten verglichen werden. In Abbildung 4.8 sind die Konzentrationen von NDK, HK und dem Diol in den ersten zwei Millimetern des Reaktors dargestellt. Wie auch schon in Abbildung 4.7 sind die Verläufe bzw. Konzentrationsverteilungen im porösen Bett sehr ähnlich. Der größte Unterschied ist im freien Kanalvolumen zu erkennen. In dem Fluent 2D Modell können Konzentrationsgradienten in der Höhe (y-Koordinate) berechnet werden, wohingegen im Pseudo-2D Modell die Konzentrationen aufgrund der Annahmen konstant sind.

Das Pseudo-2D Modell vernachlässigt die axiale Diffusion zwischen den Segmenten, während sie in den Fluent Modellen berücksichtigt wurde. Dieser Effekt kann speziell bei großen Gradienten in der Konzentration einen signifikanten Einfluss haben. Der Vergleich der beiden Konzentrationsverteilungen im Anfangsbereich (Abbildung 4.8) weist kaum Unterschiede auf. Das bedeutet, dass die axiale Diffusion hier einen geringen Einfluss auf den Reaktorumsatz hat. Weiterhin zeigt dies, dass die Segmentanzahl bzw. Größe des pseudo 2D-Modell angemessen gewählt wurde.

Trotz dieser Unterschiede zwischen den Modellen in Berechnungsmethoden und Diskretisierung zeigen sich nur geringe Unterschiede im Umsatz und in der Konzentrationsverteilung der zweidimensionalen Modelle. Aufgrund der Abbildung der Strömung und Komponentenverteilung im freien Kanalvolumen ergibt das Fluent 2D Modells physikalisch sinnvollere Ergebnisse im Vergleich zum pseudo-2D Modell.

Die Vergrößerung der Modelldimension stellt eine Möglichkeit dar, die digitale Simulation dem realen Reaktorkanal näher zu bringen, allerdings auf Kosten eines höheren numerischen Aufwands. Das Fluent 3D Modell ist in der Lage, das Reaktorverhalten für den eckigen Kanal zu berechnen und bietet somit eine

Erweiterung gegenüber den bereits beschriebenen Vorteilen des Fluent 2D Modells. Somit können die geometrischen Einflüsse der Ecken oder Inhomogenitäten über die Breite des Kanals berechnet werden. Aufgrund des erhöhten numerischen Aufwands wurde bei der Reaktorberechnung nur der Anfangsbereich des Reaktors berücksichtigt. Das Modell wurde genutzt, um den ersten Millimeter des Reaktors zu berechnen. Die entsprechenden durchschnittlichen Konzentrationen im freien Kanalvolumen sind in Abbildung 4.9 im Vergleich zu den beiden zweidimensionalen Modellen dargestellt. Das dreidimensionale Modell beschreibt den gleichen Verlauf wie das Fluent 2D Modell. Für alle Komponenten sind die Unterschiede vernachlässigbar gering. Nach einem Millimeter beträgt der Unterschied zwischen den Fluent 3D und Fluent 2D Modellen 0,1 % in der HK-Konzentration. Die geringen Unterschiede bzw. Einflüsse der Geometrie des Reaktorkanals lassen sich auf die geringe Strömungsgeschwindigkeit zurückführen ($Re \ll 1$).

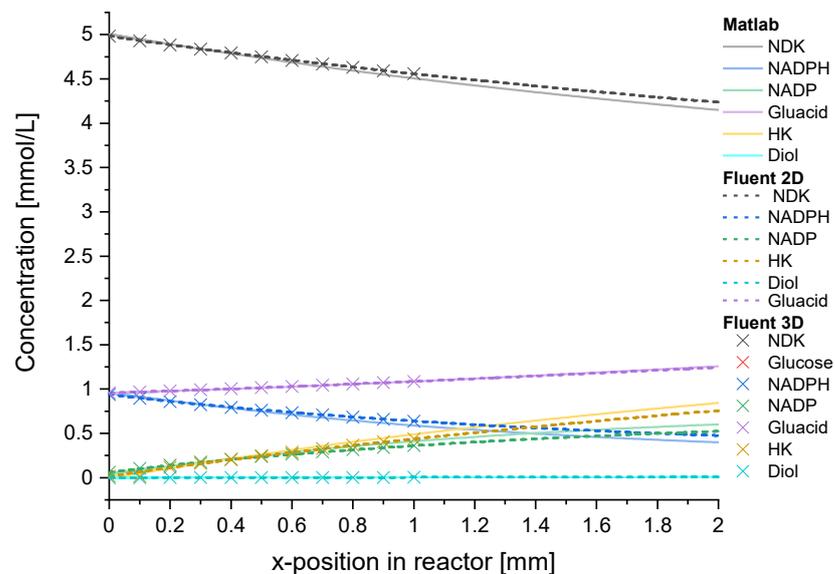
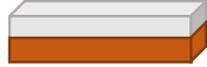


Abbildung 4.9 Verlauf der durchschnittlichen Konzentrationen im freien Kanalvolumen über die Hälfte der Reaktorlänge für die beiden zweidimensionalen Modelle aus Matlab (durchgehende Linien), Fluent 2D (gestrichelte Linien) und Fluent 3D (Kreuze).

Der Vergleich der unterschiedlichen Modelle dient neben den Untersuchungen der modellspezifischen Annahmen auch zur Ermittlung des Anwendungsgebietes der entsprechenden Modelle. Der Anwendungsbereich ergibt sich sowohl aus der numerischen Effizienz als auch aus der physikalischen Genauigkeit der untersuchten Modelle. Ein Überblick über die berechneten Reaktorfälle, deren Gittergröße und Rechen-dauer mit den entsprechenden Abweichungen zum komplexesten Modell (Fluent 3D) sind in Tabelle 4.17 gegeben.

Tabelle 4.5 Überblick über den numerischen Aufwand und die Genauigkeit der drei untersuchten Modelle. Dargestellt sind die untersuchten Längen, Anzahl der Gitterzellen, Rechenzeit und Abweichung vom Fluent 3D Modell nach 1 mm.

	Pseudo-2D	Fluent 2D	Fluent 3D
			
Länge	50 mm (100 %)	25 mm (50 %)	1 mm (2 %)
Anzahl der Zellen	35000	3 Millionen	8 Millionen
Berechnungszeit	4 min	7 Tage	7 Tage
Abweichung nach 1 mm	± 3.5 %	± 0.1 %	Vergleichswert

Wie schon erwähnt erhöht sich die Anzahl der Zellen des Rechengitters und damit die Rechenzeit der untersuchten Fälle. So wurden innerhalb einer Woche mit dem Fluent 2D-Modell die Hälfte des Reaktors und mit dem Fluent 3D-Modell 1 mm berechnet. Aufgrund der geringen Strömungsgeschwindigkeiten und der Symmetrie des Reaktorkanals können die Einflüsse der Geometrie vernachlässigt werden. Die Anwendung des Fluent 3D Modells ist für einen strömungstechnisch komplexeren Reaktor oder ein komplexeres System mit höheren Strömungsgeschwindigkeiten von Vorteil. Aufgrund des großen numerischen Aufwands ist das Fluent 3D-Modell für den in dieser Arbeit untersuchten Reaktor nicht vertretbar. Die Berechnungszeiten der beiden Fluent Modelle sind sehr hoch, da transiente Berechnungen zur Ermittlung des stationären Zustands genutzt wurden. Die Verwendung der stationären Berechnungsmethode mit Fluent war aufgrund der erwähnten Instabilitäten nicht möglich. Die aufwändigere und langsamere transiente Methode reduziert den Anwendungsbereich dieser Modelle. Dadurch kann das Fluent 2D Modell zwar eine sehr genaue Berechnung des Reaktorverhaltens erreichen, ist jedoch bezogen auf numerische Effizienz im Vergleich zum Pseudo-2D Modell unterlegen. Das Pseudo-2D Modell vereint die zweidimensionale Darstellung des Reaktors mit einer effizienten Berechnung des Reaktorverhaltens und einem vertretbaren Verlust der Genauigkeit im Vergleich zu den Fluent Modellen. Mit einer Berechnungszeit von vier Minuten für den gesamten Reaktor eignet sich das Pseudo-2D Modell für einen Optimierungsprozess des untersuchten Reaktorsystems.

Bei der Berechnung strömungstechnisch anspruchsvollerer Fälle, beispielsweise mit einer gezielten Umwälzung der Strömung mit Leitelementen, stößt das Pseudo-2D Modell an seine Grenzen. Hier lohnt sich der rechentechnische Mehraufwand der Fluent Modelle.

4.8 Zusammenfassung

Die Modellierung eines biochemischen Reaktors mit überströmter, poröser Schicht, bietet eine Möglichkeit, das Reaktorverhalten für verschiedene Fälle theoretisch zu untersuchen. Basierend auf physikalischen Prozessen und deren mathematischer Beschreibung wurden drei unterschiedliche Modelle (pseudo 2D, 2D Fluent und 3D Fluent) erarbeitet. Das grundlegende Pseudo-2D Modell wurde in Matlab implementiert und beschreibt den Reaktor durch die serielle Berechnung einzelner Reaktorsegmente. Dieses Modell wurde für die Bestimmung von Parameterschätzwerte der Reaktion für im Reaktor immobilisierte Gre2-HOB genutzt. Das Reaktorverhalten für unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten und die reduzierte Schichtdicke wurde mit bereitgestellten experimentellen Daten (IBG-1) validiert. Das Modell ermöglicht die Berechnung der Tendenzen durch die Änderung von Strömungsgeschwindigkeit und Schichtdicken. Die Analyse der Modellergebnisse zeigte, dass der Umsatzgrad von NDK im Reaktor aufgrund eines Mangels an Cofaktor (NADPH) in der Schicht limitiert ist. Insbesondere in den tieferen Schichten der Partikelpackung ist die Reduktion stark eingeschränkt, was das Optimierungspotential des Systems verdeutlicht.

Das Pseudo-2D Modell wurde in ein zwei- bzw. dreidimensionales Modell in ANSYS Fluent überführt, untersucht und verglichen. Der Vergleich zeigt, dass das Pseudo-2D Modell den Übergang von Stoffen zwischen dem strömenden Fluid und der porösen Schicht geringfügig überbewertet, was einen um 3,5 % erhöhten Umsatz in NDK aufweist. Eine dreidimensionale Modellierung des Reaktorkanals erhöht den numerischen Aufwand und damit die Rechenzeit. Das hat jedoch nur geringfügige Auswirkung auf die HK-Austrittskonzentration (0,1 %) im Vergleich zum 2D Fluent Modell. Die Betrachtung von Aufwand und Nutzen der unterschiedlichen Modelle ergab eine anwendungsspezifische Aufteilung der Modelle. Aufgrund der Ermittlung des stationären Zustands mit transienten Berechnungen, haben die Fluent Modelle einen großen numerischen Aufwand. Aus diesem Grund sollten diese Modelle lediglich in speziellen Fällen mit komplexen Strömungen genutzt werden.

Das Pseudo-2D Modell vereint eine numerisch effiziente Berechnung des gesamten Reaktors mit einem wahrheitsgetreuen Reaktorverhalten. Dadurch eignet sich das Modell zur Untersuchung von Optimierungsmaßnahmen bezogen auf verbesserte Reaktorperformance, um Wettbewerbsfähigkeit im Vergleich zum Satzreaktor zu erreichen.

5 Systemoptimierung

Die Optimierung eines Reaktorsystems erfordert ein grundlegendes und tiefes Verständnis des Systems und seines Verhaltens. Mittels computergestützter Methoden sind Optimierungen komplexer Systeme durch rechenintensive Methoden möglich. Im Folgenden wird die Systemoptimierung eines Mikroreaktors mit überströmten Partikelbett und immobilisierter Enzymkaskade beschrieben. Die Systemoptimierung wendet die Multi-Level-Reactor-Design (MLRD) Optimierungsmethode mit einem zusätzlichen ökonomischen Einflussfaktor an. Die Berechnungen wurden mit dem Pseudo-2D Modell durchgeführt, da dieses sich als ein Kompromiss aus numerischer Effizienz und Genauigkeit erwies (Kapitel 4.7).

Dieses Kapitel gibt eine Übersicht möglicher Optimierungsmethoden und stellt die in dieser Arbeit genutzte und adaptierte Multi-Level-Reactor-Design (MLRD) Methode vor. Nach der Abschätzung des Einflusses der Immobilisierung des Regenerationsenzym (GDH(ST)) (Kapitel 5.2) werden Einflüsse des Enzymverhältnisses, der Katalysatormasse und der Cofaktor-Konzentration im Feed (Kapitel 5.3.2) ermittelt. Effekte der einzelnen Optimierungsparameter auf Ausbeute und Produktivität des Zwischenprodukts der Reduktion (HK) und die letztlichen Reaktordesigns werden dargestellt und diskutiert.

5.1 Optimierungsmethode

Die Optimierung von Systemen ist eine zentrale Aufgabe in der Verfahrenstechnik, wodurch Prozesse möglichst effizient und nachhaltig gestaltet werden können. Hierfür können verschiedene Optimierungsmethoden genutzt werden, die Daten und Informationen aus Berechnungen bzw. Experimenten nutzen. Für alle Optimierungsmethoden bedarf es neben der Definition von Parametern und deren möglichen Wertebereichen auch die Formulierung einer Zielfunktion oder -größe, die es zu optimieren gilt (Minimum oder Maximum). In der Literatur sind zahlreiche Optimierungsmethoden mit entsprechendem Anwendungsgebiet dokumentiert (Hoffmann und Hofmann 1971). Die einfachste und schnellste Methode ist die lineare Optimierung, die eine lineare Änderung der Zielfunktion zwischen zwei Datenpunkten approximiert. Die Anwendung dieser Optimierungsmethode ist jedoch in der Praxis oft nicht sinnvoll, da Probleme meistens komplexer sind und mehrere lokale Optima aufweisen. Für diese Fälle werden nichtlineare Optimierungsmethoden genutzt. Diese werden in heuristische Methoden und Gradientenmethoden unterteilt. Die Wahl der Methode ist abhängig von der Anzahl der Parameter, der Zielfunktion, dem Aufwand der Auswertung und den zur Verfügung stehenden Rechenressourcen (Meywerk 2007, S. 265–307). Um das Verhalten von einfachen Systemen zu analysieren und zu optimieren, bedarf es meistens keines großen Fachwissens. Steigert sich jedoch die Komplexität und somit auch die Anzahl der einflussreichen Parameter, wird die Anwendung der Optimierungsmethode herausfordernd. Um eine umfangreiche, robuste Optimierung durchzuführen, sollte ein Grundverständnis für die chemischen und physikalischen

Prozesse im System und deren beeinflussende Parameter vorhanden sein. Erst mit diesem tiefgreifenden Wissen lassen sich einflussreiche Parameter und eine sinnvolle Zielfunktion definieren. Mit Hilfe der Optimierungsmethode wird anschließend die Gewichtung der Parameter bzw. der internen Prozesse ermittelt und genutzt, um die Zielfunktion zu optimieren.

Eine der am meisten genutzten Optimierungsmethoden ist die Design-of-Experiments (DoE) Methode, da sie mit systematisch gewählten Versuchspunkten effizient Informationen über das Verhalten des Systems berechnet (Brown et al. 2018; Finnigan et al. 2020). Die DoE Methode variiert einzelne Parameter und berechnet die Sensibilität der Parameter in Bezug auf das Verhalten des Systems. Zusätzlich werden Einflüsse und Effekte, die durch mehrere Parameter induziert werden, dargestellt. Mit dieser Optimierungsmethode können somit einflussreiche Parameter herausgearbeitet und optimiert werden.

Einen anderen Optimierungsansatz verfolgen Freund und Sundmacher (Freund und Sundmacher 2008) mit sogenannten elementaren Prozessfunktionen (EPF; engl.: *elementary process functions*). Die EPFs basieren auf grundlegenden, chemischen und physikalischen Prozessen, die im Modell als unterschiedliche, unabhängige Module bezeichnet werden. Im Optimierungsprozess werden diese Module, also die grundlegenden Prozesse untersucht. Im Vergleich zur DoE kann somit eine Optimierung des Reaktorsystems erreicht werden, die sich an physikalischen bzw. chemischen Prozessen orientiert. Diese Methode wurde erfolgreich für verschiedene Systeme angewandt: Maximierung des Reaktorleistung in Berücksichtigung von Katalysatordeaktivierung durch Anpassung der Temperatur (Xie und Freund 2018); Auswahl aus drei Ausgangsstoffen zur Synthese von Maleinsäureanhydrid mit Optimierung der Reaktorleistung durch Anpassung der Reaktortemperatur (Maußner et al. 2019); Optimierung der Reaktorleistung einer Methanolsynthese durch Anpassung der Reaktorbedingungen und Katalysatorpartikel (Kaiser und Freund 2019). Basierend auf der Methode von Freund und Sundmacher (Freund und Sundmacher 2008) wurde die Multi-Level-Reactor-Design Methode (MLRD) erarbeitet (Freund et al. 2011).

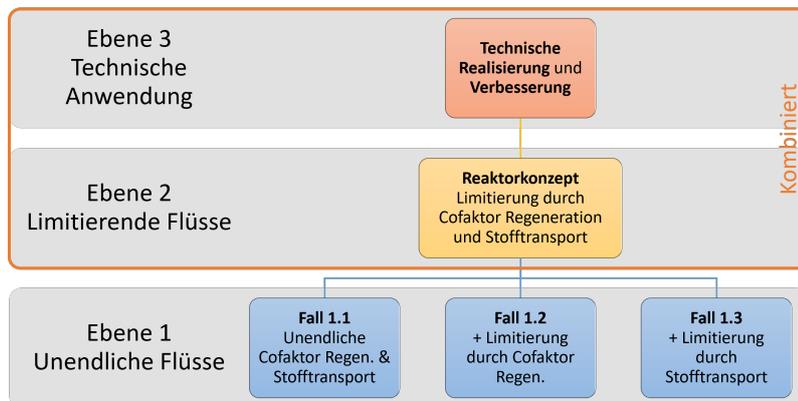


Abbildung 5.1 MLRD Ebenen nach Freund et al. (Kaiser und Freund 2019) und die spezifischen Anpassungen für das in dieser Arbeit untersuchte Enzymkaskade mit Cofaktor-Regeneration und Stofftransportlimitierung.

Die MLRD teilt die Optimierung in drei Ebenen auf (vgl. Abbildung 5.1): Ebene 1: Optimale Reaktionsbedingungen; Ebene 2: Optimale Reaktorbedingungen und Ebene 3: Reale Bedingungen im technischen Reaktor. Die MLRD-Methode wurde auf verschiedene chemische Reaktionssysteme angewandt. Beispielsweise für die Methanolsynthese (Kaiser und Freund 2019), die Ethylenoxidsynthese (Peschel et al. 2012) und die pharmazeutische Herstellung von *Pichia pastoris* (Emenike et al. 2018). Die Methodik der EPFs und MLRD zeigt großes Potential vor allem in der computergestützten Reaktoroptimierung basierend auf chemischen und physikalischen Phänomenen.

Die Anwendung der MLRD-Methode auf das in dieser Arbeit untersuchte Reaktions- und Reaktorsystem bedarf einer Adaptierung der Methode. In der ersten Ebene werden keine Limitierungen durch Wärme- und Stofftransport berücksichtigt, wodurch Katalysatoren bzw. Reaktionen unter optimalen Bedingungen ablaufen können. Da in realen Systemen diese Bedingungen nie zu finden sind, können die in dieser Ebene berechneten Optima nur theoretisch erreicht werden. Das Reaktionssystem, beschrieben in Kapitel 2.1 kann in zwei elementare Reaktionen aufgeteilt werden, die Reduktionen und die Cofaktor-Regeneration. Ein weiterer wichtiger, elementarer Prozess ist der Stofftransport, der zu Limitierungen im Reaktorsystem führen kann. Somit kann die erste Ebene in drei unterschiedliche Fälle unterteilt werden, in denen der Einfluss der Cofaktor-Regenerierung und des Stofftransports auf die Reduktion untersucht werden:

Fall 1.1 Unbegrenzte Cofaktor-Regenerierung und Stofftransport

Fall 1.2 Unbegrenzte Cofaktor-Regenerierung (Stofftransport Limitierung)

Fall 1.3 Unbegrenzter Stofftransport (Cofaktor-Regeneration Limitierung)

In der zweiten Ebene werden Transportprozesse mitberücksichtigt, wodurch Flüsse bzw. Flussverhältnisse optimiert werden. Diese beinhalten die geometrische Form und Größe von Bestandteilen des Reaktors. Dadurch werden Reaktordesigns mit bestmöglichem Verhältnis zwischen Reaktionsgeschwindigkeit(en) und Reaktionsvolumen identifiziert. In dieser Ebene werden optimierte Parameter mit kompletter Limitierung aller Prozesse und damit die besten Bedingungen bezüglich der Zielfunktion ermittelt.

In der dritten Ebene werden technische Lösungen des Reaktoroptimums bestimmt. Das endgültige Design stellt eine Abwägung aus optimalen Reaktions-, Reaktorbedingungen und technischer Umsetzbarkeit des untersuchten Systems dar.

Die Optimierung wurde mit dem Pseudo-2D Modell in Matlab durchgeführt. Das Modell berechnet einen realen, technisch umsetzbaren Reaktor, wodurch die zweite und dritte Ebene kombiniert werden können. Die in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung bezieht sich auf den Reaktor ohne zusätzliche Up- und Downstream-Prozesse, die in der Regel weitere Einflüsse auf die Reaktorleistung haben.

5.1.1 Optimierungsparameter

Die Optimierung des Reaktorsystems kann für unterschiedliche Parameter durchgeführt werden. Die Definition von signifikanten Parametern eines Systems kann anhand des bekannten Reaktorverhaltens abgeleitet werden und basiert in dieser Arbeit auf den ersten Erkenntnissen aus Kapitel 4.5. Wie dort dargestellt, ist die NADPH Regeneration wichtig zur Aufrechterhaltung der Reduktion. Im Partikelbett kommt es zu einem NADPH Mangel, der zur Limitierung der Reduktionsreaktionen führt. Um den NADPH Bedarf der Reduktionsreaktionen auszugleichen, können unterschiedliche Prozesse angepasst werden: i) Erhöhung des Stofftransports (z.B. Verringerung der Diffusionswege) oder ii) Verstärkung der NADPH Regenerationsreaktion. Die mit diesen Prozessen in Verbindung gebrachten Parameter können weiterhin in Reaktor- und Flussparameter aufgeteilt werden (Abbildung 5.2). Die Reaktorparameter bezeichnen geometrische oder objektbezogene Parameter. Neben der Betthöhe (proportional zur Partikelmasse) ist im Falle einer GDH-Immobilisierung auf separaten Partikeln das Enzymverhältnis bzw. das Partikelverhältnis von Gre2 (m_{Gre2}) und GDH (m_{GDH}) interessant (vgl. Abbildung 5.2, hellgrau). Die Flussparameter beziehen sich auf die Feed-Konzentrationen. Der hohe NADPH-Bedarf kann auch mit erhöhter NADP+ Feed-Konzentration reguliert werden. Da NADPH dreimal so teuer wie NADP+ ist (Sigma Aldrich 2020b, 2020c) und im Reaktorsystem ein NADPH-Regenerationsenzym GDH genutzt wird, wird in der Optimierung die NADP+-Konzentration im Feed als Parameter betrachtet.

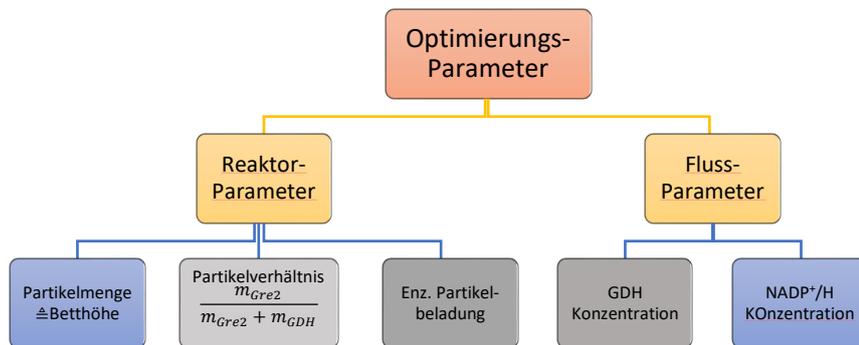


Abbildung 5.2 Optimierungsparameter, die in der Systemoptimierung berücksichtigt werden. Parameter, die spezifisch für immobilisierte GDH sind, sind in Hellgrau gekennzeichnet und diejenigen für gelöste GDH in Dunkelgrau.

5.1.2 Randbedingungen

Das Verhalten eines Reaktorsystems ist abhängig von unterschiedlichsten Faktoren. Damit die Effekte der verschiedenen Parameter herausgearbeitet werden können, wurden Randbedingungen definiert, die sich an experimentell umsetzbaren Bedingungen orientieren (Burgahn et al. 2020; Peschke et al. 2018). In den Berechnungen wurde das Reaktorverhalten für einen kommerziell erhältlichen PMMA-Chip (Kapitel 3.1) berechnet. Die untersuchten Fälle wurden für eine maximale Ausbeute des Intermediats (HK) ausgelegt. Um eine maximale HK-Ausbeute zu erreichen, wurde der Volumenstrom \dot{V}' und damit die Verweilzeit τ' angepasst. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten Fällen zu gewährleisten, wurde die NDK-Konzentration (10 mM) und die Glukose-Konzentration (100 mM) im Feed konstant gehalten. In allen Berechnungen wurde eine konstante Temperatur von 30 °C und ein pH-Wert von 7,6 angenommen.

Die in Flusseperimenten bestimmten kinetischen Parameterschätzwerte (Kapitel 4.4.2) wurden für die Optimierungen genutzt. Der Aktivitätsverlust der GDH durch deren Immobilisierung ist nach Experimenten von Peschke et al. vernachlässigbar (Peschke et al. 2017a). Deswegen wurde angenommen, dass die kinetischen Parameter für freie und immobilisierte GDH identisch sind. Eine Katalysatordeaktivierung wurden in der Optimierung nicht untersucht.

Das Katalysatorbett wurde als quasihomogen mit einer konstanten Höhe angenommen. Die Bettdicke ist abhängig von der in den Kanal eingefüllten Partikelmenge. Für den Standardfall ergeben 4,5 mg MBs eine Bettdicke von 88 μm . Um die Betthöhe zu verändern, muss das Magnetfeld entsprechend verstärkt bzw. geschwächt werden. Die experimentelle Umsetzung eines exakt eingestellten Magnetfeldes stellt neue Herausforderungen an das Reaktorsetup. Das ist mit dem in dieser Arbeit verwendeten Setup nicht

umsetzbar. Für die Optimierung wurde angenommen, dass das Magnetfeld so angepasst werden kann, dass die eingesetzte Partikelmenge sich über eine Länge von 50 mm homogen verteilt. Aufgrund der unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden (Kapitel 2.2) können Gre2 und GDH nicht co-immobilisiert werden, weshalb sich die gesamte Partikelmenge sowohl aus mit Gre2 und GDH beladenen Partikeln zusammensetzt ($m_{total} = m_{Gre2} + m_{GDH}$). Beim Einsatz von immobilisierter GDH reduziert sich somit bei gleicher Betthöhe die Gre2-Menge im Reaktor. Für beide Immobilisierungen wurde die Annahme getroffen, dass eine maximale Enzymbeladung vorliegt (Gre2-HOB: 24 pmol/mg ; GDH(ST): 55 pmol/mg). Die genaue Bestimmung der Enzymbeladung ist im Anhang A14 beschrieben.

5.1.3 Ökonomisches Modell

Die Performance eines Bioreaktors unterliegt unterschiedlichen Anforderungen. Neben einer hohen Ausbeute und maximaler Produktivität sind die anfallenden Kosten ein wichtiger Faktor in der Realisierung eines Reaktorkonzepts. Aus diesem Grund wurde ein ökonomisches Modell zur Bewertung des Reaktorkonzepts erarbeitet.

Die ökonomische Performance eines biokatalytischen Prozesses wird durch Kapitalkosten (CapEx; engl.: *capital expenditure*) und Betriebskosten (OpEx; engl.: *operating expenditure*) definiert (Tufvesson et al. 2010). CapEx beziehen sich auf die Kosten für Apparaturen, Pumpen, Analytik, etc. Da eine komplette ökonomische Betrachtung aufwendig ist und oft essenzielle Daten fehlen, wurde in dieser Arbeit ein stark vereinfachtes Modell entwickelt, das sich auf die grundsätzlichen Materialkosten beschränkt. In dieser Methode zur Parameteroptimierung werden lediglich die wiederverwendbaren Materialien berücksichtigt. Die Investitionen wie Pumpen, der PMMA-Reaktorchip etc. sind für alle untersuchten Systeme gleich, weshalb diese im Kostenmodell nicht berücksichtigt werden. Das Kostenmodell bezieht sich somit auf die austauschbaren, wiederverwendbaren oder laufenden Produktionsmaterialien wie die Komponenten im Feed und den magnetischen Partikeln mit immobilisierten Enzymen. Somit berechnet sich der CapEx mit der eingesetzten Menge an magnetischen Partikeln. Durch die Wiederverwendbarkeit der Partikel werden diese den Fixkosten zugerechnet. Die Modifizierung der Enzyme, die eine Immobilisierung ermöglicht, erhöht die Herstellungskosten der Enzyme um 90% (Tufvesson et al. 2010). Darin sind Kosten für das Verfahren, die Ausrüstung und die Personenstunden, jedoch nicht die Träger enthalten (Tufvesson et al. 2010). Die beiden Enzyme Gre2-HOB (Streptavidin-Partikel) und GDH(ST) (Epoxy-Partikel) werden auf unterschiedlichen Trägerpartikel immobilisiert, wodurch sich die Kosten hier unterscheiden. Für Gre2-HOB werden Streptavidin-Partikel und für GDH(ST) Epoxy-Partikel verwendet. Die Kosten der Streptavidin-Partikel sind in etwa 5 Mal so hoch wie die für Epoxy-Partikel (Thermo Fischer 2020). Die CapEx lassen sich somit nach der Gleichung 5.1 mit der Masse m der entsprechenden Partikel, der Stoffmenge der Enzyme N , deren Molmasse \tilde{M} und den Preisen aus Tabelle 5.1 berechnen.

$$CapEx = m_{Gre2}price_{MB, Gre} + m_{GDH}price_{MB, GDH} + N_{Gre2}\tilde{M}_{Gre2}price_{Gre2, imm} + N_{GDH}\tilde{M}_{GDH}price_{GDH, imm} \quad 5.1$$

Tabelle 5.1 CapEx für die unterschiedlichen Materialien im Reaktor in €/g.

Material	Price [€/g]
Dynabeads M280 (Gre2-MB)	19.000 ^a
Dynabeads M270 (GDH-MB)	4.760 ^a
Gre2-HOB (imm.)	1.832.000 ^b
GDH(ST) (imm.)	1.900 ^c

a: vom Hersteller bereitgestellt (Thermo Fischer 2020)

b: Nicht modifizierte Gre2 nach MyBioSource (MyBioSource 2021), kombiniert mit zusätzlichen Kosten für die Immobilisierung nach Tufvesson et. al. (Tufvesson et al. 2010)

c: Nicht modifizierte GDH nach Innosyn (Innosyn 2020), kombiniert mit zusätzlichen Kosten für die Immobilisierung nach Tufvesson et. al. (Tufvesson et al. 2010)

Die Betriebskosten (OpEx) umfassen die kontinuierlichen Kosten in € pro Zeiteinheit. Das beinhaltet neben den kontinuierlichen Materialkosten auch den Energiebedarf, Instandhaltungs-, Reinigungs- und Personalkosten. Unter der Annahme, dass in allen Fällen die Betriebskosten für Ausrüstung gleich sind, werden in der Ermittlung der OpEx nach Gleichung 5.2 die Feed-Konzentrationen, die Molmasse \tilde{M} , der Materialpreis und der adaptierte Volumenstrom \dot{V}' in € pro Sekunde berücksichtigt. Die Preise der Materialien sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Die Kosten stellen sich hauptsächlich aus NADPH bzw. NADP+ und dem möglichen, gelösten Enzym GDH(ST) zusammen. Die restlichen Komponenten haben aufgrund ihrer Kosten einen vernachlässigbaren Einfluss.

Tabelle 5.2 OpEx der Feed-Komponenten in €/g.

Material	Price [€/g]
GDH (aq.)	1.000 ^b
NADP+	434 ^a
NADPH	1.330 ^a

a: Bereitgestellt von Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich 2020a, 2020b, 2020c)

b: Bereitgestellt von Innosyn (Innosyn 2020)

Aus CapEx und OpEx lassen sich somit die Produktkosten für das gewollte Produkt, das Intermediat (HK) nach Gleichung 5.3 in €/g berechnen. Die OpEx werden auf eine Betriebszeit von einer Woche bezogen. Zusammen mit den CapEx ergeben sich die Gesamtkosten, mit denen sich die Produktkosten berechnen lassen. Dabei werden die Gesamtkosten auf die austretende Produktmasse in einer Woche bezogen.

$$OpEx = \sum_{i=1}^{Nr. of species} c_{feed, i} \cdot \tilde{M}_i \cdot price_i \cdot \dot{V}' \quad 5.2$$

$$product cost = \frac{(CapEx + OpEx \cdot OT)}{\dot{V}' \cdot c_p \cdot \tilde{M}_p \cdot OT} \quad 5.3$$

5.1.4 Techno-Ökonomische Leistung

Zur Optimierung des Reaktorsystems werden die Reaktorkenngrößen (Kapitel 4.3) mit dem ökonomischen Modell (Kapitel 5.1.3) zu einem allgemeinen Maß für die techno-ökonomische Leistung (TEP; engl.: *Techno-Economic Performance*) zusammengefasst. Die TEP vereint die Raumzeitausbeute (STY), die biokatalytische Produktivität ($Prod_{cat}$) und die Produktkosten (vgl. Gl. 5.4). Die Werte beziehen sich alle auf Reaktorberechnungen für maximale HK-Ausbeute und die entsprechende Verweilzeit τ' . Die TEP bezieht sich auf die TEP des Standardfalls (TEP_{ref}) aus Kapitel 4.4.2. (aq. GDH; 4,5 mg MBs; 0,5mM NADP+). In der Optimierung wird die TEP für die in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Parameter maximiert.

$$TEP = \frac{STY \cdot prod_{cat}}{product\ cost} \cdot \frac{1}{TEP_{ref}} \quad 5.4$$

5.2 Immobilisierung Cofaktor-Regeneration

In einem ersten Schritt wird die Immobilisierung von GDH(ST) und deren Effekt auf die Reaktorcharakteristiken und letztlich die TEP untersucht. Es wurde das Reaktorverhalten eines komplett beladenen Kanals mit 4,5 mg magnetischen Partikeln, das einer Bettstärke von 88 μm entspricht, untersucht. Der Fall mit gelöstem GDH(ST) entspricht dem Standardfall aus Kapitel 4.4.2, da dieser experimentell leicht umzusetzen ist. Neben identischen Feed-Konzentrationen der reagierenden Spezies weisen die beiden Fälle unterschiedliche Vor- und Nachteile auf: Der Standardfall ermöglicht ein Vorinkubieren der einströmenden Substratlösung, wodurch am Anfang der Überströmung des Bettes bereits NADPH vorhanden ist. Weiterhin wird im gesamten Reaktor NADPH regeneriert. Da die Lösung nach dem Reaktordurchlauf verworfen wird und das GDH(ST) damit verloren ist, erhöhen sich die Betriebskosten signifikant. Die Immobilisierung der GDH(ST) ermöglicht eine volumenbezogene, hohe quasihomogene Konzentration im Partikelbett für immobilisierte GDH(ST) (15-mal so groß wie bei gelöster GDH(ST)). Durch die Immobilisierung verliert das System die NADPH-Regeneration im freien, strömenden Kanalvolumen. Dadurch ist keine Vorinkubierung des Substratstroms möglich. Somit muss NADPH für eine Reduktion des NDKs zuerst im Bett regeneriert werden. Die Partikeln mit immobilisierter GDH(ST) ersetzen einen Teil der Gre2-HOB Partikel, wodurch weniger Gre2-HOB im Reaktor ist.

Um den Effekt der Immobilisierung herauszuarbeiten, wurden die Reaktorbedingungen so angepasst, dass sich für beide Fälle die gleiche Raum-Zeit-Ausbeute (engl.: space-time-yield STY) ergibt. Im Falle der immobilisiertem GDH(ST) wurde das Partikelverhältnis $BR = \frac{m_{Gre2}}{m_{total}}$ angepasst. Es wurde iterativ ein Partikelverhältnis von 0,6 ermittelt. Die entsprechenden, charakteristischen Größen sind in Tabelle 5.3 aufgelistet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Immobilisierung die Produktivität verbessert, während die Kosten sinken. Damit ergibt sich eine TEP von 2,49. Die Optimierung zeigt sich auch im Enzym-Nutzungsgrad, der

einen hohen Wert von 89% annimmt. Die Reduktion der Produktkosten ist auf die Stationarität der Enzyme im Kanal zurückzuführen, was den Erkenntnissen aus der Literatur entspricht (Wang et al. 2017; Tufvesson et al. 2010). Der Fall mit gelöster GDH(ST) beschreibt den Standardfall und hat dementsprechend einer TEP von 1,0.

Tabelle 5.3 Charakteristische Größen für gelöste GDH und immobilisierte GDH mit gleicher Raumzeitausbeute. Dargestellt sind STY, Volumenstrom, Enzym-Nutzungsgrad, CapEx, OpEx, Produktkosten, Produktivität und TEP. Alle Werte beziehen sich auf eine Woche Betriebszeit.

	STY [$gL^{-1}day^{-1}$]	Flussrate \dot{V}' [$\mu Lmin^{-1}$]	Enzym Nutzungs- grad (EU) $\eta_R[-]$	CapEx [€]	OpEx [$€h^{-1}$]	Kosten [$€g^{-1}$]	Produktivität [$g(HK)g(Gre2)^{-1}$]	TEP [-]
GDH aq.	53,90	0,47	0,74	85,83	0,025	20330	155,9	1.00
GDH imm.	53,91	0,47	0,89	59,56	0,009	15091	263,5	2,49

Wie bereits in Kapitel 4.5 beschrieben, ist die NADPH-Regeneration und damit deren Konzentration im porösen Bett für den Standardfall limitierend (Abbildung 5.3A). Abbildung 5.3 zeigt die Verteilung der NADPH-Konzentration am Anfang des Reaktors sowie die hohen Eintrittskonzentrationen und den schnellen Abfall der Konzentration im Standardfall. Im Fall der immobilisierten GDH(ST) wird das NADPH dort erzeugt, wo es gebraucht bzw. verbraucht wird. Damit ist die relevante NADPH-Konzentration am Ort der Reaktion erhöht. Die Konzentration von NADPH spiegelt das dynamische Gleichgewicht zwischen der Reduktion und Regeneration wider. Bei hohen NADPH-Konzentrationen kann die Reduktion schnell ablaufen, jedoch ist die STY nicht optimal. Bei geringen NADPH-Konzentrationen sinkt die Geschwindigkeit der Reduktion und somit auch die Produktivität der Reduktion. Daher ist die Regulierung der NADPH-Konzentration ein essenzieller Faktor für die systematische Optimierung des Reaktor-Systems. Es zeigt sich, dass die Immobilisierung von GDH(ST) sowohl vorteilhaft bezüglich der Leistung als auch der Ökonomie des Reaktors ist. Im Folgenden wurde die Immobilisierung von GDH(ST) als Grundvoraussetzung für die Optimierung angesehen, weshalb der Vergleich mit freier GDH(ST) vernachlässigt wurde.

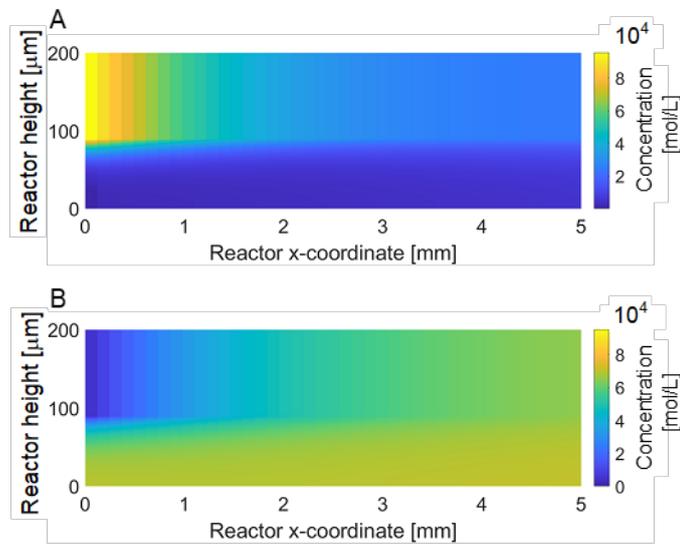


Abbildung 5.3 NADPH-Konzentration in den ersten 10% des Reaktors für aq. GDH(ST) (A) und immobilisierte GDH(ST) (B).

5.3 Systematische Optimierung

Die Optimierung des Reaktorsystems wurde mit einer adaptierten MLRD-Methode (Kapitel 5.1) in Bezug auf die Techno-Ökonomische Leistung (TEP) durchgeführt. Wie in 5.2 beschrieben, ermöglicht die Immobilisierung des Regenerationsenzym eine allgemeine Verbesserung des Systems. Deshalb wird in den folgenden Schritten ausschließlich diese behandelt.

Zunächst werden Einflüsse der Limitierung der Cofaktor (NADPH) Regeneration und des Stofftransports untersucht. In einem zweiten Schritt erfolgt die Optimierung des Reaktordesigns mit besonderem Augenmerk auf dem Einfluss folgender Parameter auf das System: Partikelverhältnis, NADP⁺-Konzentration im Feed und Partikelmenge.

In allen Untersuchungen wurden die Reaktorberechnungen mit dem Pseudo-2D Modell in Matlab durchgeführt. Die Optimierung erfolgte mit einer globalen, genetischen Optimierungsmethode zur Maximierung der TEPs (Kapitel 5.1.4) (The MathWorks, Inc. 2020).

5.3.1 Ebene 1 – Unbegrenzte Stoffstromdichten

Der erste Schritt bei der Ermittlung eines optimierten Systems beinhaltet die Untersuchung der unterschiedlichen Limitierungen und deren Auswirkungen auf das Reaktorsystem. In dieser Ebene werden

optimale Reaktionsbedingungen mit den entsprechenden Partikelverhältnissen und der optimalen Feed-Konzentration von NADP+ berechnet. Dafür werden drei unterschiedliche Fälle untersucht, in denen die limitierenden Prozesse der Cofaktor-Regeneration und des Stofftransports künstlich angepasst werden. Das Ignorieren der Regenerationslimitierung von NADPH setzt die Regenerationsgeschwindigkeitskonstante (k_{GDH}^+) auf unnatürlich große Werte. Dadurch stellen sich sofort die Gleichgewichtskonzentration von NADPH und NADP+ ein. Die maximale Konzentration ist dabei abhängig von der Feed-Konzentration von NADP+. Für den Fall ohne Stofftransportlimitierung werden die Diffusionskoeffizienten der Komponenten auf sehr hohe Werte gesetzt ($D_i = 10^6 \frac{mm^2}{s}$). Die Einflüsse der beiden limitierenden Faktoren werden in drei Fällen untersucht:

Der Fall 1.1 (unbegrenzte Cofaktor-Regeneration und unbegrenzter Stofftransport) stellt den utopischen Idealfall des Systems dar und dient als obere Grenze für die Reaktorleistung bzw. untere Grenze der Produktkosten.

Der Fall 1.2 (unbegrenzter Stofftransport) beschreibt als einzige Limitierung die Cofaktor-Regeneration und wird für die Bestimmung der optimalen NADP+-Feed-Konzentration genutzt. Die Vernachlässigung des Stofftransportwiderstands führt zu Reaktorelementen ohne Gradienten (orthogonal zur Strömungsrichtung), also zu einer idealen Durchmischung.

Im Fall 1.3 (unbegrenzte Cofaktor-Regeneration) wird die Abhängigkeit des Enzymverhältnisses bzw. des Partikelverhältnisses BR dargestellt. Bei einer optimalen Cofaktor-Regeneration wird hierbei das optimale Enzymverhältnis bestimmt.

Für die Fälle 1.2 und 1.3 wird mit Hilfe eines genetischen Algorithmus für Partikelmengen zwischen 0,45 mg bis 4,5 mg die Zielgröße die TEP maximiert. Dabei ergibt sich eine ideale NADP+-Feed-Konzentration von 8,4 mM und einem Partikelverhältnis von $0,743 \frac{m_{Gre2}}{m_{total}}$. Mit diesen Parametern wird das Reaktorverhalten für Fall 1.1 für die Partikelmengen von 0,45 mg bis 4,5 mg berechnet.

Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Fälle sind in Abbildung 5.4 für den enzymatischen Wirkungsgrad (EU) η_R (A), STY im Vergleich zur Produktivität (B), Produktkosten (C) und TEP (D) dargestellt. Der Wirkungsgrad (Abbildung 5.4 A) ist für die Fälle 1.1 und 1.2 konstant auf dem Wert 1, während für Fall 1.3 (Berücksichtigung des Stofftransports) mit höherer Partikelmenge der Wirkungsgrad sinkt. Im STY-Produktivitäts-Graph (Abbildung 5.4 B) bleibt die Produktivität für Fall 1.1 und 1.2 konstant mit steigender STY bei erhöhter Partikelmenge. Dabei werden bei Fall 1.1 höhere Werte für die Produktivität und die STY erreicht, da in diesem Fall zusätzlich überall eine maximale Cofaktor-Konzentration vorliegt. Fall 1.3 nähert sich mit sinkender Partikelmenge der Produktivität und STY wie bei Fall 1.1 an. Die Produktkosten (Abbildung 5.4 C) sind für Fall 1.1 und 1.2 konstant mit höheren Produktkosten für Fall 1.2. Fall 1.3 hat

wiederum vergleichbare Produktkosten wie Fall 1.1 bei geringeren Partikelmengen. Mit steigender Partikelmenge steigen auch die Produktionskosten für Fall 1.3. letztlich zeigt Abbildung 5.4 D wie sich die TEP für die Fälle verhält und kombiniert die drei vorherigen Graphen A-C. Die TEP hat für alle Fälle vergleichbare Werte bei geringerer Partikelmenge, mit dem geringsten Wert für Fall 1.2. Die TEP für die Fälle 1.1 und 1.2 steigt mit erhöhter Partikelmenge an, mit höheren Werten für Fall 1.1. Für Fall 1.3 steigt die TEP ebenfalls, durchläuft jedoch einer maximalen TEP bei knapp 3 mg MB und einer TEP von 15. In den Graphen B-D in Abbildung 5.4 ist weiterhin ein Schnittpunkt von Fall 1.2 und Fall 1.3 zu vermerken, was auf ein mögliches Optimum hinweist.

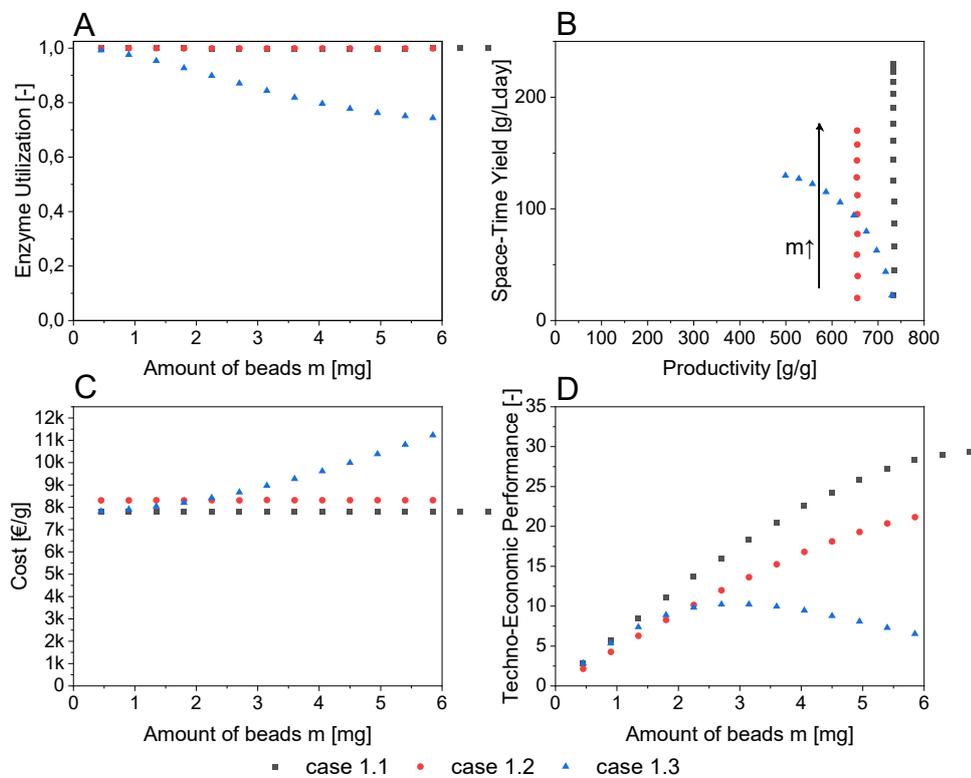


Abbildung 5.4 Ergebnisse der ersten Ebene der MLRD-Methode für Fall 1.1 (schwarze Vierecke, unbegrenzte Cofaktor-Regeneration und Stofftransport), Fall 1.2 (rote Kreise, mit Cofaktor-Regenerationslimitierung) und Fall 1.3 (blaue Dreiecke, mit Stofftransportlimitierung) für unterschiedliche Partikelmengen. A: Enzymatischer Wirkungsgrad (EU) η_R . Die Cofaktor-Regenerationslimitierung hemmt die Reduktion im Partikelbett, wodurch der Wirkungsgrad sinkt; B: STY und Produktivität. Mit steigender Partikelmasse steigt STY, für Fall 1.1 und 1.2 bei konstanter Produktivität. Fall 1.2 hat eine geringere Produktivität aufgrund von Stofftransporthemmung. Durch geringeren Wirkungsgrad sinkt die Produktivität und STY. Bei geringer Partikelmassen nähert sich Fall 1.3 den Werten von Fall 1.1 an.; C: Produktkosten. Die Produktionskosten für Fall 1.1 und 2.2 sind konstant für verschiedene Partikelmasse, mit höheren Kosten für 1.2. Durch eine Verringerung des Wirkungsgrads sinkt der Umsatz und somit steigen die Kosten für Fall 1.3. D: Techno-ökonomische Leistung (TEP). Die Kombination aus den Verläufen und Beobachtungen aus A, B und C führt zu TEP-Verläufen, die bei Fall 1.1 und 1.2 steigende und leicht abflachende Werte beschreiben. Für Fall 1.3 wird ein Maximum von 10 bei einer Partikelladung von 2,75 mg erreicht.

Das Verhalten des enzymatischen Wirkungsgrads ist für die Fälle mit unbegrenztem Stofftransport (Fall 1.1 und 1.2) ideal, d.h. $\eta_R = 1$, da keine Konzentrationsgradienten in der Schicht vorhanden sind. Dementsprechend hat die Partikelmenge (Partikelschichtdicke) im Reaktor keinen Einfluss auf Produktivität bzw. Produktkosten und somit steigt die TEP mit erhöhter Partikelmenge.

Die Cofaktor-Regeneration limitiert die zur Verfügung stehende Cofaktor Konzentration, sodass die Produktivität sich verringert. Aus diesem Grund erhöhen sich die Produktkosten und dies erklärt weiterhin die reduzierte TEP für Fall 1.2.

Im Fall 1.3 wirkt der Stofftransport limitierend. Mit erhöhter Partikelmenge und höherem Partikelbett steigt der Einfluss des Stofftransports, da die Diffusionswege zunehmen. Mit sinkender Partikelmenge (Partikelbetthöhe) konvergieren alle Werte in Abbildung 5.4 zum Idealfall (Fall 1.1).

In Abbildung 5.4 B, C und D schneiden sich die Kurven von Fall 1.2 und Fall 1.3 bei einer Partikelmenge von ungefähr 2 mg. Bei dieser Menge sind die limitierenden Effekte der Cofaktor-Regeneration und des Stofftransports gleich. Bei erhöhter Partikelmenge dominiert die Stofftransportlimitierung und bei geringerer Menge die Cofaktor-Regeneration.

5.3.2 Ebene 2 und 3 – (Technisches) Reaktorkonzept

Im nächsten Schritt werden die Ergebnisse aus der ersten Ebene (Kapitel 5.3.1) genutzt, um Reaktorkonzepte mit optimalen Reaktorbedingungen für unterschiedliche MB-Mengen (Partikelschichtdicken) unter Berücksichtigung von Cofaktor-Regenerations- und Stofftransportlimitierung zu ermitteln. Hierzu wurde ein genetischer Algorithmus verwendet. Die TEP, beschrieben in Kapitel 5.1.4, wurde als Zielgröße definiert und durch die Anpassung von Partikelverhältnis und der NADP+-Feed-Konzentration maximiert. Als Referenz für die TEP gilt der Standardfall mit gelöster GDH(ST). Zu den in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Randbedingungen wurde das Partikelverhältnis BR zwischen 0 und 1 bzw. die NADP+-Konzentration im Feed zwischen 0 und 20 mM variiert. Als Startpunkt wurde die STY für immobilisierte GDH(ST) (Kapitel 5.2) gewählt.

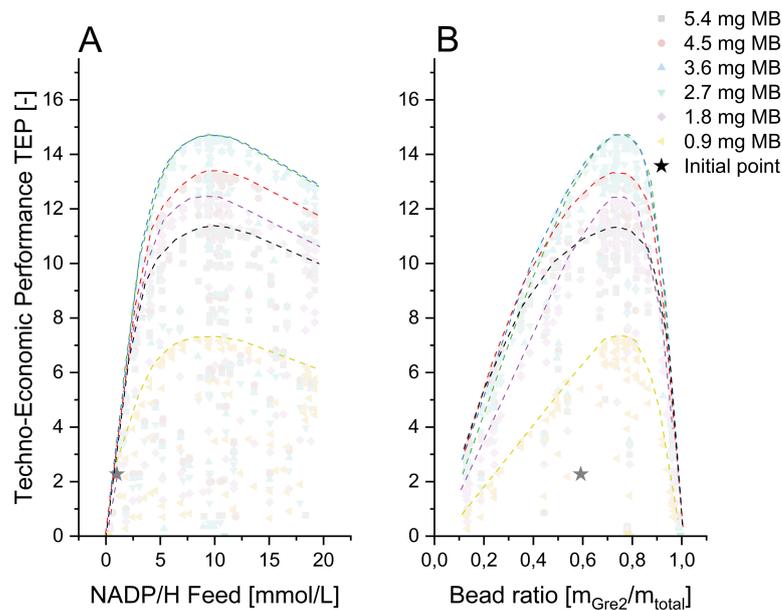


Abbildung 5.5 Ergebnisse des genetischen Algorithmus für A: NADP⁺-Konzentration im Feed und B: Partikelverhältnis BR für Partikelmengen von 0,9 bis 5,4 mg. Eine Kurve für die maximalen TEP-Werte wurde für die Partikelmenge hinzugefügt. Als Stern ist der Startpunkt gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der untersuchten Parameterkombinationen sind in Abbildung 5.5 bis Abbildung 5.7 dargestellt. In Abbildung 5.5 werden die optimalen Parameter (A: NADP⁺-Feed-Konzentration; B: Partikelverhältnis) für unterschiedliche Partikelmengen gezeigt. Für jede Partikelmenge wurde eine farbliche, gestrichelte, maximale Begrenzungslinie eingefügt, um die Trends und die Maxima zu verdeutlichen. In Abbildung 5.5 A steigen die Kurven linear und durchlaufen ein Maximum für TEP bei einer NADP⁺-Feed-Konzentration von 10 mM und sinken anschließend wieder linear mit geringer Steigung. Im steigenden Anfangsbereich kompensiert eine verbesserte Produktivität die Erhöhung der Kosten durch die erhöhte NADP⁺-Konzentration. Nach dem Maximum sinkt die TEP, weil der höhere NADP⁺-Preis nicht mehr durch die erhöhte Ausbeute von HK ausgeglichen werden kann. Die TEP durchläuft ebenfalls ein vom Partikelverhältnis unabhängiges Maximum bei einem Wert von $0,74 \frac{m_{Gre2}}{m_{total}}$. Das höchste Maximum der TEP wird für Partikelmengen zwischen 2,7 und 3,6 mg mit einem TEP von 15 erreicht. Für geringere Partikelverhältnisse gibt es eine Überproduktion an Cofaktor, der nicht schnell genug von der Reduktion verbraucht wird, wodurch die Leistung des Reaktors sinkt. Das umgekehrte Verhalten liegt bei höheren Partikelverhältnissen vor.

Die bestimmten, optimalen Werte für das Partikelverhältnis unterscheiden sich von den Werten der ersten Ebene aus Kapitel 5.3.1. Das Optimum des Partikelverhältnisses ist nahezu identisch, jedoch ist die optimale NADP⁺-Feed-Konzentration erhöht. Im realen Reaktor wirkt eine Kombination aus Cofaktor-Regenerations- und Stofftransportlimitierung, wodurch sich eine Erhöhung der optimalen NADP⁺-Feed-

Konzentration ergibt. Die Verschiebung der optimalen Werte zeigt die Vielschichtigkeit der Reaktoroptimierung des Systems.

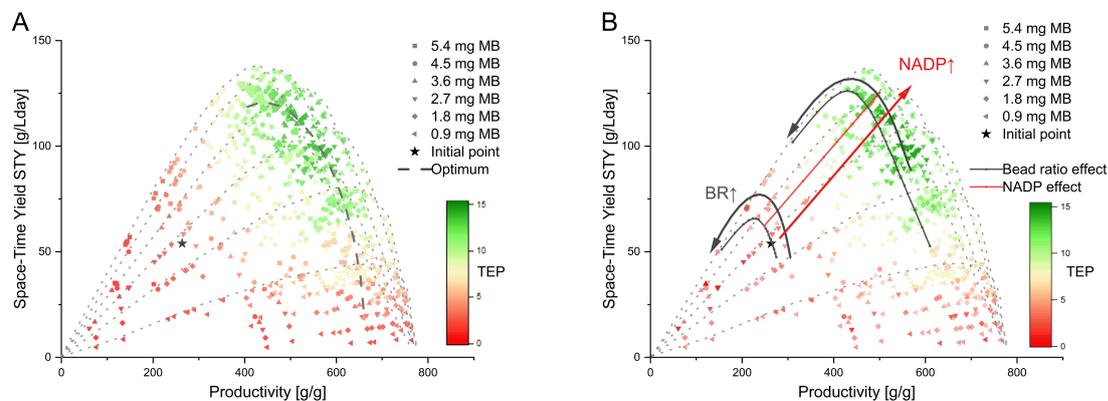


Abbildung 5.6 Ergebnisse des genetischen Algorithmus der MLRD-Optimierung zur Identifizierung eines geeigneten (technischen) Reaktorkonzepts. Die Symbole der einzelnen Partikelmengen sind in Abhängigkeit von ihrem TEP farblich dargestellt (Rot bis Grün). Abbildung A zeigt zusätzlich den Startpunkt (Stern) und die Linien der Optima (schwarz, gestrichelt). Abbildung B enthält zusätzlich den Einfluss des Partikelverhältnisses BR (schwarz) und der NADP+ Feed Konzentration (rot).

Abbildung 5.6 A stellt die Reaktorkenngrößen STY und Produktivität der untersuchten Parameterkombinationen dar, entsprechend den Punkten aus Abbildung 5.5. Die Datenpunkte sind farblich mit ihren TEP von Rot bis Grün im Wertebereich 0 bis 15 dargestellt. Weiterhin ist der Startpunkt und eine Linie für maximal mögliche Produktivität und STY für unterschiedliche Partikelmengen dargestellt. Auffällig ist, dass die Parameterkombinationen mit maximaler TEP (dunkelgrün) nicht auf den Maxima-Linien (gestrichelte Linien) liegen. Durch die ökonomische Betrachtung in der Optimierung verschiebt sich die Linie des Optimums in das Innere der Punktemenge, da sich die erhöhte Produktivität bzw. STY nicht mehr lohnt. Um das Verhalten, abhängig von den betrachteten Parametern darzustellen und einen Zusammenhang mit der parameterspezifischen Darstellung (Abbildung 5.5) herzustellen, sind in Abbildung 5.6 B die Tendenzen der Effekte visualisiert. Dafür wurden sowohl bei konstanter NADP+-Feed-Konzentration (BR-Effekt) als auch bei konstantem BR (NADP+-Effekt) die Tendenzen herausgearbeitet. Das Partikelverhältnis definiert die Form für die maximale STY und die Produktivität, da sie proportional zur Gre2-HOB Menge im Reaktor ist. Die Produktivität erhöht sich für geringere Partikelverhältnisse aufgrund optimaler Reaktionsbedingungen für die Gre2-HOB Enzyme. Die STY durchläuft für alle Partikelverhältnisse ein Maximum. Für unterschiedliche NADP+ Konzentrationen ist diese Form ähnlich. Bei der Erhöhung der NADP+-Konzentration verschiebt sich die Kurve zu erhöhter STY und Produktivität. Um eine maximale STY und Produktivität zu erreichen, ist ein hoher Aufwand nötig (hohe NADP+ Konzentrationen). Mit Hilfe des ökonomischen Modells wird dieser Aufwand relativiert. Diese Berücksichtigung verschiebt die Betriebspunkte mit optimaler TEP in Richtung niedrigerer NADP+-Feed-Konzentrationen. Somit werden optimale Parameterkombinationen für variierende Partikelmengen ermittelt, wobei eine maximal TEP für 3,1 mg MB

erreicht wird. Hierbei steigt die STY auf von $54 \frac{g(HK)}{Lday}$ auf $110 \frac{g(HK)}{Lday}$ und die Produktivität von $156 \frac{g(HK)}{g(Gre2)}$ auf $550 \frac{g(HK)}{g(Gre2)}$.

Die Form der Optimum-Linie weist Ähnlichkeiten zum Fall 1.3 (Abbildung 5.4 B) auf. Dies legt nahe, dass für alle betrachteten Partikelmengen eine Stofftransportlimitierung vorliegt. Der Stofftransport im Partikelbett kann durch die untersuchten Parameter nicht verbessert werden. Analog zu den Erkenntnissen in Kapitel 5.3.1 verringert sich der Effekt der Stofftransportlimitierung mit sinkender Partikelmenge. Die Erhöhung der NADP⁺-Feed-Konzentration kann die Cofaktor-Regenerationslimitierung minimieren.

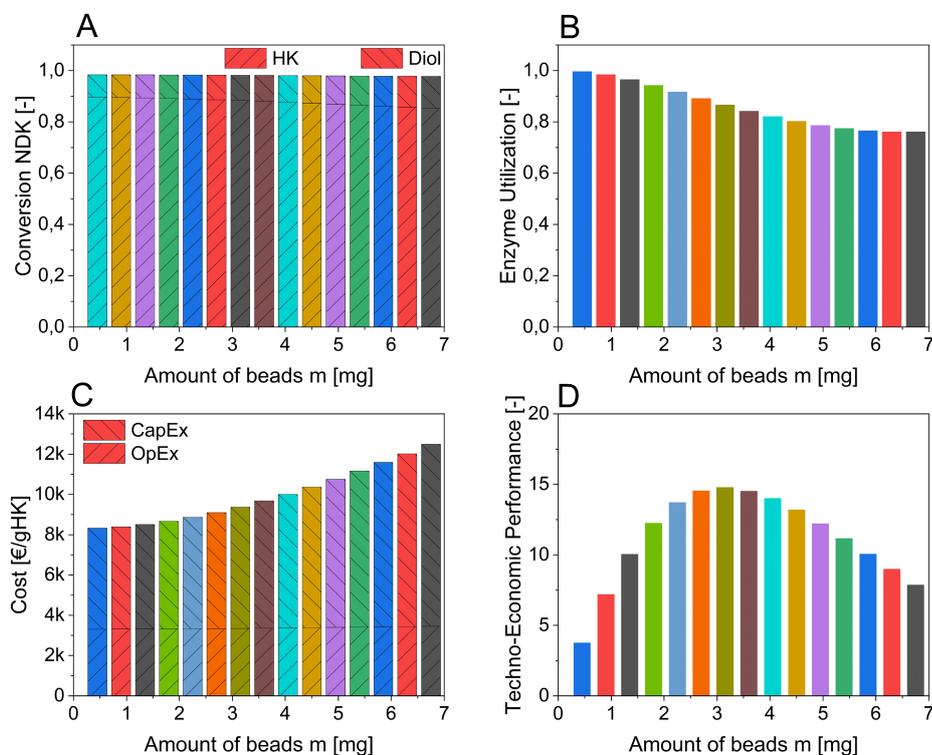


Abbildung 5.7 Reaktoreigenschaften der Optima aus dem genetischen Algorithmus für unterschiedliche Partikelmengen A: Umsatz von NDK zu HK und Diol, B: enzymatischer Wirkungsgrad (EU) η_R , C: Produktkosten, die sich aus CapEx und OpEx zusammensetzen, D: TEP.

Eine Übersicht der optimalen Reaktorbedingungen für unterschiedliche Partikelmengen ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Abgebildet sind der Umsatz und die Selektivität (A), der enzymatische Wirkungsgrad (EU) (B), die Produktkosten, die sich aus CapEx und OpEx zusammensetzen (C) und letztlich der TEP (D).

Mit steigender Partikelmenge erhöhen sich auch die Partikelbettdicke und der Diffusionsweg durch diese. Das HK, das im Partikelbett produziert wird und aus der Schicht in den freien Kanal transportiert wird, hat

somit eine höhere Verweilzeit im Partikelbett und dadurch auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit reduziert zu werden. Daraus resultiert, dass der Anteil an Diol steigt bzw. die Reaktorselectivität zu HK sinkt. Die Unterschiede des NDK-Umsatzes sind für alle Partikelmengen ähnlich, weshalb eine vergleichbare maximale HK-Ausbeute zu beobachten ist. Dies ist auf die Anpassung des Volumenstroms zurückzuführen, um eine maximale HK-Ausbeute zu bekommen. Längere Diffusionswege resultieren in stärkerer Stofftransportlimitierung und verringern den enzymatischen Wirkungsgrad (EU) η_R . Der Einfluss der Stofftransportlimitierung kann für größere Partikelmengen durch die Regenerationsreaktion ausgeglichen werden, weshalb die EU sich einem Grenzwert ($\eta_{R,min} = 0,75$) annähert.

Die Aufteilung der Produktkosten nach einer Woche Betriebszeit zeigt ein zu erwartendes Verhalten. Die OpEx sind aufgrund identischer optimaler Feed-Konzentrationen für alle Fälle gleich. Mit der Partikelmenge steigen die CapEx. Bei sinkender Partikelmenge nähern sich die CapEx Produktkosten von 5000 €/g an. Die CapEx können nicht den Wert Null erreichen, da hier Kosten auf die produzierte HK-Menge nach einer Woche Betriebszeit bezogen werden. Durch einer geringe STY haben die CapEx in der Kostenberechnung eine größere Gewichtung, was wiederum das Produktkostenverhalten erklärt.

Das Verhalten in Ausbeute, Produktivität und Produktkosten drückt sich schließlich in der Techno-Ökonomischen Leistung (TEP) für optimierte Reaktorbedingungen aus (Abbildung 5.7 D). Die MLRD-Methode ergibt eine maximale TEP für eine Partikelmenge von 3,2 mg. Durch die Anpassung der NADP+-Feed-Konzentration und des Partikelverhältnis ergibt sich eine minimale Limitierung durch den Stofftransport bzw. Cofaktor-Regeneration, wodurch eine Verbesserung der TEP auf 14,8 bezogen auf den Standardfall mit gelösten GDH(ST) ermöglicht wird.

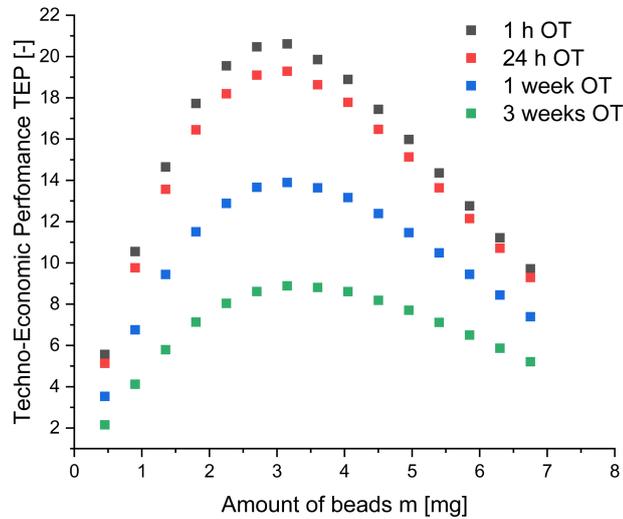


Abbildung 5.8 TEP für unterschiedliche Partikelmengen bei verschiedenen Betriebszeiten (OT) von 1 h bis 3 Wochen. TEP bezieht sich auf den entsprechenden TEP des Standardfalls mit gelöster GDH und 4.5 mg Partikel bei der entsprechenden OT. Das TEP-Maximum sinkt und verschiebt sich zu höheren Partikelmengen für längere OTs.

Die Berechnung der Kosten (Gl. 5.3) zeigt, dass die Gewichtung der CapEx von der Betriebszeit (OT) abhängig ist. Somit werden die Produktkosten mit kürzerer Betriebszeit größer und das TEP-Maximum verschiebt sich. Der Einfluss der Betriebszeit auf die TEP bei Betriebszeiten von 1h bis 3 Wochen ist in Abbildung 5.8 aufgezeigt. Kurze Betriebszeiten erhöhen den Einfluss der CapEx, wodurch das TEP-Maximum sich zu geringeren Partikelmengen verschiebt. Bei einer Stunde Betriebszeit existiert ein Optimum bei einer Partikelmenge von 3 mg. Für längere Betriebszeiten wird die Kurve gestaucht, wobei sich das Maximum verringert und leicht in Richtung höherer Partikelmengen verschiebt. Die TEP bezieht sich auf die Betriebszeit (OT) und erreicht bei geringen OTs Werte bis zu 21, was eine signifikante Verbesserung gegenüber dem Standardfall darstellt. Mit längeren Betriebszeiten verringert sich dieser Faktor auf maximal 9 bei einer Betriebszeit von 3 Wochen. Die Betriebszeit hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Ökonomie des Reaktorsystems.

5.4 Zusammenfassung

Die Systemoptimierung eines chemischen Prozesses basierend auf der mathematischen Modellierung ist ein effizientes und vielseitiges Werkzeug. Computergestützte Methoden ermöglichen die Ermittlung ressourcenschonender Einsichten und Informationen eines Reaktorsystems die experimentell sehr aufwendig oder nicht zugänglich sind. Dazu zählt neben dem allgemeinen Reaktorverhalten auch die Darstellung von limitierenden Prozessen und Faktoren. Ziel der Systemoptimierung ist es Limitierungen zu minimieren und somit die Leistung zu verbessern. Um das Verständnis der beteiligten Prozesse zu untersuchen, hat

sich die Methode des Multi-Level-Reactor-Designs (MLRD) als vielversprechend erwiesen. Mit der MLRD wurde in dieser Arbeit der Einfluss unterschiedlicher elementarer Prozesse und ihre Effekte dargestellt. Für das in dieser Arbeit untersuchte Reaktorsystem beziehen sich die elementaren Prozesse auf den Stofftransport in der Partikelschicht und die Cofaktor-Regeneration. Der Mikroreaktor mit überströmtem Partikelbett und immobilisierten Enzymen zur stereoselektiven Reduktion mit Cofaktor-Regeneration wurde in Bezug auf die Techno-Ökonomische Leistung (TEP, engl.: *Techno-Economic Performance*) optimiert. Die TEP setzt sich aus den Reaktorleistungen und einem ökonomischen Modell zur Bewertung der Produktkosten des Intermediats (HK) der zweistufigen Reduktion zusammen.

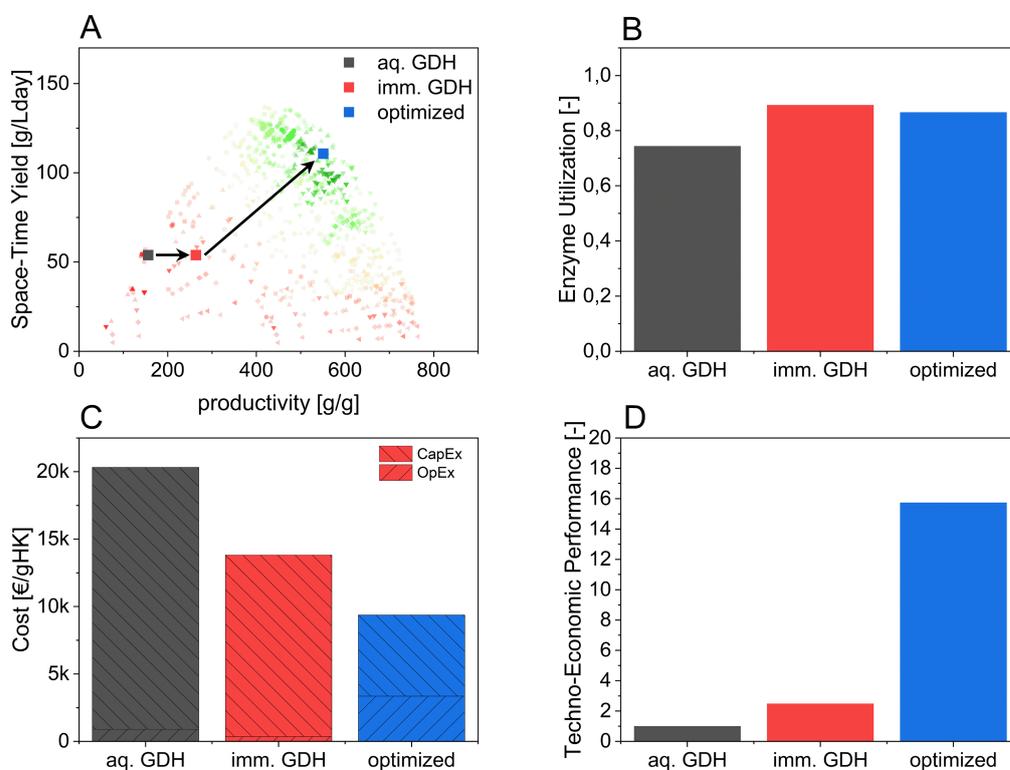


Abbildung 5.9 Verlauf der Optimierungsmethode vom Standardfall mit gelöster GDH (schwarz), immobilisierter GDH (rot) und optimierter Systemparameter (blau) für 4,5 mg Partikel; A: STY und Produktivität; B: enzymatischer Wirkungsgrad (EU) η_R ; C: Produktkosten; D: TEP.

In Abbildung 5.9 sind die unterschiedlichen Optimierungsmaßnahmen dieses Kapitels dargestellt. Ausgehend vom Standardfall mit gelöster GDH über den Einfluss der Immobilisierung von GDH bis zum optimierten Reaktordesign mit der MLRD wird das Reaktorverhalten grundlegend verbessert.

In einem ersten Schritt wurde der Effekt der Immobilisierung des Regenerationsenzym GDH(ST) auf separaten Partikeln untersucht. Die Immobilisierung der GDH(ST) verringert die maximale Anzahl an Gre2-HOB im Reaktorsystem und verbessert bei gleichem STY die Produktivität des Reaktorsystems mit

geringeren Produktkosten. Das ist auf die Enzymbelastung der einzelnen GDH(ST) Partikel zurückzuführen. Somit erhöht sich der enzymatische Wirkungsgrad η_R (EU) und letztlich wird die TEP mehr als verdoppelt.

Das Reaktorsystem mit immobilisierter GDH(ST) wurde in einem letzten Schritt mit der MLRD untersucht und bezüglich der NADP⁺-Konzentration im Feed, dem Partikelverhältnis $BR \frac{m_{Gre2}}{m_{total}}$ und der Partikelmenge optimiert. Die eingesetzte Partikelmenge wird hierbei als proportional zur Partikelschichtdicke angenommen. Bei der Optimierung wurde ein von der Partikelmassen unabhängiges TEP-Maximum beobachtet, bei einer NADP⁺ Feed Konzentration von 10 mM und einem Partikelverhältnis von $0,74 \frac{m_{Gre2}}{m_{total}}$. Der optimierte Reaktor erreicht eine erhöhte STY von $54 \frac{g(HK)}{Lday}$ anstelle von $110 \frac{g(HK)}{Lday}$ und die Produktivität erhöht sich von $156 \frac{g(HK)}{g(Gre2)}$ auf $550 \frac{g(HK)}{g(Gre2)}$ mit einer Partikelmenge von 3,1 mg. Gleichzeitig halbieren sich die Produktkosten bezogen auf der Betriebszeit. Zusammengefasst ergibt die Optimierung eine Verbesserung der TEP um den Faktor 15. Für das weitere Vorgehen und die letzte Bewertung der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse ist eine experimentelle Verifizierung essenziell.

Das System kann durch Aufbereitungsverfahren weiterführend optimiert werden. Durch ein NADP⁺ und NADPH-Recycling kann die TEP des Reaktors weiter verbessert werden. Durch die Wiederverwendung des austretenden NADP⁺ bzw. NADPH werden die OpEx reduziert. Jedoch erhöhen sich die CapEx aufgrund der nachgeschalteten Trennmethode und muss in einer weiteren ökonomischen Betrachtung berücksichtigt werden. Das Potential solcher Recycling-Maßnahmen zeigen Baumer et al. beispielhaft für ein Zwei-Phasen-System und eine Extraktion zweier in sich unlöslicher Flüssigkeiten (FLLEX) (Baumer et al. 2020).

Dieses Kapitel zeigt die Vielseitigkeit und das Potential computergestützter Optimierungsmethoden für biochemische Reaktorsystem. Die Verbindung zwischen Reaktorleistung und der ökonomischen Betrachtung zeigt, dass die ökonomische Betrachtung einen maßgeblichen Faktor darstellt. Speziell in der Etablierung von Flussreaktoren in der Wirtschaft bedarf es attraktiver Reaktorsysteme, die durch Optimierung weniger Abfall produzieren und hohe Nutzungsgrade aufweisen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Die Anwendung der Bionik, basierend auf dem Phänomen der Kompartimentierung in menschlichen Zellen, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von verschiedenen Simulationsmethoden auf unterschiedlichen Größenordnungen untersucht. Die Anordnung von Enzymkaskaden auf der molekularen Ebene ermöglicht neben einer hohen Selektivität durch die Verkürzung der Diffusionswege verschiedener Substrate auch eine Beschleunigung der Umsetzung. Enzymkaskaden mit Abständen von wenigen nm (molekulare Größenordnung) stellen somit optimierte Biokatalysatoren dar. Die Leistung solcher optimierten Biokatalysatoren stößt in der Technik auf großes Interesse, speziell bei der Anwendung in kontinuierlichen Mikroreaktoren. Die technische Umsetzung ist jedoch eine große Herausforderung. Die Kombination der DNA-Origami-Technologie und der Enzymimmobilisierung ermöglicht die Applikation von Biokatalysatoren mit geordneten Enzymkaskaden auf molekularer Ebene. Aufgrund hoher Herstellungskosten gestaltet sich die elementare Untersuchung von verschiedenen Nahordnungen als zentrale Aufgabe in der Erforschung von Nahordnungen von Enzymkaskaden. Mithilfe der Kombination aus Modellierung bzw. Simulation und computergestützte-Methoden können optimierte Biokatalysatoren und deren Anwendung in der Reaktortechnik analysiert und optimiert werden. In dieser Arbeit wurden Simulationsmethoden für Prozesse auf unterschiedlichen Größenordnungen untersucht. Dabei wurde das Potential der verschiedenen Methoden und deren abgebildete Prozesse für die Optimierung des kontinuierlichen Reaktors ausgearbeitet. Schließlich wurde das Reaktordesign, für das in dieser Arbeit untersuchte, kontinuierliche Reaktorsystem mit einem überströmten Partikelbett herausgearbeitet, das die Konkurrenzfähigkeit eines solchen Systems gegenüber einem konventionellen Satzreaktor verbessert.

Die theoretische Untersuchung und Optimierung eines Mikroreaktorsystems mit einer immobilisierten Enzymkaskade in unterschiedlichen Größenordnungen können in drei übergeordnete Größenordnungen gegliedert werden: die Molekülebene (wenige nm) (Kapitel 2), die mikroskopische Ebene (wenige μm) (Kapitel 3) und die makroskopische Ebene (wenige mm) (Kapitel 4 und 5). Die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse werden im Folgenden festgehalten.

Auf der Molekülebene wurden die (bio-)chemischen Prozesse zum Umsatz des untersuchten Reaktionssystems beschrieben. Dabei wurde die enzymatisch katalysierte, stereoselektive Reduktion eines Diketons unter Verwendung eines zusätzlichen Cofaktor-Regenerationssystems als Modellreaktion betrachtet. Basierend auf kinetischen Experimenten konnte das Verhalten der einzelnen Reaktionen und des Reaktionssystem mit einer Multisubstratreaktionskinetik beschrieben werden. Brown'sche Dynamik-Simulationen ermöglichten die theoretische Analyse des Einflusses von DNA-Origami-Platten (DON) auf den

Assoziationsprozess des Cofaktors. Hierbei wurde die indirekte Assoziation aus der Bulkphase und die direkte Assoziation von einem benachbarten Regenerationsenzym simuliert. Die Einflüsse des Enzymabstands und der Präsenz der DON wurden mit festen Enzymabständen zwischen 10 und 30 nm untersucht. Zur Ermittlung des Einflusses der DON wurden zwei identische Fälle mit und ohne DON erstellt und simuliert. Enzymabstände in dieser Größenordnung sind für freie Enzyme (ohne DON) sehr unwahrscheinlich und dienen hierbei als Vergleich. Die Immobilisierung und Anordnung der Enzyme auf der DON verstärkt die Reduktionsreaktionsrate aufgrund erhöhten Assoziationsgeschwindigkeiten (AGK) des Cofaktors. Abhängig vom Enzymabstand erhöht sich die AGK. Der Effekt der Substrat-Kanalierung (engl.: *substrate channeling*) resultiert aus der Präsenz der DON. Die DON ist einerseits eine physikalische Barriere und hält weiterhin aufgrund elektrostatischer Kräfte das polare Zwischenprodukt an der Oberfläche und erhöht somit die Assoziationswahrscheinlichkeit. Für den geringsten Enzymabstand erhöht sich die AGK aufgrund der DON und der Substrat-Kanalierung von 40% auf 67% verglichen mit AGK für Substrate, die aus der Bulkphase zum Enzym diffundieren. Der Assoziationsprozess des Cofaktors erhöht die Reaktionsrate. Durch die Nahordnung der Enzyme wird diese bei einem Abstand von 10 nm um 21% (ohne DON) bzw. 31% (mit DON) erhöht. Mit Vergrößerung der Enzymabstände verringert sich die Verstärkung und ist bei einem Abstand von 30 nm kaum noch zu beobachten. Diese Tendenzen sind in kinetischen Satzreaktor-Experimenten mit immobilisierten Enzymkaskaden ebenfalls beobachtet worden. Jedoch weichen die Reaktionsraten von den in den Simulationen berechneten Werten ab. Es wurde deutlich, dass die Brown'sche Simulationen die Beobachtungen aus Experimenten darstellen können und weiterhin das Optimierungspotential der Anordnung der Enzymkaskaden auf molekularer Ebene aufzeigen.

Auf der mikroskopischen Ebene befasst sich diese Arbeit mit dem Reaktordesign und den geometrischen Eigenschaften des Reaktors. Die Dicke der Partikelschicht aus kompakten, magnetischen Partikeln wurde optisch analysiert. Über den Anfängen bzw. Enden der alternierenden Neodym-Magneten bilden sich Hügel, die über dem Kontakt zweier Magnete erhöht sind. Die durchschnittliche Partikelschichtdicke beträgt 94,8 μm und die Porosität beträgt 0,309. Zur weiteren Untersuchung der Partikelschicht wurde der Beladungsvorgang (Bildung der Partikelschicht) in einer Partikelsimulation untersucht. Mit einem berechneten Magnetfeld (COMSOL) wurde die Bildung des ersten Partikelhügels in zwei Bereichen (starke und schwache magnetische Sedimentationskräfte) exemplarisch simuliert und die Partikelanordnung bzw. Porosität bestimmt (OpenLB). Im ersten Bereich, über dem Anfang des ersten Magneten, wurde der primär entstandene Hügel untersucht. Nach der Simulation von mehr als 40.000 Partikeln entsteht ein Hügel der Höhe von ca. 100 μm mit kompakt gepackten Partikeln mit einer Bettporosität zwischen 0,287 und 0,353. Der zweite Bereich liegt über der Mitte des ersten Magneten, wo geringere magnetische Kräfte wirken. Hier ist das Partikelbett anfällig für Packungsfehler und es ergibt sich eine Bettporosität zwischen 0,358 und 0,407.

Auf der makroskopischen Ebene wurden die Erkenntnisse für das Reaktionssystem und die geometrischen Reaktoreigenschaften zur Erstellung von mathematischen Modellen genutzt. Ein pseudo-2D Modell wurde in Matlab erstellt, um den Reaktorumsatz zu beschreiben. Veränderungen der kinetischen Assoziationsparameter der beteiligten Reaktionen aufgrund der Enzymimmobilisierung wurden mit Hilfe von in-situ-Untersuchungen des Ausgangsfalls rekali­briert. Anhand einer Flussraten- und Partikelschichtvariation wurde das Reaktormodell validiert. Der Vergleich der Ergebnisse aus Modell und Experiment weist übereinstimmende Tendenzen auf, wobei bei dem Modell ein leicht erhöhter Reaktorumsatz vorhergesagt wurde. Die Abweichungen wurde auf eine Überschätzung des Stofftransportes zwischen dem Partikelbett und dem freien Kanalvolumen zurückgeführt. Mit der Überführung des Modells in ein zweidimensionales und dreidimensionales Modell in ANSYS Fluent wurde die Genauigkeit des pseudo-2D Modells und der Validität getroffenen Annahmen untersucht. Diese detaillierteren Reaktormodelle erhöhen die Genauigkeit auf Kosten der Rechenleistung. Der Vergleich der Reaktor­berechnungen der drei Modelle ergab eine Abweichung von 3,5 % des Reaktorumsatzes vom pseudo-2D Modell bezogen auf das 3D-Modell. Das pseudo-2D Modell stellte sich als bester Kompromiss aus Genauigkeit und Rechenaufwand in Bezug auf Optimierungsmaßnahmen heraus. Die Reaktormodellierung ermöglichte und verdeutlichte Regionen im Reaktor, die unzureichend genutzt werden und fungiert des Weiteren als Werkzeug zum Prozessparameter-Screening. Das Modell veranschaulichte, dass Bereiche im Reaktor durch die Regenerationsreaktion und den Stofftransport limitiert sind.

Das Pseudo-2D Modell wurde anschließend zur Optimierung des Reaktorsystems und Identifikation geeigneter Prozessparameter genutzt. Dabei wurden die Limitierungen durch Stofftransport und Cofaktor-Regeneration minimiert bzw. optimiert. Das Reaktordesign wurde bezüglich einer techno-ökonomischen Leistung (engl.: *Techno-Economic Performance*, TEP) optimiert, wobei die Produktivität, die Raumzeitausbeute (STY) und die Produktionskosten berücksichtigt werden. In einem ersten Schritt wurde die Immobilisierung des zuvor im Feed gelösten Regenerationsenzym­s untersucht. Aufgrund unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden und Träger wurde bei diesem Vergleich das Enzymverhältnis für gleiche Raumzeitausbeute angepasst. Die Immobilisierung des Regenerationsenzym­s stellte sich als vorteilhafter in Bezug auf die Produktivität, Kosten und somit die TEP heraus. Darauf aufbauend wurde die Cofaktor-Feed-Konzentration, das Enzymverhältnis aus Reduktions- und Regenerationsenzymen im Reaktor und die Partikelschichtdicke mit Hilfe der Multi-Level-Reactor-Design (MLRD) Methode optimiert. Die Untersuchung der elementaren Prozesse offenbarte den Effekt der drei Optimierungsparameter. Durch eine Balance der beteiligten Reaktionen und des Stoff­transports, bezogen auf die TEP wurde der Reaktor im Zuge der Optimierung um den Faktor 15 verbessert. Dies beinhaltet die mögliche Erhöhung der Produktivität ($156 \frac{g(HK)}{g(Gre2)}$ auf $550 \frac{g(HK)}{g(Gre2)}$) und der spezifischen Raumzeitausbeute ($54 \frac{g(HK)}{Lday}$ auf $110 \frac{g(HK)}{Lday}$), in Relation zum Ausgangsfall. Diese theoretisch berechneten Verbesserungen können in der Realität abweichen und müssen noch experimentell validiert werden. Dennoch zeigen sie, dass die computergestützte

Optimierung erstaunliche, unvorhergesehene Optimierungsmöglichkeiten offenbart, die für komplexe Reaktorsysteme möglich sind.

6.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bilden das Fundament für weiterführende Untersuchungen. Im Folgenden sind Ideen bzw. Untersuchungen aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden konnten:

- Die molekularen Simulationen sollten auf mehrere bzw. neue Enzym- bzw. Reaktionssysteme angewandt werden. Die Simulationen sind stark von der molekularen Struktur der Enzyme und den Immobilisierungsmethoden abhängig. In der Literatur werden u.a. unterschiedliche Regenerationsystemen erfolgreich genutzt, die eine einfachere Immobilisierungsmethode ermöglichen, verglichen mit GDH.
- Weitere Molekularsimulationen sollten sich auf den Einfluss unterschiedlicher Enzymverhältnisse auf den DONs fokussieren. Dadurch könnte eine Optimierung des Katalysators auf molekularer Ebene ermöglicht werden.
- Neben Enzymen können auch nicht katalytisch aktive Moleküle auf den DONs immobilisiert werden, die ein Abschirmen oder Leiten der Intermediate ermöglichen. Sowohl die Positionierung als auch die Orientierung solcher Moleküle könnte mittels molekularer Simulationen ermittelt und in Experimenten kontrolliert werden.
- Die Anwendung von optimierten Katalysatoren mit Hilfe von DNA-Nanotechnologie sollte im Weiteren in einem kontinuierlichen Mikroreaktorsystem mit den mathematischen Modellen vorhergesagt werden und in Experimenten untersucht werden.
- Die in dieser Arbeit entwickelten Maßnahmen zur Optimierung der NADPH-Feed-Konzentrationen, des Enzym- bzw. Partikelverhältnisses und der Partikelschichtdicke sollten experimentell validiert werden.
- Die computergestützte Optimierungsmethode sollte im Hinblick auf Cofaktor-Recycling untersucht werden. Speziell sollten hierbei die Mehrkosten der Separierung in Bezug auf die Wiederverwendung von Cofaktor und letztlich dessen Einfluss auf die techno-ökonomische Leistung betrachtet werden.
- Des Weiteren sollte die Katalysatoroptimierung auf molekularer Ebene mit den Reaktoroptimierung verbunden werden. Es sollte außerdem analysiert werden, wie sie sich auf die Leistung des Reaktors auswirken. Speziell sollte hierbei ein großes Augenmerk auf die Kosten gerichtet werden, da die Herstellung solcher optimierten Katalysatoren mit hohen Kosten einhergeht.

Essenziell in der Umsetzung dieser Möglichkeiten und Ideen ist eine exakte Kontrolle der Reaktorbedingungen. Das beinhaltet neben der Kontrolle über Temperatur, Feed und eine effiziente Enzymimmobilisierung eine exakte Kontrolle über die Form des Partikelbetts bzw. des Magnetfeldes. Um dies zu ermöglichen wurde eine neue Chiphalterung entworfen und erstellt (siehe Abbildung 6.1).

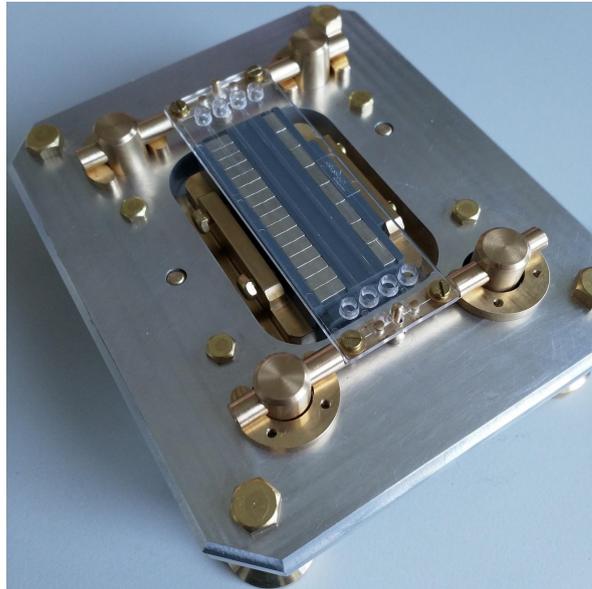


Abbildung 6.1 Chiphalterung mit eingebauten Magnethalterung aus Kunststoff (längs und quer angeordnete Magnete).

Diese Halterung ermöglicht eine genaue Einstellung des Abstands zwischen Reaktorchip und den Magneten mit einer Genauigkeit im Mikrometerbereich. Darüber hinaus kann der Reaktorchip einseitig gehoben bzw. gesenkt werden, wodurch der Chip gekippt wird. Somit ermöglicht dieses System einen weiteren Freiheitsgrad der Partikelschichtoptimierung.

7 Literaturverzeichnis

Agapakis, Christina M.; Boyle, Patrick M.; Silver, Pamela A. (2012): Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. In: *Nature chemical biology* 8 (6), S. 527–535. DOI: 10.1038/nchembio.975.

Andrews, Steven S.; Addy, Nathan J.; Brent, Roger; Arkin, Adam P. (2010): Detailed simulations of cell biology with Smoldyn 2.1. In: *PLoS computational biology* 6 (3), e1000705. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000705.

Arrighini, G. P.; Maestro, M.; Moccia, R. (1968): Magnetic Properties of Polyatomic Molecules. I. Magnetic Susceptibility of H_2O , NH_3 , CH_4 , H_2O_2 . In: *The Journal of chemical physics* 49 (2), S. 882–889. DOI: 10.1063/1.1670155.

Asai, Ryo; Vladimirov, Andrey (2015): Intel Cilk Plus for complex parallel algorithms: “Enormous Fast Fourier Transforms” (EFFT) library. In: *Parallel Computing* 48 (2), S. 125–142. DOI: 10.1016/j.parco.2015.05.004.

Baehr, Hans Dieter; Stephan, Karl (2010): Wärme- und Stoffübertragung: Mit zahlreichen Tabellen sowie 62 Beispielen und 94 Aufgaben. 7., neu bearb. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Baerns, Manfred; Behr, Arno; Brehm, Axel; Gmehling, Jürgen; Hofmann, Hanns; Onken, Ulfert (2013): Technische chemie: John Wiley & Sons.

Baronas, Romas; Kulys, Juozas; Petkevičius, Linas (2018): Modelling the enzyme catalysed substrate conversion in a microreactor acting in continuous flow mode. In: *Nonlinear Analysis: Modelling and Control* 23 (3), S. 437–458. DOI: 10.15388/NA.2018.3.9.

Baumer, Benedikt; Classen, Thomas; Pohl, Martina; Pietruszka, Jörg (2020): Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [NADP(H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 362 (14), S. 2894–2901. DOI: 10.1002/adsc.202000058.

Bhatnagar, P. L.; Gross, E. P.; Krook, M. (1954): A Model for Collision Processes in Gases. I. Small Amplitude Processes in Charged and Neutral One-Component Systems. In: *Physical Review* 94 (3), S. 511–525. DOI: 10.1103/PhysRev.94.511.

Bhattacharya, Swati; Muzard, L.; Payet, L.; Mathé, Jerome; Bockelmann, Ulrich; Aksimentiev, Aleksei; Viasnoff, Virgile (2011): Rectification of the current in alpha-hemolysin pore depends on the cation type: the alkali series probed by MD simulations and experiments. In: *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* 115 (10), S. 4255–4264. DOI: 10.1021/jp111441p.

-
- Bian, Xin; Kim, Changho; Karniadakis, George Em (2016): 111 years of Brownian motion. In: *Soft matter* 12 (30), S. 6331–6346. DOI: 10.1039/c6sm01153e.
- Bisswanger, Hans (2017): Enzyme kinetics: Principles and methods. Third, enlarged and improved edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527806461>.
- Bitterwolf, Patrick; Ott, Felix; Rabe, Kersten S.; Niemeyer, Christof M. (2019): Imine Reductase Based All-Enzyme Hydrogel with Intrinsic Cofactor Regeneration for Flow Biocatalysis. In: *Micromachines* 10 (11). DOI: 10.3390/mi10110783.
- Briggs, George Edward; Haldane, John Burdon Sanderson (1925): A note on the kinetics of enzyme action. In: *Biochemical journal* 19 (2), S. 338.
- Brinkman, H. C. (1949): A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles. In: *Flow, Turbulence and Combustion* 1 (1), S. 1045. DOI: 10.1007/BF02120313.
- Brown, Steven R.; Staff, Marta; Lee, Rob; Love, John; Parker, David A.; Aves, Stephen J.; Howard, Thomas P. (2018): Design of Experiments Methodology to Build a Multifactorial Statistical Model Describing the Metabolic Interactions of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Ethanol Biosynthetic Pathway of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *ACS synthetic biology* 7 (7), S. 1676–1684. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00112.
- Burgahn, Teresa (2019): Doktorarbeit - Assemblierung von funktionalen Proteinen auf DNA-Nanostrukturen: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Burgahn, Teresa; Garrecht, Ruben; Rabe, Kersten S.; Niemeyer, Christof M. (2019): Solid-Phase Synthesis and Purification of Protein-DNA Origami Nanostructures. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 25 (14), S. 3483–3488. DOI: 10.1002/chem.201805506.
- Burgahn, Teresa; Pietrek, Philip; Dittmeyer, Roland; Rabe, Kersten S.; Niemeyer, Christof M. (2020): Evaluation of a Microreactor for Flow Biocatalysis by Combined Theory and Experiment. In: *ChemCatChem* 12 (9), S. 2452–2460. DOI: 10.1002/cctc.202000145.
- Camacho, Juan Manuel; Sosa, Victor (2013): Alternative method to calculate the magnetic field of permanent magnets with azimuthal symmetry. In: *Revista mexicana de física E* 59 (1), S. 8–17.
- Carvalho, Filipe; Marques, Marco; Fernandes, Pedro (2017): Sucrose Hydrolysis in a Bespoke Capillary Wall-Coated Microreactor. In: *Catalysts* 7 (12), S. 42. DOI: 10.3390/catal7020042.
- Case, David A.; Cheatham, Thomas E.; Darden, Tom; Gohlke, Holger; Luo, Ray; Merz, Kenneth M. et al. (2005): The Amber biomolecular simulation programs. In: *Journal of computational chemistry* 26 (16), S. 1668–1688. DOI: 10.1002/jcc.20290.

Chapman, Sydney; Cowling, T. G. (1998): The mathematical theory of non-uniform gases: An account of the kinetic theory of viscosity, thermal conduction and diffusion in gases. 3. ed., transferred to digital printing. Cambridge: Cambridge Univ. Press (Cambridge mathematical library).

Chen, Anna H.; Silver, Pamela A. (2012): Designing biological compartmentalization. In: *Trends in cell biology* 22 (12), S. 662–670. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.07.002.

Chen, Xiaoying; Zaro, Jennica L.; Shen, Wei-Chiang (2013): Fusion protein linkers: property, design and functionality. In: *Advanced drug delivery reviews* 65 (10), S. 1357–1369. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039.

Chen, Yahong; Ke, Guoliang; Ma, Yanli; Zhu, Zhi; Liu, Minghui; Liu, Yan et al. (2018): A Synthetic Light-Driven Substrate Channeling System for Precise Regulation of Enzyme Cascade Activity Based on DNA Origami. In: *Journal of the American Chemical Society* 140 (28), S. 8990–8996. DOI: 10.1021/jacs.8b05429.

Chmiel, Horst (2011): Bioprozesstechnik. 3., neu bearb. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10494116>.

Cleland, W.W (1963): The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* 67, S. 104–137. DOI: 10.1016/0926-6569(63)90211-6.

COMSOL AB, Stockholm, Sweden (2021): COMSOL Multiphysics®. Version 5.6. Online verfügbar unter www.comsol.com.

Contente, Martina L.; Dall'Oglio, Federica; Tamborini, Lucia; Molinari, Francesco; Paradisi, Francesca (2017): Highly Efficient Oxidation of Amines to Aldehydes with Flow-based Biocatalysis. In: *ChemCatChem* 9 (20), S. 3843–3848. DOI: 10.1002/cctc.201701147.

Cornish-Bowden, Athel (2012): Fundamentals of enzyme kinetics: Wiley-Blackwell Weinheim, Germany.

Da Vinci, Leonardo (1505): Codice sul volo degli uccelli.

Dall'Oglio, Federica; Contente, Martina Letizia; Conti, Paola; Molinari, Francesco; Monfredi, Danila; Pinto, Andrea et al. (2017): Flow-based stereoselective reduction of ketones using an immobilized ketoreductase/glucose dehydrogenase mixed bed system. In: *Catalysis Communications* 93, S. 29–32. DOI: 10.1016/j.catcom.2017.01.025.

Deen, N. G.; van Sint Annaland, M.; van der Hoef, M. A.; Kuipers, J.A.M. (2007): Review of discrete particle modeling of fluidized beds. In: *Chemical Engineering Science* 62 (1-2), S. 28–44. DOI: 10.1016/j.ces.2006.08.014.

Deo, Claire; Abdelfattah, Ahmed S.; Bhargava, Hersh K.; Berro, Adam J.; Falco, Natalie; Farrants, Helen et al. (2021): The HaloTag as a general scaffold for far-red tunable chemigenetic indicators. In: *Nature chemical biology* 17 (6), S. 718–723. DOI: 10.1038/s41589-021-00775-w.

Dunn, Peter J.; Wells, Andrew S.; Williams, Michael T. (Hg.) (2010): *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Ederer, Michael; Gilles, Ernst Dieter (2007): Thermodynamically feasible kinetic models of reaction networks. In: *Biophysical journal* 92 (6), S. 1846–1857. DOI: 10.1529/biophysj.106.094094.

Elcock, Adrian H. (2004): Molecular Simulations of Diffusion and Association in Multimacromolecular Systems. In: *Numerical Computer Methods, Part D, Bd. 383: Elsevier (Methods in Enzymology)*, S. 166–198.

Emenike, Victor N.; Schenkendorf, René; Krewer, Ulrike (2018): Model-based optimization of biopharmaceutical manufacturing in *Pichia pastoris* based on dynamic flux balance analysis. In: *Computers & Chemical Engineering* 118, S. 1–13. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2018.07.013.

Ender, Ferenc; Weiser, Diána; Nagy, Botond; Bencze, Csaba László; Paizs, Csaba; Pálovics, Péter; Poppe, László (2016): Microfluidic multiple cell chip reactor filled with enzyme-coated magnetic nanoparticles — An efficient and flexible novel tool for enzyme catalyzed biotransformations. In: *Journal of Flow Chemistry* 6 (1), S. 43–52. DOI: 10.1556/1846.2015.00036.

Ergun, Sabri (1952): Fluid flow through packed columns. In: *Chem. Eng. Prog.* 48, S. 89–94.

Finnigan, William; Citoler, Joan; Cosgrove, Sebastian C.; Turner, Nicholas J. (2020): Rapid Model-Based Optimization of a Two-Enzyme System for Continuous Reductive Amination in Flow. In: *Organic Process Research & Development* 24 (10), S. 1969–1977. DOI: 10.1021/acs.oprd.0c00075.

Fonnum, Geir; Johansson, Christer; Molteberg, Astrid; Mørup, Steen; Aksnes, Elin (2005): Characterisation of Dynabeads® by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (1), S. 41–47. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.041.

Freund, Hannsjörg; Peschel, Andreas; Sundmacher, Kai (2011): Modellgestützter Reaktorentwurf auf Basis der optimalen Reaktionsführung. In: *Chemie Ingenieur Technik* 83 (4), S. 420–426. DOI: 10.1002/cite.201000195.

Freund, Hannsjörg; Sundmacher, Kai (2008): Towards a methodology for the systematic analysis and design of efficient chemical processes. In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47 (12), S. 2051–2060. DOI: 10.1016/j.cep.2008.07.011.

Frisch; Hasslacher; Pomeau (1986): Lattice-gas automata for the Navier-Stokes equation. In: *Physical review letters* 56 (14), S. 1505–1508. DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.1505.

-
- Gao, Yingning; Roberts, Christopher C.; Toop, Aaron; Chang, Chia-En A.; Wheeldon, Ian (2016): Mechanisms of Enhanced Catalysis in Enzyme-DNA Nanostructures Revealed through Molecular Simulations and Experimental Analysis. In: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 17 (15), S. 1430–1436. DOI: 10.1002/cbic.201600224.
- Good, Matthew C.; Zalatan, Jesse G.; Lim, Wendell A. (2011): Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6030), S. 680–686. DOI: 10.1126/science.1198701.
- Guo, Peng-Chao; Bao, Zhang-Zhi; Ma, Xiao-Xiao; Xia, Qingyou; Li, Wei-Fang (2014): Structural insights into the cofactor-assisted substrate recognition of yeast methylglyoxal/isovaleraldehyde reductase Gre2. In: *Biochimica et biophysica acta* 1844 (9), S. 1486–1492. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.05.008.
- Guo, Zhaoli; Shu, Chang (2013): Lattice Boltzmann Method and Its Applications in Engineering: WORLD SCIENTIFIC (3).
- Guo, Zhaoli; Zhao, T. S. (2002): Lattice Boltzmann model for incompressible flows through porous media. In: *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 66 (3 Pt 2B), S. 36304. DOI: 10.1103/PhysRevE.66.036304.
- Hagen, Gotthilf (1839): Ueber die Bewegung des Wassers in engen cylindrischen Röhren. In: *Annalen der Physik* 122 (3), S. 423–442.
- Hakala, Tuuli A.; Bialas, Friedrich; Toprakcioglu, Zenon; Bräuer, Birgit; Baumann, Kevin N.; Levin, Aviad et al. (2020): Continuous Flow Reactors from Microfluidic Compartmentalization of Enzymes within Inorganic Microparticles. In: *ACS applied materials & interfaces* 12 (29), S. 32951–32960. DOI: 10.1021/acsami.0c09226.
- Hanwell, Marcus D.; Curtis, Donald E.; Lonie, David C.; Vandermeersch, Tim; Zurek, Eva; Hutchison, Geoffrey R. (2012): Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. In: *Journal of cheminformatics* 4 (1), S. 17. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17.
- Hartmann, Martin; Jung, Dirk (2010): Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. In: *J. Mater. Chem.* 20 (5), S. 844–857. DOI: 10.1039/B907869J.
- Hoffmann, Ulrich; Hofmann, Hanns (1971): Einführung in die Optimierung. Mit Anwendungsbeispielen aus dem Chemie-Ingenieur-Wesen; [erw. Fass. eines Dechema-Kurses]. Weinheim/Bergstr.: Verl. Chemie.
- Huber, G. A.; Kim, S. (1996): Weighted-ensemble Brownian dynamics simulations for protein association reactions. In: *Biophysical journal* 70 (1), S. 97–110. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79552-8.

Huber, Gary A.; McCammon, J. Andrew (2010): Browndye: A Software Package for Brownian Dynamics. In: *Computer physics communications* 181 (11), S. 1896–1905. DOI: 10.1016/j.cpc.2010.07.022.

IBS Magnet (2021): NeoDeltaMagnet® (NdFeB), 21.01.2021. Online verfügbar unter <https://www.ibsmagnet.de/products/dauermagnete/neodelta.php>.

Innosyn (2020): Glucose Dehydrogenase (GDH-01), 14.12.2020 (14.12.2020). Online verfügbar unter <https://www.innosyn.com/products/glucose-dehydrogenase-gdh-01/>.

Jamari, Siti Khumaira Mohd; Nordin, Nur Azmah; Ubaidillah; Aziz, Siti Aishah Abdul; Nazmi, Nurhazimah; Mazlan, Saiful Amri (2020): Systematic Review on the Effects, Roles and Methods of Magnetic Particle Coatings in Magnetorheological Materials. In: *Materials (Basel, Switzerland)* 13 (23). DOI: 10.3390/ma13235317.

Kaiser, Markus; Freund, Hannsjörg (2019): A multimodular pseudoheterogeneous model framework for optimal design of catalytic reactors exemplified by methanol synthesis. In: *Chemical Engineering Science* 206, S. 401–423. DOI: 10.1016/j.ces.2019.04.036.

Kaswurm, Vanja; van Hecke, Wouter; Kulbe, Klaus Dieter; Ludwig, Roland (2013): Guidelines for the Application of NAD(P)H Regenerating Glucose Dehydrogenase in Synthetic Processes. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 355 (9), S. 1709–1714. DOI: 10.1002/adsc.201200959.

Ke, Guoliang; Liu, Minghui; Jiang, Shuoxing; Qi, Xiaodong; Yang, Yuhe Renee; Wootten, Shaun et al. (2016): Directional Regulation of Enzyme Pathways through the Control of Substrate Channeling on a DNA Origami Scaffold. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 55 (26), S. 7483–7486. DOI: 10.1002/anie.201603183.

Keller, Adrian; Linko, Veikko (2020): Herausforderungen und Perspektiven von DNA-Nanostrukturen in der Biomedizin. In: *Angewandte Chemie* 132 (37), S. 15950–15966. DOI: 10.1002/ange.201916390.

Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. (1958): A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. In: *Nature* 181 (4610), S. 662–666. DOI: 10.1038/181662a0.

Kim, Dohyun; Herr, Amy E. (2013): Protein immobilization techniques for microfluidic assays. In: *Biomicrofluidics* 7 (4), S. 41501. DOI: 10.1063/1.4816934.

Kockmann, Norbert (2007): Transport phenomena in micro process engineering: Springer Science & Business Media.

Krause, M. J.; Kummerländer, A.; Avis, S. J.; Kusumaatmaja, H.; Dapelo, D.; Klemens, F. et al. (2020): OpenLB-Open source lattice Boltzmann code. In: *Computers & Mathematics with Applications*. DOI: 10.1016/j.camwa.2020.04.033.

-
- Krüger, Timm; Kusumaatmaja, Halim; Kuzmin, Alexandr; Shardt, Orest; Silva, Goncalo; Viggen, Erlend Magnus (2017): *The Lattice Boltzmann Method*. Cham: Springer International Publishing.
- Kubo, Ryogo (1966): The fluctuation-dissipation theorem. In: *Reports on Progress in Physics* 29 (1), S. 1–16. DOI: 10.1088/0034-4885/29/1/306.
- Liebermeister, Wolfram; Klipp, Edda (2006): Bringing metabolic networks to life: convenience rate law and thermodynamic constraints. In: *Theoretical biology & medical modelling* 3, S. 41. DOI: 10.1186/1742-4682-3-41.
- Liebermeister, Wolfram; Uhlenhof, Jannis; Klipp, Edda (2010): Modular rate laws for enzymatic reactions: thermodynamics, elasticities and implementation. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (12), S. 1528–1534. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq141.
- Lindner, Johannes; Menzel, Katharina; Nirschl, Hermann (2013): Simulation of magnetic suspensions for HGMS using CFD, FEM and DEM modeling. DOI: 10.5445/IR/1000034649.
- Lorentz, H. A. (1881): Ueber die Anwendung des Satzes vom Virial in der kinetischen Theorie der Gase. In: *Annalen der Physik* 248 (1), S. 127–136. DOI: 10.1002/andp.18812480110.
- Lorenz, Chris; Doltsinis, Nikos L. (2017): Molecular Dynamics Simulation: From “Ab Initio” to “Coarse Grained”. In: Jerzy Leszczynski, Anna Kaczmarek-Kedziera, Tomasz Puzyn, Manthos G. Papadopoulos, Heribert Reis und Manoj K. Shukla (Hg.): *Handbook of Computational Chemistry*, Bd. 104. Cham: Springer International Publishing, S. 337–396.
- Los, Georgyi V.; Encell, Lance P.; McDougall, Mark G.; Hartzell, Danette D.; Karassina, Natasha; Zimprich, Chad et al. (2008): HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. In: *ACS chemical biology* 3 (6), S. 373–382. DOI: 10.1021/cb800025k.
- Masgrau, Laura; González-Lafont, Àngels; Lluch, José M. (2017): Chapter 5. Computational Enzymology: Modelling Biological Catalysts. In: Sonsoles Martín-Santamaría (Hg.): *Computational Tools for Chemical Biology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Chemical Biology), S. 108–144.
- Maußner, Johannes; Dreiser, Christian; Wachsen, Olaf; Freund, Hannsjörg (2019): Systematic model-based design of tolerant chemical reactors. In: *Journal of Advanced Manufacturing and Processing* 1 (3), S. 1. DOI: 10.1002/amp2.10024.
- Mei, Qian; Wei, Xixi; Su, Fengyu; Liu, Yan; Youngbull, Cody; Johnson, Roger et al. (2011): Stability of DNA origami nanoarrays in cell lysate. In: *Nano letters* 11 (4), S. 1477–1482. DOI: 10.1021/nl1040836.
- Meywerk, Martin (2007): *CAE-Methoden in der Fahrzeugtechnik*. [New York]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Michaelis, Leonor; Menten, Maud L. (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. In: *Biochem. z* 49 (333-369), S. 352.

Microfluidic ChipShop (2021): Straight channel chips with four parallel channels, 21.01.2021. Online verfügbar unter <https://www.microfluidic-chipshop.com/catalogue/microfluidic-chips/polymer-chips/straight-channel-chips-microscopy-slide-format/straight-channel-chips-with-four-parallel-channels-fluidic-138/>.

Milo, Ron; Jorgensen, Paul; Moran, Uri; Weber, Griffin; Springer, Michael (2010): BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. In: *Nucleic acids research* 38 (Database issue), D750-3. DOI: 10.1093/nar/gkp889.

Miložič, Nataša; Stojkovič, Gorazd; Vogel, Andreas; Bouwes, Dominique; Žnidaršič-Plazl, Polona (2018): Development of microreactors with surface-immobilized biocatalysts for continuous transamination. In: *New biotechnology* 47, S. 18–24. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.05.004.

Mizuta, Keisuke; Ishii, Yoshiki; Kim, Kang; Matubayasi, Nobuyuki (2019): Bridging the gap between molecular dynamics and hydrodynamics in nanoscale Brownian motions. In: *Soft matter* 15 (21), S. 4380–4390. DOI: 10.1039/c9sm00246d.

Müller, Marion; Katzberg, Michael; Bertau, Martin; Hummel, Werner (2010): Highly efficient and stereoselective biosynthesis of (2S,5S)-hexanediol with a dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Organic & biomolecular chemistry* 8 (7), S. 1540–1550. DOI: 10.1039/b920869k.

MyBioSource (2021): Gre2 recombinant protein, 22.01.2021. Online verfügbar unter <https://www.mybiosource.com/recombinant-protein/nadph-dependent-methylglyoxal-reductase-gre2-gre2/1288367>.

Nachtigall, Werner (2010): Bionik als Wissenschaft: Erkennen - Abstrahieren - Umsetzen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1604455>.

Nachtigall, Werner (2013): Bionik in Beispielen: 250 Illustrierte Ansätze. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=1206058>.

Niemeyer, Christof M. (2010): Semisynthetic DNA-protein conjugates for biosensing and nanofabrication. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49 (7), S. 1200–1216. DOI: 10.1002/anie.200904930.

Northrup, Scott H.; Allison, Stuart A.; McCammon, J. Andrew (1984): Brownian dynamics simulation of diffusion-influenced bimolecular reactions. In: *The Journal of chemical physics* 80 (4), S. 1517–1524. DOI: 10.1063/1.446900.

-
- Northrup, Scott H.; Zarrin, Fahimeh; McCammon, J. Andrew (1982): Rate theory for gated diffusion-influenced ligand binding to proteins. In: *The Journal of Physical Chemistry* 86 (13), S. 2314–2321. DOI: 10.1021/j100210a014.
- Oke, M.; Carter, L. G.; Johnson, K. A.; Liu, H.; McMahon, S. A.; White, M. F.; Naismith, J. H. (2010): Crystal structure of the *Streptococcus pyogenes* fibronectin binding protein Fbab-B.
- Ozboyaci, Musa; Kokh, Daria B.; Corni, Stefano; Wade, Rebecca C. (2016): Modeling and simulation of protein-surface interactions: achievements and challenges. In: *Quarterly reviews of biophysics* 49, e4. DOI: 10.1017/S0033583515000256.
- Pamme, Nicole (2006): Magnetism and microfluidics. In: *Lab on a chip* 6 (1), S. 24–38. DOI: 10.1039/b513005k.
- Pearson, Douglas C.; Gross, Elizabeth L. (1998): Brownian Dynamics Study of the Interaction between Plastocyanin and Cytochrome f. In: *Biophysical journal* 75 (6), S. 2698–2711. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77714-8.
- Peschel, Andreas; Jörke, Andreas; Sundmacher, Kai; Freund, Hannsjörg (2012): Optimal reaction concept and plant wide optimization of the ethylene oxide process. In: *Chemical Engineering Journal* 207-208, S. 656–674. DOI: 10.1016/j.cej.2012.07.029.
- Peschke, Theo (2018): Doktorarbeit - Nutzung von Biokatalysatoren für kompartimentierte Mehrschritt Reaktionen in mikrofluidischen Bioreaktoren: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Peschke, Theo; Bitterwolf, Patrick; Gallus, Sabrina; Hu, Yong; Oelschlaeger, Claude; Willenbacher, Norbert et al. (2018): Self-Assembling All-Enzyme Hydrogels for Flow Biocatalysis. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 57 (52), S. 17028–17032. DOI: 10.1002/anie.201810331.
- Peschke, Theo; Gallus, Sabrina; Bitterwolf, Patrick; Hu, Yong; Oelschlaeger, Claude; Willenbacher, Norbert et al. (2017a): Self-assembling all-enzyme hydrogels for biocatalytic flow processes (7).
- Peschke, Theo; Skoupi, Marc; Burgahn, Teresa; Gallus, Sabrina; Ahmed, Ishtiaq; Rabe, Kersten S.; Niemeyer, Christof M. (2017b): Self-Immobilizing Fusion Enzymes for Compartmentalized Biocatalysis. In: *ACS Catalysis* 7 (11), S. 7866–7872. DOI: 10.1021/acscatal.7b02230.
- Pietrek, Philip; Kraut, Manfred; Dittmeyer, Roland (2021): Towards a Novel Computer-Aided Optimization of Microreactors: Techno-Economic Evaluation of an Immobilized Enzyme System. In: *Symmetry* 13 (3), S. 524. DOI: 10.3390/sym13030524.
- Plimpton, Steven J.; Slepoy, Alex (2005): Microbial cell modeling via reacting diffusive particles. In: *Journal of Physics: Conference Series* 16, S. 305–309. DOI: 10.1088/1742-6596/16/1/042.

-
- Ponder, Jay W.; Case, David A. (2003): Force Fields for Protein Simulations. In: Protein Simulations, Bd. 66: Elsevier (Advances in Protein Chemistry), S. 27–85.
- Rabe, Kersten S.; Müller, Joachim; Skoupi, Marc; Niemeyer, Christof M. (2017): Cascades in Compartments: En Route to Machine-Assisted Biotechnology. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 56 (44), S. 13574–13589. DOI: 10.1002/anie.201703806.
- Rajendran, Arivazhagan; Nakata, Eiji; Nakano, Shun; Morii, Takashi (2017): Nucleic-Acid-Templated Enzyme Cascades. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 18 (8), S. 696–716. DOI: 10.1002/cbic.201600703.
- Roberts, Christopher C.; Chang, Chia-En A. (2015): Modeling of enhanced catalysis in multienzyme nanostructures: effect of molecular scaffolds, spatial organization, and concentration. In: *Journal of chemical theory and computation* 11 (1), S. 286–292. DOI: 10.1021/ct5007482.
- Roberts, Christopher C.; Chang, Chia-En A. (2016): Analysis of Ligand-Receptor Association and Intermediate Transfer Rates in Multienzyme Nanostructures with All-Atom Brownian Dynamics Simulations. In: *The journal of physical chemistry. B* 120 (33), S. 8518–8531. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02236.
- Rojnuckarin, Atipat; Livesay, Dennis R.; Subramaniam, Shankar (2000): Bimolecular Reaction Simulation Using Weighted Ensemble Brownian Dynamics and the University of Houston Brownian Dynamics Program. In: *Biophysical journal* 79 (2), S. 686–693. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76327-2.
- Rothmund, Paul W. K. (2006): Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. In: *Nature* 440 (7082), S. 297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
- Saa, Pedro A.; Nielsen, Lars K. (2017): Formulation, construction and analysis of kinetic models of metabolism: A review of modelling frameworks. In: *Biotechnology advances* 35 (8), S. 981–1003. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.005.
- Saccà, Barbara; Ishitsuka, Yuji; Meyer, Rebecca; Sprengel, Andreas; Schöneweiß, Elisa-Charlott; Nienhaus, G. Ulrich; Niemeyer, Christof M. (2015): Reversible reconfiguration of DNA origami nanochambers monitored by single-molecule FRET. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54 (12), S. 3592–3597. DOI: 10.1002/anie.201408941.
- Saccà, Barbara; Meyer, Rebecca; Erkelenz, Michael; Kiko, Kathrin; Arndt, Andreas; Schroeder, Hendrik et al. (2010): Orthogonal protein decoration of DNA origami. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49 (49), S. 9378–9383. DOI: 10.1002/anie.201005931.
- Saccà, Barbara; Niemeyer, Christof M. (2011): Functionalization of DNA nanostructures with proteins. In: *Chemical Society reviews* 40 (12), S. 5910–5921. DOI: 10.1039/C1CS15212B.

-
- Saccà, Barbara; Niemeyer, Christof M. (2012): DNA-Origami: die Kunst, DNA zu falten. In: *Angewandte Chemie* 124 (1), S. 60–69. DOI: 10.1002/ange.201105846.
- Sadava, David; Hillis, David M.; Heller, H. Craig; Hacker, Sally D. (2019): *Purves Biologie*. 10. Aufl. 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1588446>.
- Salomon-Ferrer, Romelia; Case, David A.; Walker, Ross C. (2013): An overview of the Amber biomolecular simulation package. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 3 (2), S. 198–210. DOI: 10.1002/wcms.1121.
- Satoh; Chantrell; Coverdale (1999): Brownian Dynamics Simulations of Ferromagnetic Colloidal Dispersions in a Simple Shear Flow. In: *Journal of colloid and interface science* 209 (1), S. 44–59. DOI: 10.1006/jcis.1998.5826.
- Satoh, Akira (2011): *Introduction to Practice of Molecular Simulation*. s.l.: Elsevier Science Ltd (Elsevier insights). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10440534>.
- Schlick, Tamar (2010): *Molecular Modeling and Simulation : An Interdisciplinary Guide: An Interdisciplinary Guide*. 2. ed. New York, NY: Springer Science+Business Media LLC (Interdisciplinary Applied Mathematics, 21).
- Schmidt, J. R.; Skinner, J. L. (2003): Hydrodynamic boundary conditions, the Stokes–Einstein law, and long-time tails in the Brownian limit. In: *The Journal of chemical physics* 119 (15), S. 8062–8068. DOI: 10.1063/1.1610442.
- Schmiermund, Torsten (2019): *Einführung in die Stereochemie: Eine Hilfe für Studierende und Auszubildende*. 1st ed. 2019. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden Imprint: Springer Spektrum (essentials).
- Schröder, Hendrik; Hoffmann, Linda; Müller, Joachim; Alhorn, Petra; Fleger, Markus; Neyer, Andreas; Niemeyer, Christof M. (2009): Addressable microfluidic polymer chip for DNA-directed immobilization of oligonucleotide-tagged compounds. In: *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 5 (13), S. 1547–1552. DOI: 10.1002/smll.200801016.
- Schrödinger, L. L.C.; Warren DeLano: PyMOL. Online verfügbar unter <http://www.pymol.org/pymol>.
- Schüler, Karl; Brinkmann, Kurt (1970): *Dauermagnete: Werkstoffe und Anwendungen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schuster, Stefan; Schuster, Ronny (1989): A generalization of Wegscheider's condition. Implications for properties of steady states and for quasi-steady-state approximation. In: *Journal of Mathematical Chemistry* 3 (1), S. 25–42. DOI: 10.1007/BF01171883.

-
- Seeman, Nadrian C. (1982): Nucleic acid junctions and lattices. In: *Journal of Theoretical Biology* 99 (2), S. 237–247. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
- Seeman, Nadrian C. (2005): Structural DNA nanotechnology: an overview. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 303, S. 143–166. DOI: 10.1385/1-59259-901-X:143.
- Senn, Hans Martin; Thiel, Walter (2009): QM/MM methods for biomolecular systems. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (7), S. 1198–1229. DOI: 10.1002/anie.200802019.
- Sensofar (06.07.21): SENSO FAR S neox, 06.07.21 (06.07.21). Online verfügbar unter <https://www.sensofar.com/wp-content/uploads/2021/03/BR90-05F-DE-Brochure-S-neox.pdf>.
- Sheldon, Roger A. (2007): Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 349 (8-9), S. 1289–1307. DOI: 10.1002/adsc.200700082.
- Sheldon, Roger A.; Brady, Dean (2018): The limits to biocatalysis: pushing the envelope. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 54 (48), S. 6088–6104. DOI: 10.1039/C8CC02463D.
- Sigma Aldrich (2020a): D-(+)-Glucose, 14.12.2020 (14.12.2020). Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g8270>.
- Sigma Aldrich (2020b): NADP Disodium salt, 14.12.2020 (14.12.2020). Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/nadpro>.
- Sigma Aldrich (2020c): NADPH Tetrasodium salt, 14.12.2020 (14.12.2020). Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/nadphro>.
- Sobczak, Jean-Philippe J.; Martin, Thomas G.; Gerling, Thomas; Dietz, Hendrik (2012): Rapid folding of DNA into nanoscale shapes at constant temperature. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6113), S. 1458–1461. DOI: 10.1126/science.1229919.
- Sobol, I.M (2001): Global sensitivity indices for nonlinear mathematical models and their Monte Carlo estimates. In: *Mathematics and Computers in Simulation* 55 (1-3), S. 271–280. DOI: 10.1016/S0378-4754(00)00270-6.
- Spaar, Alexander; Helms, Volkhard (2005): Free Energy Landscape of Protein-Protein Encounter Resulting from Brownian Dynamics Simulations of Barnase:Barstar. In: *Journal of chemical theory and computation* 1 (4), S. 723–736. DOI: 10.1021/ct050036n.
- Stieß, Matthias (2009): Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1. 3., vollst. neu bearb. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10257925>.

-
- Stiles, Joel R.; Bartol, Thomas M. (2001): Monte Carlo methods for simulating realistic synaptic microphysiology using MCell. In: *Computational neuroscience: realistic modeling for experimentalists*, S. 87–127.
- Stojkovič, Gorazd; Žnidaršič-Plazl, Polona (2012): Continuous synthesis of l-malic acid using whole-cell microreactor. In: *Process Biochemistry* 47 (7), S. 1102–1107. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.03.023.
- Strniša, Filip; Bajić, Marijan; Panjan, Peter; Plazl, Igor; Sesay, Adama Marie; Žnidaršič-Plazl, Polona (2018): Characterization of an enzymatic packed-bed microreactor: Experiments and modeling. In: *Chemical Engineering Journal* 350, S. 541–550. DOI: 10.1016/j.cej.2018.05.028.
- Szymkuć, Sara; Gajewska, Ewa P.; Klucznik, Tomasz; Molga, Karol; Dittwald, Piotr; Startek, Michał et al. (2016): Computer-Assisted Synthetic Planning: The End of the Beginning. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 55 (20), S. 5904–5937. DOI: 10.1002/anie.201506101.
- The MathWorks, Inc. (2020): MATLAB Optimization Toolbox. Natick, Massachusetts, United State. Online verfügbar unter <https://www.mathworks.com/help/symbolic/>.
- Thermo Fischer (2020): Dynabeads magnetic bead technology, 14.12.2020 (14.12.2020). Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/product-brand/dynal.html>.
- Tian, Chuan; Kasavajhala, Koushik; Belfon, Kellon A. A.; Raguette, Lauren; Huang, He; Miguez, Angela N. et al. (2020): ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. In: *Journal of chemical theory and computation* 16 (1), S. 528–552. DOI: 10.1021/acs.jctc.9b00591.
- Tuckwell, Henry C. (1995): Elementary applications of probability theory: With an introduction to stochastic differential equations. Second edition. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC (Chapman & Hall statistics textbook series).
- Tufvesson, Pär; Fu, Wenjing; Jensen, Jacob Skibsted; Woodley, John M. (2010): Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. In: *Food and Bioproducts Processing* 88 (1), S. 3–11. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.01.003.
- Verein Deutscher Ingenieure (2013): VDI-Wärmeatlas. Reference work. 11., bearb. und erw. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Vieweg.
- Wang, Junmei; Hou, Tingjun (2011): Application of molecular dynamics simulations in molecular property prediction II: diffusion coefficient. In: *Journal of computational chemistry* 32 (16), S. 3505–3519. DOI: 10.1002/jcc.21939.

-
- Wang, Xiaodong; Saba, Tony; Yiu, Humphrey H.P.; Howe, Russell F.; Anderson, James A.; Shi, Jiafu (2017): Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. In: *Chem* 2 (5), S. 621–654. DOI: 10.1016/j.chempr.2017.04.009.
- Waring, Scott (2018): Quantum Biology: A Scientific Revolution in our Understanding of Biological Systems. In: *Biological Systems: Open Access* 07 (01). DOI: 10.4172/2329-6577.1000185.
- Watson, James D.; Crick, Francis H. C. (1953): Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature* 171 (4356), S. 737–738.
- Weiß, Jan-Philipp (2006): Numerical analysis of lattice Boltzmann methods for the heat equation on a bounded interval. Karlsruhe: Univ.-Verl. Karlsruhe.
- Weissberg, Harold L. (1963): Effective Diffusion Coefficient in Porous Media. In: *Journal of Applied Physics* 34 (9), S. 2636–2639. DOI: 10.1063/1.1729783.
- Wellein, G.; Zeiser, T.; Hager, G.; Donath, S. (2006): On the single processor performance of simple lattice Boltzmann kernels. In: *Computers & Fluids* 35 (8-9), S. 910–919. DOI: 10.1016/j.compfluid.2005.02.008.
- Wilke, C. R.; Chang, Pin (1955): Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. In: *AIChE Journal* 1 (2), S. 264–270. DOI: 10.1002/aic.690010222.
- Williams, Christopher J.; Headd, Jeffrey J.; Moriarty, Nigel W.; Prisant, Michael G.; Videau, Lizbeth L.; Deis, Lindsay N. et al. (2018): MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 27 (1), S. 293–315. DOI: 10.1002/pro.3330.
- Woodley, John M. (2006): Microbial Biocatalytic Processes and Their Development. In: *Advances in Applied Microbiology* Volume 60, Bd. 60: Elsevier (Advances in Applied Microbiology), S. 1–15.
- Woodley, John M. (2019): Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. In: *Applied microbiology and biotechnology* 103 (12), S. 4733–4739. DOI: 10.1007/s00253-019-09796-x.
- Wu, J. T.; Wu, L. H.; Knight, J. A. (1986): Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. In: *Clinical chemistry* 32 (2), S. 314–319.
- Xie, Mingquan; Freund, Hannsjörg (2018): Optimal reactor design and operation taking catalyst deactivation into account. In: *Chemical Engineering Science* 175, S. 405–415. DOI: 10.1016/j.ces.2017.10.010.
- Yamamoto, K.; Kurisu, G.; Kusunoki, M.; Tabata, S.; Urabe, I.; Osaki, S. (2001): CRYSTAL STRUCTURE OF GLUCOSE DEHYDROGENASE COMPLEXED WITH NAD⁺.

Yang, Yuhe R.; Fu, Jinglin; Wootten, Shaun; Qi, Xiaodong; Liu, Minghui; Yan, Hao; Liu, Yan (2018): 2D Enzyme Cascade Network with Efficient Substrate Channeling by Swinging Arms. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 19 (3), S. 212–216. DOI: 10.1002/cbic.201700613.

Ye, Dekai; Zuo, Xiaolei; Fan, Chunhai (2018): DNA Nanotechnology-Enabled Interfacial Engineering for Biosensor Development. In: *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 11 (1), S. 171–195. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061417-010007.

Yoo, Jejoong; Winogradoff, David; Aksimentiev, Aleksei (2020): Molecular dynamics simulations of DNA-DNA and DNA-protein interactions. In: *Current opinion in structural biology* 64, S. 88–96. DOI: 10.1016/j.sbi.2020.06.007.

Zhang, X-Y; Trame, M. N.; Lesko, L. J.; Schmidt, S. (2015): Sobol Sensitivity Analysis: A Tool to Guide the Development and Evaluation of Systems Pharmacology Models. In: *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 4 (2), S. 69–79. DOI: 10.1002/psp4.6.

Zhu, Yujiao; Chen, Qingming; Shao, Liyang; Jia, Yanwei; Zhang, Xuming (2020): Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. In: *Reaction Chemistry & Engineering* 5 (1), S. 9–32. DOI: 10.1039/C9RE00217K.

Žnidaršič-Plazl, Polona (2019): The Promises and the Challenges of Biotransformations in Microflow. In: *Biotechnology journal* 14 (8), e1800580. DOI: 10.1002/biot.201800580.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Stoffwechselsystem in einer menschlichen Zelle. Jeder Punkt steht für eine Komponente (Metabolit) und jede Bindung für eine Reaktion, katalysiert von einem Enzym (Sadava et al. 2019, S. 215–244).	17
Abbildung 1.2 A: Enzymkaskaden in natürlichen Zellen mit räumlichen Nahordnungen W: an der Zellwand; K: in einem Kompartiment; M: auf einem molekularen Gerüst (Design nach Good et al. (Good et al. 2011)). B: Kompartimentierung in der Biotechnologie mit geordneter Orientierung und Positionierung von Enzymen auf unterschiedlichen Größenordnungen: 1. Begrenzte Volumen mit unterschiedlichen Enzymen (<i>mm</i>); 2. Immobilisierung auf Oberflächen (μm) und 3. Immobilisierung auf molekularen Strukturen (<i>nm</i>) (Design nach Rabe et al. (Rabe et al. 2017)).....	19
Abbildung 1.3 Prinzip der DNA-Nanotechnologie.....	21
Abbildung 1.4 Optimierungsgrößen unterschiedlicher Größenordnungen, aufgeteilt in Optimierungen der Reaktordimensionen und des Biokatalysators. Die Faktoren der Optimierungen sind dargestellt.	22
Abbildung 1.5 Unterschiedliche Größenordnungen der Modellierung von Flüssigkeiten.....	23
Abbildung 1.6 Unterschiedliche Teilsysteme des Gesamtsystems und die Struktur in dieser Arbeit. Die verwendeten Simulationsmethoden mit der entsprechenden Software sind unter dem beschreibenden Bild aufgeführt.	27
Abbildung 2.1 Zweistufige Reduktion von 5-Nitrononan-2,8-Dion (NDK) mit Ketoreduktasen und den möglichen stereoselektiven Zwischenprodukten bzw. Endprodukten. Abhängig von stereoselektiven Enzymen entstehen (R)- bzw. (S)-selektive Stoffe.....	28
Abbildung 2.2 Reaktionsnetz zur stereoselektiven Reduktion von NDK mit Gre2 mit NADPH (Cofaktor) Regeneration mit GDH.....	29
Abbildung 2.3 Aufbau einer DNA-Helix und Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der einzelnen DNA (Design nach Burgahn (Burgahn 2019)).	32
Abbildung 2.4 Herstellung von DNA-Origami Nanostrukturen mit Gerüst- und Klammersträngen. Die Nanostruktur setzt sich bei erhöhter Temperatur von selbst zusammen (Design nach Burgahn (Burgahn 2019)).	33

Abbildung 2.5 Reaktionsmechanismen in Cleland Nomenklatur für einen sequenziell geordneten, sequenziell zufälligen, Theorell Chance und Ping-Pong Mechanismus (nach Cleland (Cleland 1963)).	35
Abbildung 2.6 Schematische Darstellung unterschiedlicher Inhibierungstypen. A: normale Assoziation eines Substrats an einem Enzym; B: kompetitive Inhibierung; C: nicht-kompetitive Inhibierung; D: unkompetitive Inhibierung. Design nach Bisswanger (Bisswanger 2017).	36
Abbildung 2.7 Experimente zu Bestimmung der intrinsischen Kinetik für die Cofaktor-Regeneration. A: Anfangsreaktionsraten TON in 1s. B: NADPH-Konzentrationsverlauf für unterschiedliche Mechanismen und die NADP+ Anfangskonzentrationen von 1 mM und 0,5 mM. Die experimentellen Daten wurden um die Zeit der Injektion bis zum Start der Messung verschoben (80s).	42
Abbildung 2.8 Experimente zu Bestimmung der intrinsischen kinetischen Parameter für die Reduktion von NDK. A: Enzymkonzentrationsunabhängige Anfangsreaktionsraten TON in 1s. B: Konzentrationsverlauf von NDK, HK und dem Diol innerhalb von 8000s.	44
Abbildung 2.9 Totale Sensitivitäten der kinetischen Parameter der Cofaktor-Regenerationsreaktion (A) mit GDH(ST) und der Reduktionen mit Gre2-HOB (B).	46
Abbildung 2.10 A: Molekularsimulationsmethoden und das abgebildete Größen- und Zeitmaß (Ozboyaci et al. 2016). B: Schematischer Verlauf der freien Energie während einer Enzymreaktion mit einem Substrat. Die Teilschritte Assoziation, Reaktion und Dissoziation sind in dem Graphen markiert. Der Graph wurde nach Cornish-Bowden erstellt (Cornish-Bowden 2012).	48
Abbildung 2.11 Schematische Darstellung der Anwendungsfälle von GeomBD. A: indirekte/NAM Methode (Adsorption aus der Bulkphase) b: Startradius der Liganden q: Austrittsradius. B: direkte Methode (Substrattransfer zwischen zwei Rezeptoren).	54
Abbildung 2.12 Flussdiagramm des Vorgehens der Durchführung einer Simulation mit GeomBD. Die nötigen strukturellen Moleküldateien (Blau: Ligand; Gelb: Rezeptor) entweder erstellt oder von Proteindatenbanken bezogen. Nach der Zuweisung von Partialladungen werden Kraftfeldgitter erstellt, die in der Simulation genutzt werden. Allgemeine Informationen für die Methode, Bindung und Anzahl der berechneten Liganden wird in einer „GBD-Input“-	

<p> Datei gegeben. Modifikationen (MolProbity (Williams et al. 2018)), Ligand Erstellung (Avogadro (Hanwell et al. 2012)) und die Berechnung der Partiellladungen von kleinen Molekülen (AMBER (Case et al. 2005)) werden mit zusätzlichen Programmen durchgeführt. </p>	55
<p> Abbildung 2.13 Effekt der direkten Assoziation durch Verstärkung der Anfangsreaktionsrate <i>v_{direct}</i>, bezogen auf die freie Anfangsreaktionsrate <i>v₀</i> für unterschiedliche NADPH-Konzentrationen bei linear skaliertes TGK. Die Kurve für 0,01 mM NADPH ist aufgrund der Grenzen der Y-Achse abgeschnitten (*). </p>	58
<p> Abbildung 2.14 Darstellung der Oberflächen des Gre2-HOB Fusionsproteins mit gefärbten Oberflächen zur Identifizierung der Komponenten. Orange: Gre2 mit der Bindetasche (Grün); Rot: GGGGS-Linker; Beige: HOB. </p>	59
<p> Abbildung 2.15 Diagramme der indirekten Assoziationsberechnungen bezogen auf alle Ereignisse (Assoziation und Austritt). A: Konvergenzverhalten der Rechnungen; B: indirekte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante <i>kon</i>; C: Anzahl der Bindeereignisse zu den gesamten Ereignissen; D: Start der Simulation mit auf einer Kugel zufällig verteilten NADPH Molekülen an Gre2- HOB mit der Bindetasche (Grün). </p>	60
<p> Abbildung 2.16 Bindung an der Enzymoberfläche von Gre2-HOB mit der entsprechenden Bindetasche (Grün) unterschiedlicher Liganden. </p>	61
<p> Abbildung 2.17 Darstellung von GDH(ST) mit SC. Das Tetramer GDH (Rottöne) ist mit dem ST fusioniert und mit dem SC (Türkis) verbunden. Drei Startpositionen SP 1-3 sind als lila Kugeln dargestellt. Die vierte Startposition ist von der GDH verdeckt. </p>	62
<p> Abbildung 3.1 PMMA-Chip mit vier Mikrokanälen mit unterschiedlicher Menge an magnetischen Partikeln braun. Der Chip ist auf einer temperierten Messingplatte eingespannt und unter den Kanälen sind acht Neodym Magnete platziert, die die Partikel im Kanal halten. </p>	69
<p> Abbildung 3.4 REM-Aufnahmen mit unterschiedlichen Vergrößerungen (A: x150; B: x1.000; C: x5.000; D: x10.000). </p>	72
<p> Abbildung 3.7 Beladener Reaktorkanal mit dem Partikelbett (braun) und schematischem Querschnitt in Seitenansicht. </p>	76
<p> Abbildung 3.8 A: Optische Messung der Partikelschicht in der Draufsicht der Mitte des Kanals über drei Magnete. Die Magnete unter dem Reaktorkanal sind mit roten Umrandungen gekennzeichnet. Zur Darstellung der Höhenunterschiede des </p>	

Betts ist die Farbskala angepasst (nicht linear). B: Durchschnittliche Höhe über die Länge von einem Magneten (in z-Richtung) des Partikelbettes aus A. Der Querschnitt des Kanals wurde eingezeichnet (gestrichelt).	78
Abbildung 3.9 A: Durchschnittliche Betthöhe über der Breite des Kanals im Verlauf der ersten drei Magnete des Reaktors. Die Daten (schwarz) wurden für die Darstellung geglättet (rot). Die durchschnittlichen Dicken des Anfangsbereichs und zwischen Hügeln sind gekennzeichnet (gestrichelt). B: Profilometrie des Partikelbetts am Anfang. Die Blase wurde händisch aus dem Datensatz ausgeschnitten und in der Schichtberechnung ausgeschlossen.....	79
Abbildung 3.11 Gradient der Flusssichte im Reaktorkanal, dargestellt mit schwarzen, normalisierten Pfeilen. Auf einer Schnittebene in der Mitte des Reaktorkanals ist die absolute Höhe des Gradienten der Magnetfeldstärke dargestellt.	81
Abbildung 3.12 Grafische Darstellung eines D2Q9-Gitters. Der Diskretisierungsparameter h definiert den Abstand der Knoten. Jedem Knoten ist eine Teilchengeschwindigkeit ξ_i zugeordnet, die zu einem Knotenwechsel benötigt wird.....	83
Abbildung 3.13 Ablauf eines Zeitschritts in der LBM. Nach der Berechnung der Kollision wird der Einfluss der Strömung auf die Knoten berücksichtigt.	84
Abbildung 3.14 Skizzierungen der Querschnitte des Berechnungsvolumen mit dem Nord- und Südpol der Dauermagnete (N und S) und der berechneten Region (rot gestrichelt) des Befüllungsvorgangs. Die Größen sind nicht maßstabsgetreu. A: Seitenansicht; B: Sicht von oben.	87
Abbildung 3.15 Ablauf der Simulation einer partikelbeladenen Strömung für die Partikelbettbildung. Die Simulation ist in die Berechnung der kontinuierlichen Phase (Euler-Methode, blau) und der Partikeln (Lagrange-Methode, grau) aufgeteilt.....	88
Abbildung 3.16 Partikelbettbildung nach Iteration 3 (A, 7500 Partikeln), 8 (B, 20000 Partikeln), 12 (C, 30000 Partikeln), 16 (D, 40000 Partikeln). Strömungslinien sind eingezeichnet, Boden und Decke sind schematisch eingezeichnet.....	89
Abbildung 3.17 Effekte der superparamagnetischen Partikeln in einem magnetischen Feld. A: Ausrichtung der magnetischen Momente der Partikeln mit Bildung von Partikelketten. Die Magnetfeldlinien sind schwarz dargestellt und einzelne Partikeln mit ihrem magnetischen Moment sind hervorgehoben. B:	

Fluoreszenzaufnahme der oberen Schicht (Burgahn 2019). C: Partikelketten der oberen Partikelschicht.	90
Abbildung 3.18 Darstellung der Partikelanordnung in der Mitte der Anhäufung in der Seitenansicht nach der 16. Iteration und 40000 sedimentierten Partikeln.	91
Abbildung 3.19 Verteilung der Partikelmittelpunkte in Seitenansicht (A, C) und Draufsicht (B, D). Das Volumen zur Berechnung der Porosität ist rot gekennzeichnet. Die Partikelberechnungen von Bereich 1 (über dem Anfang des ersten Magneten) sind in A und B dargestellt. Das berechnete Partikelbett in Bereich 2 (mittig über den Magneten) ist in C und D dargestellt.	92
Abbildung 4.1 A) Schematische Darstellung des Reaktors mit Stoffübergang vom freien Kanalvolumen V_{ec} zur Oberfläche des Partikelbetts V_{bed} . B) Infinitesimales Volumen im Bettvolumen mit Transport- und Quelltermen.	102
Abbildung 4.2 A: Ergebnis der Bestimmung der gehemmten Reaktionsparameter mit dem pseudo 2D-Modell. Dargestellt ist die Komponentenkonzentration im freien Reaktorvolumen im Verlauf des Reaktors und die experimentellen Werte. B: Bild und schematische Darstellung der unterschiedlichen Reaktorsetups mit unterschiedlich langen Partikelschichten (braun) von oben (Burgahn et al. 2020).	107
Abbildung 4.3 Zweidimensionale Darstellung der Reaktionsraten der Reduktionen (A: erste Reduktion, B: zweite Reduktion) und der Konzentrationen von NDK und NADPH. Die Kanalprojektionen mit den Partikelbett (braun) sind schematisch dargestellt (oben: Draufsicht; rechts: Seitenansicht). Abbildung aus Burgahn et al. (Burgahn et al. 2020).	109
Abbildung 4.4 Austrittskonzentrationsverteilung und Reaktorkenngrößen (STY, Produktivität und EU) für Volumenströme von 0,5 bis 2,0 μLmin . Der Reaktorkanal ist beladen mit 4,5 mg Partikeln mit immobilisierter Gre2-HOB. A: Bild und Schema des Reaktorkanals. B: Austrittskonzentrationsverteilung für die Experimente und die Berechnungen mit dem pseudo 2D-Modell. Abbildung adaptiert aus Burgahn et al. (Burgahn et al. 2020).	111
Abbildung 4.5 Austrittskonzentrationsverteilung und Reaktorkenngrößen (STY, Produktivität und EU) für Fälle mit unterschiedlichen durchschnittlichen Schichtdicken (1x entspricht dem Standardfall). Auf den Partikeln ist Gre2-HOB immobilisiert. A: Bild und Schema des Reaktorkanals. B: Austrittskonzentrationsverteilung für die Experimente und die Berechnungen mit dem pseudo 2D-Modell. Abbildung adaptiert aus Burgahn et al. (Burgahn et al. 2020).	112

Abbildung 4.6 Verlauf der durchschnittlichen Konzentrationen im freien Kanalvolumen über die Hälfte der Reaktorlänge für die beiden zweidimensionalen Modelle aus Matlab (durchgehende Linien) und Fluent (gestrichelte Linien).	116
Abbildung 4.7 Konzentrationsverlauf am Anfang des Reaktors im porösen Bett und im freien Kanalvolumen für das pseudo 2D-Modell in Matlab (durchgehende Linien) und das Fluent 2D Modell (gestrichelte Linien). Die Phasengrenze ist mit einer vertikalen, gestrichelten, grauen Linie gekennzeichnet. Die Phasengrenze ist vergrößert dargestellt.....	117
Abbildung 4.8 Konzentrationsverteilungen des Pseudo-2D Modells in Matlab und des Fluent 2D Modells für die ersten zwei Millimeter des Reaktors für NDK, HK und Diol. Ein Schema der Bereiche und die Farbskalen sind rechts neben den Plots dargestellt.....	118
Abbildung 4.9 Verlauf der durchschnittlichen Konzentrationen im freien Kanalvolumen über die Hälfte der Reaktorlänge für die beiden zweidimensionalen Modelle aus Matlab (durchgehende Linien), Fluent 2D (gestrichelte Linien) und Fluent 3D (Kreuze).....	119
Abbildung 5.1 MLRD Ebenen nach Freund et al. (Kaiser und Freund 2019) und die spezifischen Anpassungen für das in dieser Arbeit untersuchte Enzymkaskade mit Cofaktor-Regeneration und Stofftransport Limitierung.	124
Abbildung 5.2 Optimierungsparameter, die in der Systemoptimierung berücksichtigt werden. Parameter, die spezifisch für immobilisierte GDH sind, sind in Hellgrau gekennzeichnet und diejenigen für gelöste GDH in Dunkelgrau.....	126
Abbildung 5.3 NADPH-Konzentration in den ersten 10% des Reaktors für aq. GDH(ST) (A) und immobilisierte GDH(ST) (B).....	131
Abbildung 5.4 Ergebnisse der ersten Ebene der MLRD-Methode für Fall 1.1 (schwarze Vierecke, unbegrenzte Cofaktor-Regeneration und Stofftransport), Fall 1.2 (rote Kreise, mit Cofaktor-Regenerationslimitierung) und Fall 1.3 (blaue Dreiecke, mit Stofftransportlimitierung) für unterschiedliche Partikelmengen. A: Enzymatischer Wirkungsgrad (EU) η_R . Die Cofaktor-Regenerationslimitierung hemmt die Reduktion im Partikelbett, wodurch der Wirkungsgrad sinkt; B: STY und Produktivität. Mit steigender Partikelmasse steigt STY, für Fall 1.1 und 1.2 bei konstanter Produktivität. Fall 1.2 hat eine geringere Produktivität aufgrund von Stofftransporthemmung. Durch geringeren Wirkungsgrad sinkt die Produktivität und STY. Bei geringer Partikelmasse nähert sich Fall 1.3 den Werten von Fall 1.1 an.; C: Produktkosten. Die Produktionskosten für Fall 1.1	

und 2.2 sind konstant für verschiedene Partikelmasse, mit höheren Kosten für 1.2. Durch eine Verringerung des Wirkungsgrads sinkt der Umsatz und somit steigen die Kosten für Fall 1.3. D: TEP. Die Kombination aus den Verläufen und Beobachtungen aus A, B und C führt zu TEP-Verläufen, die bei Fall 1.1 und 1.2 steigende und leicht abflachende Werte beschreiben. Für Fall 1.3 wird ein Maximum von 10 bei einer Partikelladung von 2,75 mg erreicht.....133

Abbildung 5.5 Ergebnisse des genetischen Algorithmus für A: NADP+-Konzentration im Feed und B: Partikelverhältnis BR für Partikelmengen von 0,9 bis 5,4 mg. Eine Kurve für die maximalen TEP-Werte wurde für die Partikelmenge hinzugefügt. Als Stern ist der Startpunkt gekennzeichnet. 135

Abbildung 5.6 Ergebnisse des genetischen Algorithmus der MLRD-Optimierung zur Identifizierung eines geeigneten (technischen) Reaktorkonzepts. Die Symbole der einzelnen Partikelmengen sind in Abhängigkeit von ihrem TEP farblich dargestellt (Rot bis Grün). Abbildung A zeigt zusätzlich den Startpunkt (Stern) und die Linien der Optima (schwarz, gestrichelt). Abbildung B enthält zusätzlich den Einfluss des Partikelverhältnisses BR (schwarz) und der NADP+ Feed Konzentration (rot). 136

Abbildung 5.7 Reaktoreigenschaften der Optima aus dem genetischen Algorithmus für unterschiedliche Partikelmengen A: Umsatz von NDK zu HK und Diol, B: enzymatischer Wirkungsgrad (EU) ηR , C: Produktkosten, die sich aus CapEx und OpEx zusammensetzten and D: TEP.137

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Vergleich unterschiedlicher Optionen zur Kompartimentisierung: spezifische Oberfläche, Druckverlust, Diffusionslänge, Wärmetransport und mechanische Stabilität. Die einzelnen Methoden werden untereinander verglichen. Pfeile zeigen den Trend und das anschließende Zeichen wertet den Trend (Zhu et al. 2020). Die letzte Spalte bezieht sich auf das Reaktorsystem, das in dieser Arbeit untersucht wurde.	20
Tabelle 1.2 Experimentelle Daten, die vom IBG-1 ermittelt und zur Verfügung gestellt wurden.	27
Tabelle 2.3 Unterschiedliche Mechanismus Terme D_r der Reaktion r für unterschiedliche Zeitgesetze. CM, DM, SM und FM sind von Liebermeister et al. definiert (Liebermeister et al. 2010). Die Terme für einen geordneten sequenziellen und Ping-Pong Mechanismus wurden hinzugefügt.	39
Tabelle 2.4 Angewandte Mechanismen und Inhibierungen der herrschenden Reaktionen. Allen Reaktionen wurde ein bis-bi-Mechanismus zugeordnet.	40
Tabelle 2.5 Gefittete kinetische Parameter der Cofaktor-Regeneration für den sequenziellen, zufälligen Mechanismus. Der zugehörige Vertrauensbereiche (95%) der Parameterschätzwerte ist angegeben. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- (k_+) und Rückreaktion (k_-) wurden aus k_v berechnet und hinzugefügt.	43
Tabelle 2.6 Schätzwerte für die kinetischen Parameter der zweistufigen Reduktion für einen geordneten, sequenziellen Mechanismus mit dem berechneten Vertrauensbereich. Die Werte mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind von dem ersten Reduktionsschritt übernommen.	44
Tabelle 2.7 Potentiale für unterschiedliche intramolekularer Wechselwirkungen mit grafischer Darstellung.....	49
Tabelle 2.8 Simulationsprogramme basierend auf BD und ihre Anwendung. Die Assoziation von zwei Proteinen wird mit P-P und von einem Substrat und einem Protein mit S-P abgekürzt.	53
Tabelle 2.9 Gemittelte direkte TGK, der beobachte AGK bezogen auf die indirekte Assoziation ($7,51 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Kapitel 2.4.4) bei einer NADPH Bulk-Konzentration von 0,5 mM und Anfangsreaktionsrate v_0 der ersten Reduktion für die Gre2 Kinetik, Konzentration aus Kapitel 2.3.3.....	65

Tabelle 3.1 Eigenschaften der superparamagnetischen Partikel Dynabeads M-280 nach Fonnum et al. (Fonnum et al. 2005): Partikeldurchmesser d_p , Standardabweichung des Partikeldurchmessers, Dichte ρ_p , Eisenanteil, magnetischen Suszeptibilität bezogen auf die Masse χ_m bzw. auf das Volumen χ_V , Sättigungsmagnetisierung M_0 und spontanen Magnetisierung M_s	73
Tabelle 3.2 Porosität unterschiedlicher Partikelschüttungen bzw. vergleichbarer kristalliner Strukturen: kubisch dichteste Packung (FCC), hexagonal dichteste Packung (HCP), kubisch raumzentrierte Packung (BCC), einer zufälligen Packung und einer kubisch regulären Packung (SC).....	77
Tabelle 3.3 Ergebnisse der Porositätsbestimmung der Partikelsimulationen für die Bereiche über dem Anfang des ersten Magneten (Bereich 1) und über der Mitte eines Magneten (Bereich 2). Berechnungsvolumen V_{calc} , gesamte Partikelvolumen $\sum V_p$, Bettporosität ϵ_{bed} und relative, durchschnittliche Überlappung der Partikel und korrigierte Porosität ϵ_{bed}^*	93
Tabelle 4.1 Reaktoreintrittskonzentrationen für den Standardfall. NADPH und NADP+ sind nicht im Gleichgewicht.....	104
Tabelle 4.2 Molekülmasse M_i und molekularer Diffusionskoeffizient D_i nach Wilke und Chang für die berechneten Komponenten. GDH(ST) liegt als Tetramer vor.	105
Tabelle 4.15 Bestimmte kinetische Parameterschätzwerten am freien Enzym (aus Tabelle 2.6) und gehemmten zweistufigen Reduktionsreaktion mit den entsprechenden Vertrauensbereichen (95%). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der beiden Stufen entsprechen den intrinsischen, kinetischen Parameterschätzwerte (*).	108
Tabelle 4.4 Reaktorkenngrößen für den Standardfall mit gehemmten, kinetischen Parametern: Verweilzeit τ_R , STY, Produktivität (bezogen auf einen Tag) und enzymatischer Nutzungsgrad.....	110
Tabelle 4.17 Überblick über den numerischen Aufwand und Genauigkeit der drei untersuchten Modelle. Dargestellt sind die untersuchten Längen, Anzahl der Gitterzellen, Rechenzeit und Abweichung von dem Fluent 3D Modell nach 1 mm.	120
Tabelle 5.1 CapEx für die unterschiedlichen Materialien im Reaktor in €/g.....	128
Tabelle 5.2 OpEx der Feed-Komponenten in €/g.	128
Tabelle 5.3 Charakteristische Größen für gelöste GDH und immobilisierte GDH mit gleicher Raumzeitausbeute. Dargestellt sind STY, Volumenstrom, Enzym-	

Nutzungsgrad, CapEx, OpEx, Produktkosten, Produktivität und TEP. Alle Werte sind bezogen auf eine Woche Betriebszeit..... 130

Tabelle 0.1 Kinetische Parameter der Cofaktor-Regeneration für unterschiedliche Mechanismen. Die Standardabweichung ist hinter den Zahlen angehängt. Die Aufsummierte Abweichung zu den experimentellen Werten ist im Residual aufgeführt. 175

Anhang

A1 Immobilisierungsmethoden

Im Folgenden werden die in den Experimenten verwendeten Immobilisierungsverfahren beschrieben. Eine detaillierte Übersicht ist in der Arbeit von Burgahn zu finden (Burgahn et al. 2020).

A1.1 Gre2 Immobilisierung

Die Immobilisierung der Gre2 wurde mit einem modifizierten Halo-Tag, dem HOB-Tag (engl.: *halo-based oligonucleotide binder*) umgesetzt. Der HOB-Tag ist ein Protein aus 297 Aminosäuren und wird über einen flexiblen GGGGS-Linker (Chen et al. 2013) mit dem zu immobilisierenden Enzym (Gre2) am N-Terminus fusioniert. Dadurch bildet sich ein Enzym-Tag Fusionsprotein (Gre2-HOB).

Um Gre2-HOB an einem Träger (z.B. Partikel, Molekülstruktur) muss auf dem Träger ein Chlorhexan vorhanden sein. Bei der Immobilisierung verbindet sich Chlorhexan (CH) unter Abspaltung eines Chlor-Ion an die Asparaginsäure (Asp₁₀₆ Aminosäure des HOB-Tag gebunden (Los et al. 2008). Das Chlor-Ion wird durch im immobilisierten Gre2-HOB Komplex an Wasserstoffatomen von Asparagin (Asn₄₁ Aminosäure) und Tryptophan (Trp₁₀₇ Aminosäure) des HOB-Tags gehalten. Das Reaktionsschema und die Bindekonfiguration sind in Abbildung A 1 dargestellt. Je nachdem an welcher Position auf dem Träger das CH gebundenen ist, kann das gewünschte Protein an spezifischen Stellen des Trägers gebunden werden.

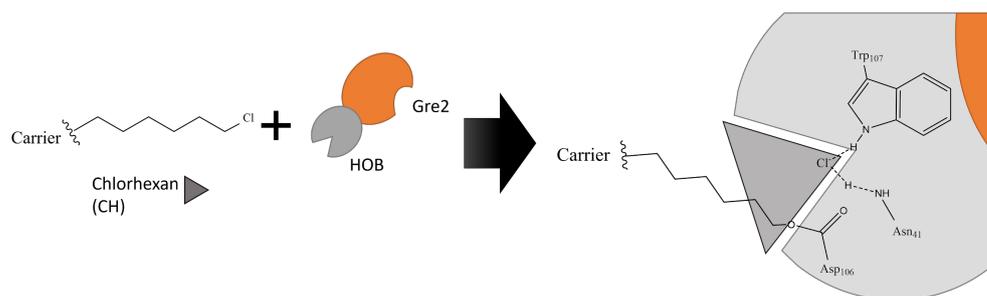


Abbildung A 1 Reaktionsschema der Funktionsweise der Immobilisierung eines Proteins mit dem HOB-Tag. Die beteiligten Atome des HOB-Tags (hellgrau, Aminosäuren Asn₄₁, Asp₁₀₆ und Trp₁₀₇) sind dargestellt.

A1.2 GDH Immobilisierung

Die Immobilisierung der GDH hat wie bei der Immobilisierung von Gre2 ein Tag und einen Gegenpart. Die GDH-Immobilisierung kann mit Hilfe eines Spy-Tags (ST) und einem Spy-Catcher (SC) realisiert werden. ST und SC werden durch ein Enzym des Bakteriums *Streptococcus pyogenes* gewonnen. Hieraus ergibt sich

die Abkürzung „Spy“. Die Fusionierung der tetrameren GDH mit dem ST wurde innerhalb der Aminosäure Kette eines GDH-Enzyms realisiert. Das Fusionsprotein (GDH(ST)) wies kleine Änderungen in der Konformation und vernachlässigbare Unterschiede in der Aktivität auf (Burgahn 2019).

Der SC und der ST gehen eine selbstständige Bindung ein. Eine Isopeptid-Bindung bildet sich der Asparagin Aminosäure des STs und dem Lysin (Lys₇₇ Aminosäure) des SCs aus. Das allgemeine Reaktionsprinzip der SC/ST Immobilisierungsmethode ist in Abbildung A 2 dargestellt.

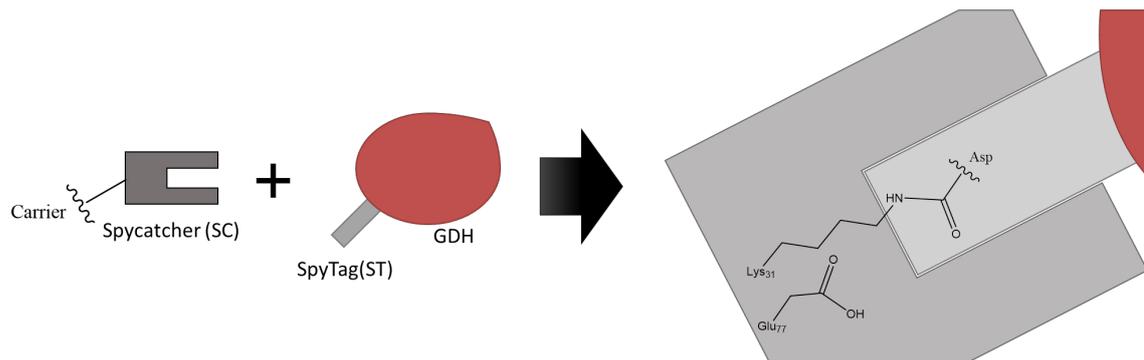


Abbildung A 2 Reaktionsschema der Immobilisierung mit ST/SC-Methode auf einem Träger. Die beteiligten Atome des Spy-Catchers (dunkelgrau, Residuen Lys₃₁, Glu₇₇) und des Spy-Tags (hellgrau, Asp Aminosäure) sind dargestellt.

A1.3 Enzymimmobilisierung auf Partikel

Die Immobilisierung dient im Flussreaktor der Positionierung und dem Festhalten der Enzyme. Die Immobilisierungsmethoden, beschrieben in Kapitel 2.2 werden genutzt, um Gre2 und GDH auf magnetischen Partikeln zu binden.

Das Fusionsprotein Gre2-HOB wird auf Streptavidin (STV) beschichteten magnetischen Partikeln (dynabeads 280) (Thermo Fischer 2020) gebunden, die vorher funktionalisiert werden. In Abbildung A 3 ist die Funktionalisierung und das anschließende Binden mit Gre2-HOB dargestellt. Die Partikel werden mit einem bifunktionellen Linker Btn-PEG-CH (Promega) zu STV-Partikeln funktionalisiert, die das Binden der Gre2 auf den Partikeln ermöglicht. Bei der Funktionalisierung geht das Btn des Linkers eine nicht kovalente Bindung mit dem STV ein.

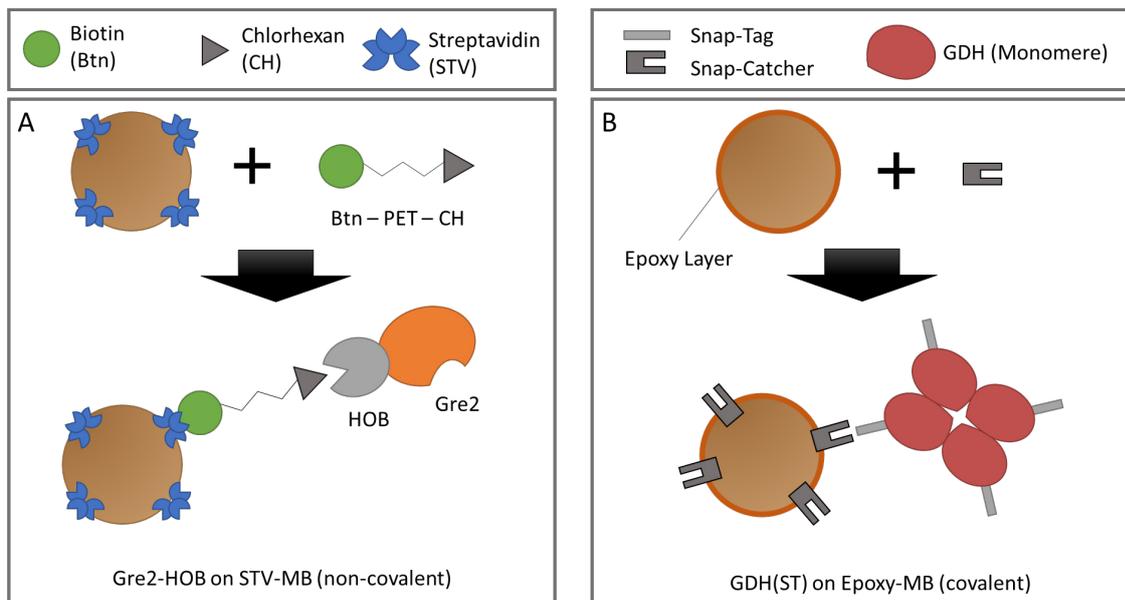


Abbildung A 3 Immobilisierungsprozess der Gre2 und GDH auf magnetischer Partikel. A: Die Funktionalisierung der STV-Partikel mit Btn-PEG-CH Linker mit anschließendem Binden der Gre2-HOB. (Abbildungen nach Burgahn) (Burgahn 2019) B: Binden des GDH(ST) Fusionsproteins an einen mit SC beschichtete Epoxy Partikel.

Die Immobilisierung von GDH ist auf magnetischen Partikeln mit einer Epoxy-Beschichtung durchgeführt worden. Die Epoxy Partikel wurden mit dem Spy-Catcher beschichtet und anschließend mit dem GDH-Tetramer beladen. Das modifizierte GDH-Tetramer geht bei diesem Vorgang eine kovalente Bindung mit dem zugehörigen Spy-Tag ein.

Die Bestimmung der Enzymbeladung der beiden magnetischen Partikel ist in Kapitel A14 dokumentiert und wurde von Teresa Burgahn und Sandra Kröll (IBG-1, Karlsruher Institut für Technologie) durchgeführt.

A2 Reaktionsmechanismus Untersuchung der Cofaktor-Regeneration Reaktion mit GDH

Da der Reaktionsmechanismus der Regenerationsreaktion nicht eindeutig in der Literatur beschrieben wurde, sind unterschiedliche Mechanismen auf die experimentellen Daten angewandt und verglichen worden. Die reversible Cofaktor-Regenerationsreaktion hat insgesamt sechs Parameter: vier Assoziationskonstanten K_M^i , Geschwindigkeitskonstante k_v und die Gleichgewichtskonstante K_{eq} . Mit Hilfe der Gleichgewichtskonzentration von NADPH in der Konzentrationsverläufe Abbildung 2.7 B wurde eine Gleichgewichtskonstante von 0,2 berechnet. Die restlichen intrinsischen kinetischen Parameter wurden mit einer über eine Globale Toolbox für alle Mechanismen aus Kapitel 2.3.2 ermittelt und in Tabelle A 1 zusammengefasst. Wie die kinetischen Parameter zeigen, können alle Mechanismen die Experimentellen Ergebnisse

abdecken. Jedoch weist der sequenziell zufällige Mechanismus den besten Fit (geringste Abweichung, Residuum) auf

Tabelle A 1 Kinetische Parameter der Cofaktor-Regeneration für unterschiedliche Mechanismen. Die Standardabweichung ist hinter den Zahlen angehängt. Die Aufsummierte Abweichung zu den experimentellen Werten ist im Residual aufgeführt.

Mechanismus	K_M^A [mM]	K_M^B [mM]	K_M^P [mM]	K_M^Q [mM]	k_v [1/s]	Residuum
CM (Seq. zufällig)	71.16	1.16	0.27	0.26	1.20	5.65E-05
DM	9.29	8.07	0.27	0.27	0.60	6.48E-05
SM	71.23	1.18	0.59	0.59	2.73	5.66E-05
PM	7.18	5.06	9.32	9.32	7.68	1.01E-04
FM	913.55	970.23	677.56	627.61	9.98E-09	8.57E-04
Seq. geordnet	19.01	0.27	2.33	0.27	2.08	5.71E-05
Ping-Pong	981.75	13.47	3.50	4.01	8.54	5.80E-05

A: Glucose; B: NADP+; P: GluAcid; Q: NADPH

A3 Trust-Region-Verfahren

Der Trust-Region Algorithmus ist eine Gradienten-basierte Vorgehensweise, die eine Zielfunktion f minimiert. Für die Minimierung wird an der aktuellen Stelle der Funktion der Verlauf der Zielfunktion mit einer vereinfachten Funktion q approximiert. Diese vereinfachte Funktion ist nur für einen benachbarten Bereich N der Zielfunktion gültig und wird auch Vertrauensbereich (engl.: *trust-region*) genannt. Die Minimierung der Zielfunktion kann nun auf die regional definierte, vereinfachte Funktion übertragen werden. Die Werte der vereinfachten Funktion werden für alle Nachbarn N in Hilfsschritten s minimiert.

$$\min_s [q(s), s \in N] \quad (\text{A1})$$

Der aktuelle Punkt wird verschoben ($x + s$). Falls $f(x) < f(x + s)$ wird der aktuelle Punkt nicht verschoben und der Vertrauensbereich N wird verkleinert.

Die vereinfachte Funktion hat im Allgemeinen eine quadratische Form mit den ersten zwei Termen einer Taylor-Reihe:

$$\min \left[\frac{1}{2} s^T H s + s^T g, \text{ sodass } \|Ds\| \leq \Delta \right] \quad (\text{A2})$$

Hier ist g der Gradient von f am Punkt x , H ist die Hesse-Matrix (symmetrische Matrix der zweiten Ableitung), D ist die Diagonalmatrix zum Skalieren und Δ ist ein positiver skalarer Wert.

A4 Proteindatenbank Dateiformate

Das gängigste Dateiformat zum Speichern von Kristallstrukturen von Proteinen ist das PDB-Format. Es gibt Aufschluss über die Benennung der einzelnen Aminosäuren und ihrer Atome und definiert C- und N-Terminus des Proteins. Eine Erweiterung des PDB-Formats ist das sogenannte PQR-Format, das zusätzlich Informationen der Partialladungen der Atome beinhaltet. Die Informationen beider Formate sind strikt nach Spalten einer Zeile sortiert und sind in Tabelle A 2 dargestellt.

Tabelle A 2 Darstellung der Informationen im PDB und PQR-Dateiformat.

PDB																			
Funktion	Model	Atom Nr.	Atom Name	Residue	Chain	Residue Nr.	X-Koordinate	Y-Koordinate	Z-Koordinate	Temperaturfaktor	Radiation	Element							
Spalten	1-4	7-11	13-16	18-20	22	23-26	31-38	39-46	47-54	61-66	73-76	77-78							
PQR																			
Funktion	Model	Atom Nr.	Atom Name	Residue	Chain	Residue Nr.	X-Koordinate	Y-Koordinate	Z-Koordinate	Ladung	Radiation								
Spalten	1-4	7-11	13-16	18-20	22	23-26	31-38	39-46	47-54	61-66	73-76								

A5 GeomBD Befehle

Nach dem Vorgehen in Abbildung 2.12 wird das Aufsetzen einer Simulation mit GeomBD mit den folgenden Befehlen durchgeführt. Die Parametrisierung der PDB-Dateien wird mit dem Python Skript „Parameterize.py“ durchgeführt. Die hinterlegten Parameter sind im Ordner „\$GeomBD/Parameter/“ hinterlegt. (\$GeomBD ist das Installationsverzeichnis vom GeomBD):

```
Parameterize.py -d [Parm.gbdp] -i [Molecule.PDB] -o [Molecule.PQR]
```

Mit den PQR-Dateien des Rezeptors und Liganden werden die Potentialgitter erstellt. Mit den Befehlen Gridder-EX, Gridder-ES und Gridder-LJ werden die entsprechenden Potentialfelder erzeugt. Die Einstellungen zur Gittererstellung wurden bei allen Fällen gleich gehalten. Die Standardeinstellungen (siehe Befehle) wurden genutzt. Die Ionenstärke des Lösungsmittels wurde nach der Konzentration des T-TEMg der Experimente gewählt (Ion-1: 0.025 M; Ion+2= 0.0125M).

```
Gridder-EX -r [Receptor.PQR] -o [Output] -n [N_THREADS] (-p [Padding=5A] -s [Spacing=1.0A] -x [RadiiScaling=1.0])
```

```
Gridder-ES -d [FF.gbdp] -r [Receptor.PQR] -l [Ligand.PQR] -o [Output] -n [N_THREADS] (-p [Padding=40A] -s [Spacing=0.5A] -q [[Ion+1](=0.001M), [Ion-1](=0.001M), [Ion+2](=0M), [Ion-2](=0M)])
```

```
Gridder-LJ -d [FF.gbdp] -r [Receptor.PQR] -l [Ligand.PQR] -o [Output] -n [N_THREADS] (-p [Padding=40A] -s [Spacing=0.5A])
```

Letztlich wird die Simulation über den „GBD“ Befehl gestartet.

```
GBD -i INPUT_FILE -l LOG_FILE -o TRAJ_FILE.pqr
```

In der Input Datei sind alle Informationen zur Umgebungsbedingung, Methoden, Bindeoptionen, Liganden Anzahl etc. definiert. Eine genaue Beschreibung der Input Datei ist auf <http://chemcha-gpu0.ucr.edu/geombd3/> zu finden. Die Simulationen wurden für eine Temperatur von 30°C und einer dynamischen Viskosität von 0,809 mPas für Wasser bei 30°C (Verein Deutscher Ingenieure 2013) durchgeführt.

A6 DON-Enzymkaskaden Erstellung

Für eine exakte und einfache Erstellung von DON-Enzymkaskaden wurde ein Python-Skript mit grafischer Oberfläche geschrieben (Abbildung A 4). Das Skript erstellt eine planare DON mit variablen Maßen. Die nötigen Moleküldateien sind unter DNA (DNA-Baustein), Rezeptor 1 (Rec_1), Rezeptor 2 (Rec_2) etc. anzugeben. Die Moleküle sollten im Voraus zur orthogonal auf der DON liegenden Achse ausgerichtet sein. Mit Hilfe des „Add“ Knopfes lassen sich weitere Rezeptoren hinzufügen. Die Maße der eingelesenen Moleküle sind neben deren Namen angegeben.

Basierend auf dem eingelesenen DNA-Molekül (PDB-Format) und den angegebenen Maßen verschiebt das Skript Kopien des DNA-Bausteins, sodass die angegebene Größe der DON erstellt wird. Wichtige Maße sind: Mesh Größe (engl.: *mesh size*), Abstand zwischen DON und Rezeptor (Dist R-DNA), Abstand vom Rand (Dist R-edge), Anzahl der Rezeptoren (# Receptors) und dem Abstand zwischen den Rezeptoren (Dist R-R); Alle Größen in Å ($10^{-10}m$). Über „Calculate Mesh“ wird nach den Größen ein interaktives Gitter erstellt. Über das (mehrfache) Klicken der Felder lassen sich an spezifischen Punkten der DON die Rezeptoren platzieren. In dieser Arbeit wurde standardmäßig die folgenden Größen genutzt: Mesh size: 500x1x500; Dist R-DNA: 10; Dist R-Edge:10; # Receptors: 2; Dist R-R 5.

Letztlich erstellt das Skript in einem neuen Ordner die verschobenen DNA und Rezeptor Moleküle und erstellt ein Bash-Skript „combinedDNA_XXX_XXX.sh“ im Ausgangsordner. Das Bash-Skript erstellt unterschiedliche kombinierte Supramoleküle: alle Moleküle (DON+Rec1+Rec2), nur die Rezeptoren (Rec1+Rec2). Somit kann der Einfluss der DON mit exakten Replika untersucht werden. Die Rotation der Rezeptoren ist nicht implementiert und muss im Vorhinein durchgeführt werden (z.B. mit dem Skript „pdb_rotate.py“ von GeomBD)

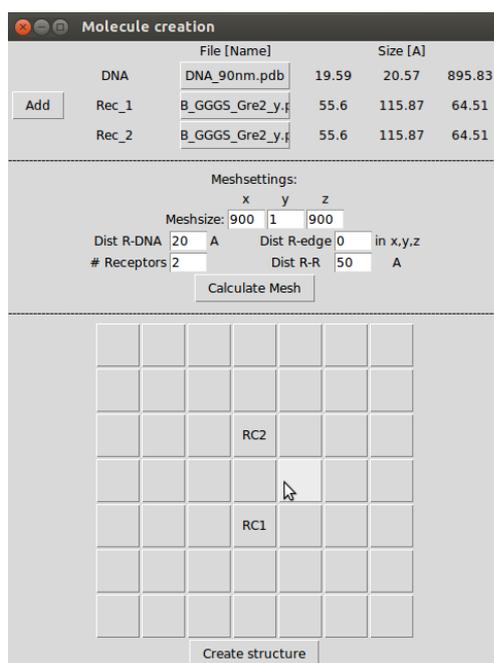


Abbildung A 4 Grafische Benutzeroberfläche zur Erstellung von DON-Enzymkaskaden mit mehreren Rezeptoren, basierend auf einem DNA-Molekül.

A7 Bildanalyse zu Partikelgrößenbestimmung

Die Partikelgröße ist mit Matlab[®] durch die Analyse der REM-Aufnahmen ermittelt worden. Das Vorgehen und die Ergebnisse sind in Abbildung A 5 dargestellt. Das REM-Bild wurde in Matlab eingelesen (A) und

danach mit einem Schwellenwert binarisiert (B). Mit der Matlab Funktion *imfindcircles* wurden anschließend Kreise in dem Bild ermittelt und ausgewertet (C). zum Schluss wurde eine Gauss'sche Normalverteilung auf die ermittelten Größen gefittet. Die Bildanalyse resultierte in einem durchschnittlichen Radius von $1,325 \mu\text{m}$ mit einer Varianz von $0,05 \mu\text{m}$.

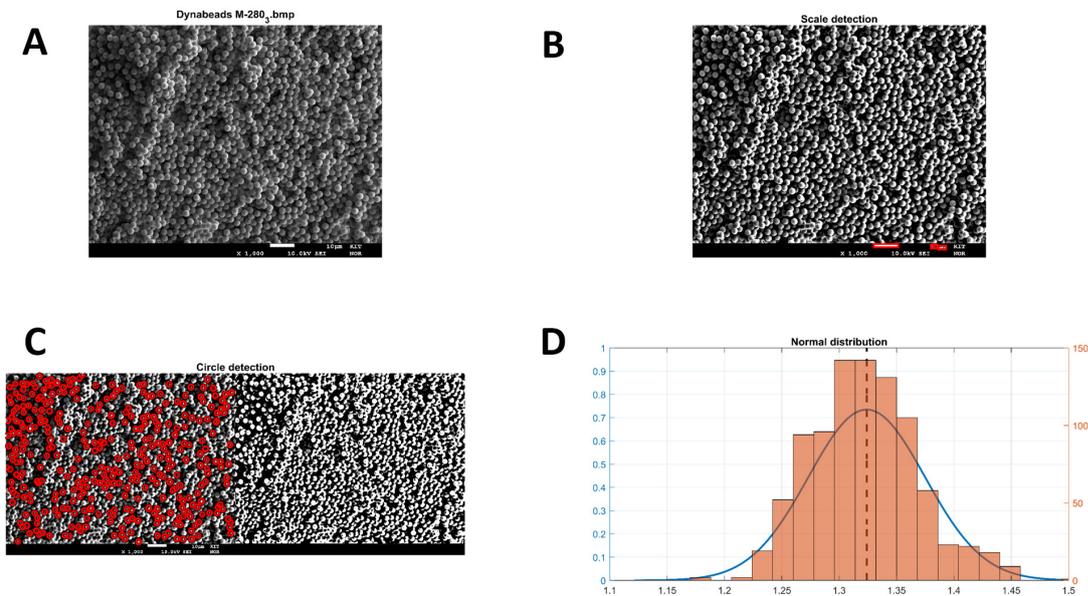


Abbildung A 5 Partikelgrößenbestimmung. A: REM-Bild; B: Binarisierung des Bildes; C: Ermittlung kreisförmiger Objekte mit erkannten Kreisen (rot); C: Darstellung der Normalverteilung und der Häufigkeit der ermittelten Kreise.

A8 Optische Partikelschichtanalyse

Die gebildete Partikelschicht im Mikroreaktor wurde mit Hilfe des 3D-Oberflächen Analysegerät Sensofar S neo (Sensofar 06.07.21) untersucht. Dafür wurde der Kanal standardgemäß befüllt und anschließend untersucht.

Die Konfokale Analyse ist eine hochauflösende Technik zur Charakterisierung von Materialien. Die Technik nutzt ein laserbasiertes System, bei dem ein schmaler Lichtstrahl auf die Oberfläche gerichtet wird, während ein Detektor das zurückgeworfene Licht erfasst. Die Technik ermöglicht es, dreidimensionale Informationen über die Höhenprofile und -verteilungen der Oberflächen zu gewinnen, indem das Licht nur an einem bestimmten Punkt der Oberfläche fokussiert wird.

Die Konfokale Analyse kann Schicht für Schicht durchgeführt werden, wodurch eine hohe räumliche Auflösung erreicht wird. Die Technik findet Anwendung in Bereichen wie Biologie, Materialwissenschaften und Halbleitertechnik, um Oberflächen zu charakterisieren. Die Vorteile der Konfokalen Analyse umfassen eine hohe Auflösung, eine minimale Probenstörung und eine gute Wiederholbarkeit der Messergebnisse.

Mit Hilfe der konfokalen Analyse wurde der Anfang und die Mitte des Partikelbetts untersucht. Eine Betrachtung des gesamten Kanals war nicht möglich, da der Reaktorchip aufgrund der Herstellungsmethode und der Einspannung auf der Messingplatte nicht komplett planar ist. Aus diesem Grund wurde sich auf kleinere Abschnitte des Partikelbetts konzentriert.

Die Messmethode wurde durch eine Erweiterung des Aufnahmebereichs um 50% in Bezug auf die Breite des Partikelbettes bzw. Kanals erweitert. Hierbei wurde die Oberfläche der Magnete als Bezugshöhe genutzt. Für eine präzise Fokussierung der Oberfläche der Partikelschicht war es erforderlich, einen spezifischen Höhenbereich zu wählen, der nicht mit der Decke des Reaktorkanals überlappt.

Nach der Aufzeichnung der Profilinformatoren wurden Artefakte (unphysikalische Spitzen) entfernt und die Daten auf die Bezugsebene (Magnetoberfläche) ausgerichtet. Um durchschnittliche Höhenprofile zu erstellen, wurden die Daten entweder in Flussrichtung des Kanals oder über die Aufnahmelänge gemittelt.

A9 Partikelsimulationssetup

Die Partikelsimulationen wurden mit der Software OpenLB (Krause et al. 2020) durchgeführt. In diesem Abschnitt sind die Einstellungen und Randbedingungen der einzelnen Rechnungen aus Kapitel 3.5 dokumentiert. Das beinhaltet das Aufsetzen eines Cases, die Implementierung des Magnetfeldes aus Comsol und das Postprocessing.

A9.1 Fallerstellung

Die folgenden Größen wurden für alle untersuchten und berechneten Fälle konstant gehalten. Dazu zählen die Partikeleigenschaften, die Größe und Positionierung des Berechnungsvolumens, der Bereich der Partikelgenerierung, Knotenabstand und Relaxationswert. Die Gesamtlänge der Berechnungen im Bereich 1 (Anströmung und Aufbau des ersten Partikelhaufens) am Anfang des ersten Magneten hat eine Länge von 2 mm, eine Breite von 50 μm und die Höhe 200 μm . Der Knotenabstand beträgt 2 μm , wodurch sich 305.000 Knoten ergeben. Die Partikeln wurden als homogen und uniform angenommen mit den Eigenschaften aus Kapitel 3.5.5. Die Partikeln werden in einem Volumen am Anfang des Berechnungsbereich zufällig erzeugt.

A9.2 Bestimmung der oberen Schichten einer Partikelmenge

Die Bestimmung von noch beweglichen Partikeln in einem Agglomerat ist über die Suche von benachbarter Partikel implementiert worden. Der maximale Abstand bei der Nachbarsuche wurde auf den doppelten Radius gesetzt (Abbildung A 6). Entscheidend für die Bestimmung der beweglichen Schichten ist die

Anzahl der Partikeln oberhalb ($\Delta y > 0$) des betrachteten Partikels. Ab einem Schwellenwert von 10 Partikeln oberhalb des betrachteten Partikels wird dieses als abgesetzt betrachtet. Der Schwellenwert wurde iterativ bestimmt. Mit dieser Methode werden manche Partikeln am Rand des Berechnungsvolumens nicht erfasst, sind jedoch durch ihre (bewegungslosen) Nachbarn gefangen. Der erhöhte Rechenaufwand wurde in Kauf genommen.

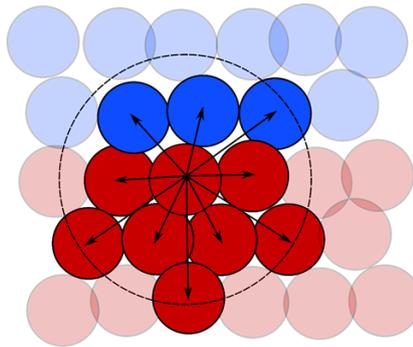


Abbildung A 6 Aufteilung der Partikeln für abgesetzte (rot) und bewegungsfreie Partikel (blau). Das Prinzip der Nachbarschaftssuche mit einem definierten Abstand der Mittelpunkte (gestrichelter Kreis) ist schematisch dargestellt.

A10 Abschätzung Bodenstein-Zahl

Für die Abschätzung der nötigen Segmentenanzahl für das pseudo 2D-Modell wurde mit Hilfe der Bodenstein-Zahl eine maximale Segmentenanzahl ermittelt. Anschließend wurde mit den Systemparametern aus Kapitel 4.4.1 die Auswirkungen von einer reduzierten Segmentenanzahl über die Austrittskonzentration von HK untersucht. In Abbildung A 7 ist die HK-Konzentration am Ende des Reaktors angegeben. Die aus Gleichung 4.21 berechnete Bodenstein-Zahl ist 12400 (6200 Elemente) in Bezug auf die Diffusionskonstante von NDK. Die Allgemeine Abweichung der HK-Konzentration beträgt unter 2,5%. Bei Segmentenanzahl unter 150 ist die Abweichung größer als 0,5 %. Der Rechenaufwand steigt linear mit der Anzahl der Segmente und ab 800 Elemente ist keine signifikante Veränderung des Umsatzes zu bemerken.

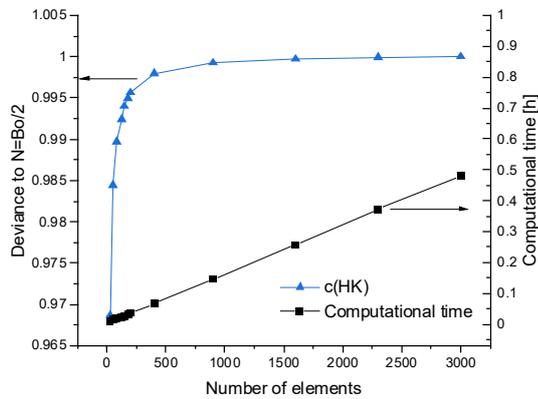


Abbildung A 7 Abweichung der Konzentration für unterschiedliche Segmenten Anzahl in Bezug auf die Austrittskonzentration mit 3100 Elementen und dem Rechenaufwand.

A11 Stationarität der Reaktorsegmente

Um eine stationäre Bedingung für das pseudo 2D-Modell zu untersuchen, wurde das Diffusionsverhalten von GDH(ST) gewählt. GDH(ST) hat die größte Molmasse und damit liegt nahe, dass es die Komponenten mit dem geringsten Diffusionskoeffizienten ist. Die Konzentration von GDH(ST) wurde für Betriebszeiten von 2 bis 4000 s (>1h) untersucht. Mit dem transienten pdepe-Solver von Matlab ergeben sich Konzentrationsverläufe im Partikelbett eines Segments nach Abbildung A 8. Da GDH(ST) keine Reaktionssinken im System hat, steigt die Konzentration, bis sie homogen im porösen Bett geringer ist. Die Konzentration ist nach 3000 s (unter 1 h) konstant im Bett. In den Experimenten wird der Reaktor mindestens drei Stunden, woraus i) eine konstante GDH-Konzentration im Partikelbett gewährleistet ist und ii), dass die Reaktionsbedingungen, unter Vernachlässigung von Desaktivierungsphänomen stationär ist

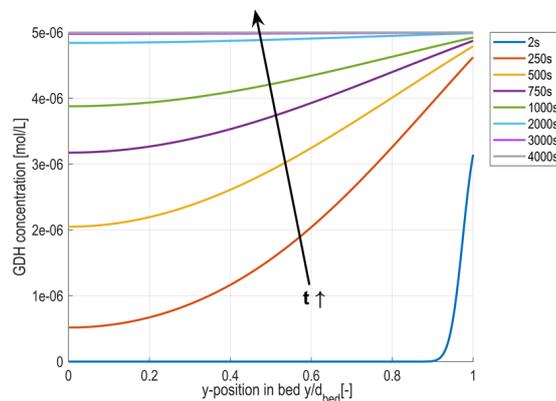


Abbildung A 8 Konzentrationsverläufe im Partikelbett eines Segments des pseudo 2d-Modell für Betriebszeiten zwischen 2 s und 4000 s.

A12 Zusätzliche Module des pseudo 2D-Modells

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über zusätzliche Module des im pseudo 2D-Modells. Aufgrund fehlender Informationen oder zeitlichen Gründen wurden diese in dieser Arbeit nicht genutzt. Die Module werden hier für einen zukünftigen Gebrauch dokumentiert:

Transiente Reaktorberechnung. Im Modell wurde die partielle Differentialgleichung (Gl. 4.15) und die Randbedingungen in das Format für den entsprechenden Solver in Matlab (pdepe) (The MathWorks, Inc. 2020) formatiert und implementiert. Dies ermöglicht die Berechnung des transienten Reaktorverhalten bei beliebiger Reaktorlaufzeiten. Wie schon in Kapitel 4.4.1 erwähnt und in Anhang A11 dargestellt sind die Reaktorlaufzeiten in den Experimenten so groß, dass die stationäre Lösung immer erreicht wird.

Inhomogene Partikelschicht. Die Partikelschicht ist als eine homogene, poröse Schicht mit konstanter Höhe angenommen. Diese Vereinfachung weicht von der realen Schicht ab (vgl. Kapitel 3). Aus diesem Grund wurde für das pseudo 2D-Modell ein Modul implementiert, das die Schichtdicke für jedes Segment ändern kann. Anhand einer analytischen Funktion oder Wertetabelle über die Höhe ($d_{bed}(x) = f(x)$) und Porosität ($\varepsilon(x) = f'(x)$) kann die Partikelschicht in Reaktorlaufrichtung x angepasst werden. So lassen sich Inhomogenitäten in der Höhe und Porosität abbilden.

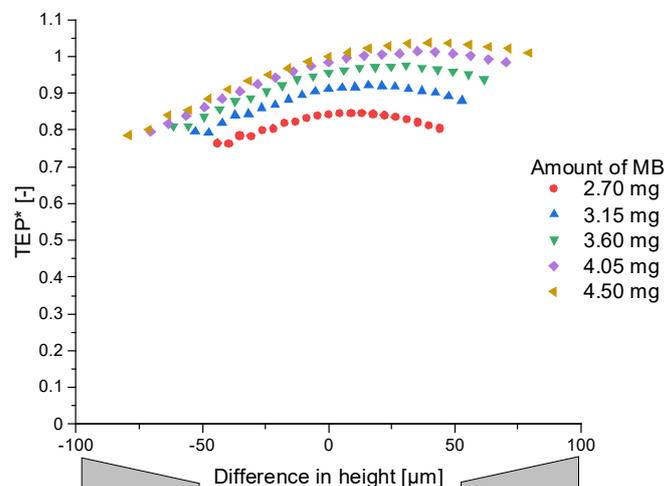


Abbildung A 9 Schichtdickenänderung mit abnehmender (links) und zunehmender (rechts) Schichtdicke für Partikelmengen von 2,7 mg bis 4,5 mg.

Ein Beispiel ist in Abbildung A 9 dargestellt, das eine normierte $TEP^* = \frac{TEP}{TEP_{standard}}$ (bezogen auf $MB = 4,5$ mg und planaren Schicht) für Schichten mit abnehmender oder zunehmender Schichtdicke für unterschiedliche Partikelmengen (MB) abbildet. Abhängig von der verwendeten Partikelmenge schwankt

die TEP^* um 10% ($MB = 2,7 \text{ mg}$) bis 25% ($MB = 4,5 \text{ mg}$) mit einem Maximum bei leicht dicker werdender Partikelschicht. Dieses Modul wurde in dieser Arbeit aufgrund von mangelnder Zeit nicht verwendet.

Komponentenrecycling. Das Recycling von Reaktorprodukten speziell der Cofaktor NADPH bzw. $NADP^+$ ist eine Methode zur weiteren Optimierung des Reaktorsystems. Die Abscheidung und Rückführung dieser Produkte ergeben sich technische Herausforderungen, die die Investitionskosten erhöhen, aber die Betriebskosten reduzieren können. In Abbildung A 10 ist das Recycling schematisch dargestellt. Technische Informationen wie der Abscheidungsgrad W , also wie gut sich NADPH und $NADP^+$ vom Produktstrom separieren lassen, sind für das Recycling sehr wichtig.

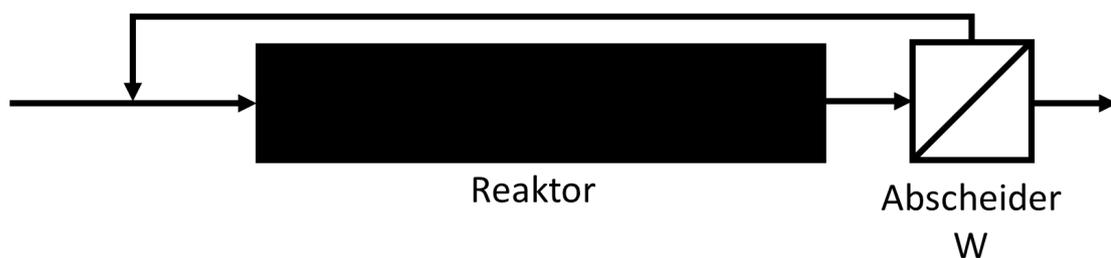


Abbildung A 10 Schematische Darstellung einer Rückführung mit Abscheider (Abscheidungsgrad W).

Unter der Annahme, dass NADPH und $NADP^+$ nicht altern bzw. ihre Reaktivität behalten wurde eine Rückführung mit frei wählbarem Trenngrad W in Matlab implementiert. Die Anwendung dieses Moduls überschritt den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit.

A13 FVM-Modell Anhang

Dieses Kapitel gibt einen kleinen Überblick über die Modelle in ANSYS Fluent. Das beinhaltet die Implementierung der mathematischen Beschreibung der Reaktionen und die Darstellung der Rechengitter und deren Besonderheiten.

A13.1 Kinetik-Implementierung

Um eine Multisubstratkinetik in Fluent zu implementieren, werden User-Defined-Function (UDFs) mit den entsprechenden kinetischen Gleichungen aus Kapitel 2.3.2 definiert und in Fluent eingelesen. Ein Satzreaktor Modell wird genutzt, um die richtige Berechnung in Fluent zu kontrollieren.

Das Einbinden der Kinetik kann entweder über die Makros „DEFINE_VR_RATE“ (volumetrische Reaktionsrate) oder „NET_REACTION_RATE“ (Komponenten spezifische Reaktionsrate) erfolgen. Bei der

volumetrischen Reaktionsrate werden die Reaktionsraten der einzelnen Reaktionen in der UDF definiert und die Zuordnung der netto Reaktionsraten der Komponenten wird über die in Fluent definierter Stöchiometrie zugewiesen. Fluent gewährleistet dadurch eine korrekte Stöchiometrie. Dies muss bei dem Makro „NET_REACTION_RATE“ vom Nutzer angegeben werden. Jedoch ermöglicht er die Nutzung des Stiff Chemistry Solvers. Der Stiff Chemistry Solver ist speziell für Systeme geeignet, in denen die Reaktionsrate im Vergleich zum vorliegenden Stofftransport sehr groß.

Die Unterschiede in der Berechnung mit beiden Makros sind in Abbildung A 11 dargestellt. Der Stiffchemistry Solver bewirkt eine genauere Berechnung der Konzentrationen und verbessert die Genauigkeit von 0,2245 % Abweichung zu 0,0012% Abweichung zu den in Matlab berechneten Daten. Aus diesem Grund wurde der Stiffchemistry Solver für alle Rechnungen angewendet.

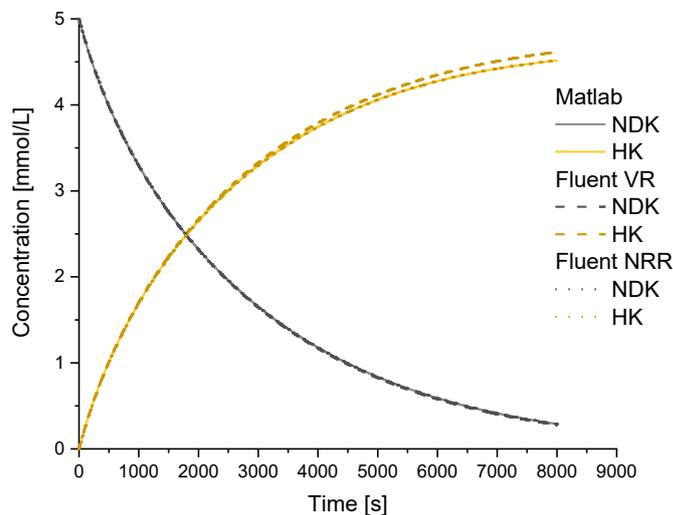


Abbildung A 11 Konzentrationsverläufe von NDK und HK für unterschiedliche Implementierungsmethoden in Fluent im Vergleich zu Matlab Berechnung. VR: Volumenrate (gestrichelt) NRR: Net Reaction Rate (gepunktet) und Matlab (durchgezogen)

Die UDF wird in Fluent mit dem Makro „NET_REACTION_RATE“ eingelesen. In der UDF müssen alle Reaktionsraten der Komponenten definiert werden. Zur Berechnung der Reaktionsraten greift der Stiff Chemistry solver auf die UDF zu. Der Stiff Chemistry Solver ist speziell für Systeme geeignet, in denen die Reaktionsrate sehr groß im Vergleich zum vorliegenden Stofftransport ist. In Abbildung A 12 sind die Konzentrationsverläufe für die Regenerationsreaktion (A) und des gesamten Reaktionssystems (B) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen sehr gute Übereinstimmung der Modelle und belegen dadurch eine korrekte Implementierung der Kinetik in Fluent.

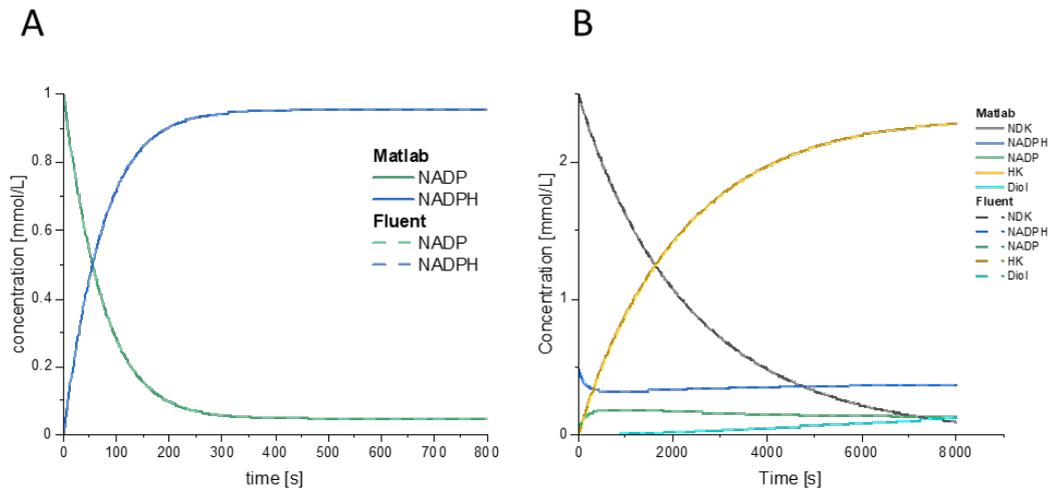


Abbildung A 12 A: Konzentrationsverlauf von NADP und NADPH der alleinigen Regenerationsreaktion im Vergleich zwischen Matlab und Fluent im Batchmodell. B: Konzentrationsverläufe des allgemeinen Reaktionssystems mit Cofaktor Regenerationsreaktion im Vergleich zwischen Matlab und Fluent im Batchmodell.

A13.2 Gittererzeugung

Die Erstellung des Gitters setzt sich aus zwei Bereichen zusammen: Das freie Reaktorvolumen V_{ec} und das Volumen der Packung V_{bed} . Die Höhe der Packung wird als konstant angenommen. Um Diskretisierungsfehler in der Berechnung der Transportgleichung zu vermindern, wurden ausgehend von einem einfachen Blockgitter regionale Verfeinerungen durchgeführt. Wie in Abbildung A 13 dargestellt wurden die Verfeinerungsbereiche in der Nähe von Wänden, der Phasengrenze zwischen poröser Schicht und freiem Kanal gewählt. Eine starke Verfeinerung wurde in Regionen mit sehr hoch erwarteten Reaktionsraten (an der Schichtoberfläche) durchgeführt.

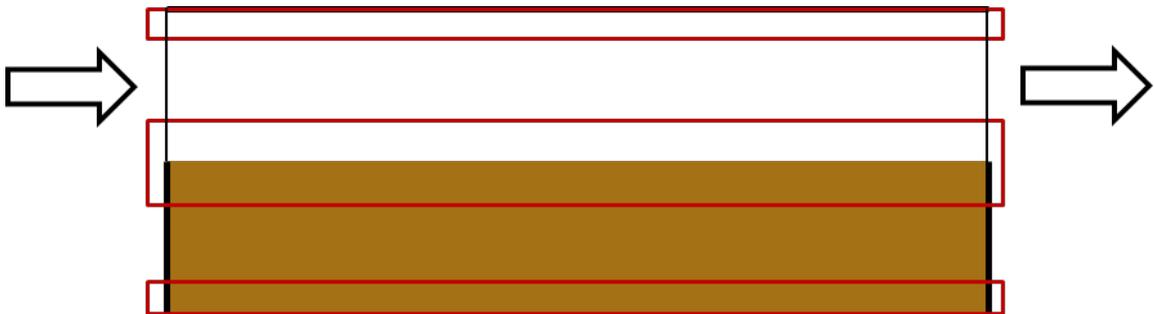


Abbildung A 13 Schematische Darstellung des Rechengitters mit regionaler Verfeinerung, gekennzeichnet in rot

A14 Bestimmung der Enzymbeladung der Partikel

Die Kapazität von Gre2 und GDH auf magnetischen Beads wurde aufgrund unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden separat bestimmt. Die Bestimmungen wurden gemäß Literatur durchgeführt (Peschke et al. 2017b).

Die Menge an Gre2-HOB auf den Magnetpartikeln wurde für nicht-kovalente STV-Btn abgeleitet. Bindungen zwischen CH-PEG-Btn und mit STV beschichteten Magnetpartikeln wurden durch Erhitzen der enzymfunktionalisierten Magnetpartikeln in SDS auf 95 °C aufgebrochen. Die Proben sowie Kalibrierungsproben mit definierten Mengen des entsprechenden gereinigten Proteins wurden mittels Standard-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Eine vergleichende Graustufenanalyse wurde mithilfe der Software ImageJ 1.48v durchgeführt. Die Enzymbeladung von Gre2 auf Streptavidin-Perlen wurde zuvor auf 24 pmol/g bestimmt (Burgahn et al. 2020).

Für kovalent gebundenes GDH (ST-His) wurde die Menge der Proteine auf den Magnetpartikeln mithilfe des verbleibenden Überstands nach dem Immobilisierungsprozess bestimmt. Der Überstand ungebundenem GDH (ST-His) wurde separiert und zusammen mit Kalibrierungsproben mittels Standard-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Eine vergleichende Graustufenanalyse ergab die Menge an nicht gebundenen Proteinen. Der Unterschied zwischen der eingesetzten Menge und der verbleibenden Menge an GDH führte zur Bestimmung der GDH-Enzymbeladung der Magnetperlen, die auf 55 pmol/mg bestimmt wurde.