

Institut für Biotechnologie

**Reaktionstechnik biokatalytischer
Prozesse am Beispiel der
kontinuierlichen enzymatischen Synthese
von N-Acetylneuraminsäure**

Udo Kragl

Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen enzymatischen Synthese von N-Acetylneuraminsäure

Udo Kragl

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Synthesen mit Biokatalysatoren.....	1
1.2	Aldolasen als Biokatalysatoren	2
1.3	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure, Vorkommen und Bedeutung.....	3
2	Problem, Ziel und Konzept für diese Arbeit.....	8
3	Synthese von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure aus <i>N</i> -Acetylmannosamin und Brenztraubensäure	
3.1	Einführung	12
3.2	Gleichgewichtslage der Reaktion	12
3.3	Das Enzym <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase	19
3.3.1	Vorkommen und Eigenschaften	19
3.3.2	Mechanismus und kinetisches Modell	20
3.3.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der Aldolase.....	29
3.3.4	Stabilität der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase	47
3.3.5	Einfluß der Viskosität des Reaktionsmediums auf die Aktivität der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase	50
3.4	Mutarotation von <i>N</i> -Acetylmannosamin, <i>N</i> -Acetylglucosamin und <i>N</i> -Acetylneuraminsäure.....	53
3.5	Kontinuierliche Produktion von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure ausgehend von <i>N</i> -Acetylmannosamin.....	58
3.5.1	Einführung	58
3.5.2	Modellrechnungen zur Ermittlung optimaler Prozeßbedingungen.....	59
3.5.3	Kontinuierliche Experimente zur Überprüfung der Modellrechnungen	67
3.5.3	Kontinuierliche Produktion von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure im 300-g-Maßstab	76
3.6	Zusammenfassung	80
4	Epimerisierung von <i>N</i> -Acetylglucosamin zu <i>N</i> -Acetylmannosamin	
4.1	Einführung	81
4.2	Mechanismus der Epimerisierung und Gleichgewichtslage.....	82
4.3	Das Enzym <i>N</i> -Acylglucosamin 2-Epimerase.....	84
4.3.1	Vorkommen und Eigenschaften	84
4.3.2	Kinetisches Modell.....	85
4.3.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der Epimerase	87
4.3.4	Stabilität der <i>N</i> -Acylglucosamin 2-Epimerase	102
4.4	Einsatz der <i>N</i> -Acylglucosamin 2-Epimerase im Enzym- Membran-Reaktor	104
4.4.1	Einführung und Stoffbilanzen.....	104
4.4.2	Durchführung und Ergebnisse der kontinuierlichen Versuche.....	105
4.5	Zusammenfassung	108

5	Einsatz des gekoppelten Enzymsystems zur Synthese von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure aus <i>N</i> -Acetylglucosamin und Brenztraubensäure	
5.1	Einführung	109
5.2	Gleichgewichtslage der Gesamtreaktion.....	110
5.3	Kinetische Untersuchungen.....	112
5.3.1	Inhibierung der Aldolase durch Mg^{2+} , ATP und <i>N</i> -Acetylglucosamin	112
5.3.2	Inhibierung der <i>N</i> -Acylglucosamin 2-Epimerase durch Pyruvat und <i>N</i> -Acetylneuraminsäure.....	113
5.4	Kontinuierliche Produktion von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure ausgehend von <i>N</i> -Acetylglucosamin.....	115
5.4.1	Einführung und Stoffbilanzen.....	115
5.4.2	Modellrechnungen zur Ermittlung günstiger Prozeßbedingungen.....	117
5.4.3	Kontinuierliche Experimente mit dem gekoppelten Enzymsystem.....	124
5.5	Zusammenfassung	129
6	Methoden zur Isolierung der gebildeten <i>N</i> -Acetylneuraminsäure	
6.1	Einführung	130
6.2	Trennung von <i>N</i> -Acetylmannosamin, <i>N</i> -Acetylneuraminsäure und Pyruvat	131
6.3	Trennung von <i>N</i> -Acetylglucosamin, <i>N</i> -Acetylmannosamin, <i>N</i> -Acetylneuraminsäure, Pyruvat und ATP.....	135
6.4	Zusammenfassung	139
7	Diskussion und Ausblick	
7.1	Vergleich der enzymatischen und basenkatalysierten Epimerisierung	140
7.2	Kostenbetrachtung.....	144
7.3	Ausblick	146
8	Zusammenfassung	148
9	Material und Methoden	
9.1	Analytische Methoden.....	149
9.1.1	Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	149
9.1.2	Gaschromatographie	151
9.1.3	Mg^{2+} -Bestimmung	152
9.1.4	Verschiedenes	152
9.2	Entsalzung der <i>N</i> -Acylglucosamin 2-Epimerase.....	153
9.3	Struktur des verwendeten polymergebundenen ATP.....	153
9.4	Anlage zur Produktisolierung.....	154
9.5	Basenkatalysierte Epimerisierung von <i>N</i> -Acetylglucosamin zu <i>N</i> -Acetylmannosamin	155
9.6	Liste der verwendeten Geräte und Chemikalien	156
10	Literatur	158
A	Anhang	
A1	Datenblatt zur <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase	169
A2	Datenblatt zur <i>N</i> -Acylglucosamin 2-Epimerase.....	172

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.2-1	Synthese und Spaltung von Neu5Ac durch Neu5Ac-Aldolase	3
Abb. 1.3-1	Struktur von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure	4
Abb. 1.3-2	Biosynthese der Neu5Ac	4
Abb. 1.3-3	Basisstruktur des Glycosidanteils in Glycoproteinen	5
Abb. 2.1-1	Zu berücksichtigende Elemente bei einer Prozeßentwicklung	9
Abb. 2.1-2	Konzept zur enzymkatalysierten Synthese von Neu5Ac	10
Abb. 3.2-1	Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^A	14
Abb. 3.2-2	Gleichgewichtsumsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratkonzentration	15
Abb. 3.2-3	Gleichgewichtsumsatz bei Zusatz verschiedener Erdalkalitionen und bei verschiedenen Substratkonzentrationen	17
Abb. 3.2-4	Gleichgewichtsumsatz und Aktivität der Aldolase als Funktion der Ca^{2+} -Konzentration	18
Abb. 3.3.2-1	Mechanismus der reversiblen enzymatischen Synthese von Neu5Ac	21
Abb. 3.3.2-2	Reaktionsschema des "ordered bi-uni"-Mechanismus	22
Abb. 3.3.3-1	pH-Abhängigkeit der Synthese und Spaltung von Neu5Ac	31
Abb. 3.3.3-2	Temperaturabhängigkeit der Synthese und Spaltung von Neu5Ac	32
Abb. 3.3.3-3	Volumenspezifische Aktivität der Aldolase für die Synthese als Funktion der Enzymkonzentration	33
Abb. 3.3.3-4	Ermittlung von kinetischen Parametern aus Messungen der An- fangsreaktionsgeschwindigkeit oder aus Satzreaktorversuchen	34
Abb. 3.3.3-5	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Synthese von Neu5Ac	37
Abb. 3.3.3-6	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Synthese von Neu5Ac (Ausschnitt)	37
Abb. 3.3.3-7	Restaktivität als Funktion der Gesamts substratkonzentration	38
Abb. 3.3.3-8	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Spaltung von Neu5Ac	39
Abb. 3.3.3-9	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Synthese von Neu5Ac bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen	39
Abb. 3.3.3-10	Massenspezifische Aktivität der Synthese von Neu5Ac	42
Abb. 3.3.3-11	Massenspezifische Aktivität der Spaltung von Neu5Ac	43
Abb. 3.3.3-12	Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Synthese von Neu5Ac	45
Abb. 3.3.4-1	Aktivität der Aldolase als Funktion der Zeit in Enzym- Membran-Reaktoren aus verschiedenen Werkstoffen	47
Abb. 3.3.4-2	Desaktivierungskonstanten der Neu5Ac-Aldolase in Gegenwart verschiedener Werkstoffe	48
Abb. 3.3.5-1	Dynamische Viskosität des Reaktionsmediums und Aktivität der Neu5Ac-Aldolase als Funktion der NaCl-Konzentration	51
Abb. 3.3.5-2	Aktivität der Neu5Ac-Aldolase als Funktion der dynamischen Viskosität	52
Abb. 3.4-1	Mutarotation von ManNAc (Reaktionsschema)	53
Abb. 3.4-2	Mutarotation von ManNAc	55

Abb. 3.4-3	Mutarotation von GlcNAc	55
Abb. 3.4-4	Modellrechnungen zum Einfluß der Mutarotation auf die Neu5Ac-Synthese bei unterschiedlichen Substrat- und Enzymkonzentrationen.....	57
Abb. 3.5.2-1	Umsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratzulaufkonzentration im kontinuierlichen Prozeß (Aldolase)	62
Abb. 3.5.2-2	Neu5Ac-, Pyr-Konzentrationen und Umsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratzulaufkonzentration	63
Abb. 3.5.2-3	Umsatz und Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der ManNAc-Zulaufkonzentration bei 2-fachem Pyr-Überschuß ohne Berücksichtigung des Konzentrationseinflusses	65
Abb. 3.5.2-4	Umsatz und Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der ManNAc-Zulaufkonzentration bei 2-fachem Pyr-Überschuß mit Berücksichtigung des Konzentrationseinflusses	65
Abb. 3.5.2-5	Umsatz als Funktion des Produktes aus Enzymkonzentration und Verweilzeit.....	66
Abb. 3.5.3-1	Fließbild der verwendeten Anlage für kontinuierliche Experimente.....	68
Abb. 3.5.3-2	Photographie des Enzym-Membran-Reaktors aus Polypropylen...	69
Abb. 3.5.3-3	Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Betriebspunkten bei [ManNAc] ₀ = 59 mM	73
Abb. 3.5.3-4	Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Betriebspunkten bei [ManNAc] ₀ = 339 mM	73
Abb. 3.5.3-5	Beweis der Reversibilität der Inhibierung durch hohe Substratkonzentrationen im kontinuierlichen Prozeß.....	75
Abb. 3.5.4-1	Photographie des 70-mL-Enzym-Membran-Reaktors	77
Abb. 3.5.4-2	Umsatz als Funktion der Zeit bei der Neu5Ac-Produktion im 300-g-Maßstab	78
Abb. 4.1-1	Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc	81
Abb. 4.2-1	Mechanismus der Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc	82
Abb. 4.3.3-1	pH-Abhängigkeit der enzymatischen Epimerisierung von GlcNAc	89
Abb. 4.3.3-2	Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Epimerisierung von GlcNAc	89
Abb. 4.3.3-3	Einfluß von ATP und Mg ²⁺ auf die Aktivität der Epimerase	91
Abb. 4.3.3-4	Konzentrations-Zeit-Verlauf der Epimerisierung von GlcNAc bei Zusatz von PEG-ATP und nativem ATP	92
Abb. 4.3.3-5	Einfluß von Mg ²⁺ auf die Aktivität der Epimerase	93
Abb. 4.3.3-6	Volumenspezifische Aktivität der Epimerase als Funktion der Enzymkonzentration	94
Abb. 4.3.3-7	Massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von GlcNAc	96
Abb. 4.3.3-8	Massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von ManNAc	96
Abb. 4.3.3-9	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Epimerisierung von GlcNAc	98
Abb. 4.3.3-10	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Epimerisierung von ManNAc ...	98
Abb. 4.3.3-11	Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Epimerisierung.....	100

IV Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 4.3.3-12	Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Epimerisierung von GlcNAc.....	101
Abb. 4.3.3-13	Berechnete Gesamtreaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Epimerisierung von GlcNAc	101
Abb. 4.3.4-1	Stabilität der Epimerase bei verschiedenen Temperaturen	103
Abb. 4.4.2-1	Einfluß der ATP- und Mg^{2+} -Konzentration auf den Umsatz im kontinuierlichen Prozeß (Epimerase).....	105
Abb. 4.4.2-2	Vergleich von experimentellen und berechneten Betriebspunkten der Epimerisierung von GlcNAc.....	106
Abb. 4.4.2-3	Reaktions- und Konvektionsterm für die Epimerisierung von GlcNAc	107
Abb. 5.1-1	Reaktionsschema zur enzymkatalysierten Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc.....	109
Abb. 5.2-1	Gleichgewichtsumsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratkonzentration (gekoppeltes System).....	111
Abb. 5.3.1-1	Inhibierung der Spaltung von Neu5Ac durch ATP	112
Abb. 5.3.1-2	Inhibierung der Neu5Ac-Aldolase durch GlcNAc.....	113
Abb. 5.3.2-1	Inhibierung der Epimerisierung von ManNAc durch Pyr und Neu5Ac	114
Abb. 5.3.2-2	Inhibierung der Epimerisierung von GlcNAc durch Pyr und Neu5Ac	114
Abb. 5.4.2-1	Neu5Ac-Ausbeute als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratzulaufkonzentration sowie der Enzymkonzentration im kontinuierlichen Prozeß (gekoppeltes System).....	118
Abb. 5.4.2-2	Neu5Ac-Ausbeute (= Pyr-Umsatz) als Funktion der Epimerase- und Aldolasekonzentration	119
Abb. 5.4.2-3	Veranschaulichung des Aktivitätsmolenbruches als Funktion der Epimerase- und Aldolasekonzentration	120
Abb. 5.4.2-4	Pyr-Umsatz als Funktion des Aktivitätsmolenbruches bei verschiedenen Gesamtaktivitäten	121
Abb. 5.4.2-5	Selektivität des GlcNAc-Umsatzes als Funktion des Aktivitätsmolenbruches bei verschiedenen Gesamtaktivitäten.....	122
Abb. 5.4.2-6	Umsatz im gekoppelten System als Funktion der Verweilzeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen.....	123
Abb. 5.4.2-7	Raum-Zeit-Ausbeute im gekoppelten System als Funktion der Verweilzeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen	123
Abb. 5.4.3-1	Umsatz U_{Pyr} als Funktion der Zeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Verweilzeiten (gekoppeltes System).....	126
Abb. 5.4.3-2	Konzentrationen als Funktion der Zeit für das gekoppelte Enzymsystem im kontinuierlichen Prozeß	127
Abb. 5.4.3-3	Vergleichende Darstellung der erzielten Konzentrationen bei Verwendung des gekoppelten Enzymsystems im kontinuierlichen Prozeß	128
Abb. 6.2-1	Chromatogramm zur Trennung von Neu5Ac, ManNAc und Pyr mittels Anionenaustauschchromatographie.....	132

Abb. 6.2-2	Enzymatisch hergestellte und durch Anionenaustausch- chromatographie isolierte Neu5Ac (Photo).....	134
Abb. 6.3-1	Chromatogramm zur Trennung von Neu5Ac und ATP mit einem Ameisensäuregradienten	136
Abb. 6.3-2	Chromatogramm zur Produktisolierung mit einem stufenförmigen Ammoniumformiatgradienten	138
Abb. 7.1-1	Vergleich von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der basen- und enzymkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc bei verschiedenen Substrat- und Enzymkonzentrationen	141
Abb. 7.1-2	Reaktionsgeschwindigkeiten der basen- und enzymkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc bei verschiedenen Substrat- und Enzymkonzentrationen	142
Abb. 7.1-3	Berechneter Konzentrations-Zeit-Verlauf der basenkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc.....	143
Abb. 7.2-1	Aufteilung der Kosten pro mol produzierte Neu5Ac auf die Enzym- und Substratkosten	146
Abb. 7.3-1	Enzymatische Synthese von 2-Keto-3-deoxy-D-manno- octulosonsäure mittels Neu5Ac-Aldolase	147
Abb. 9.1.1-1	HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Neu5Ac, Pyr, ManNAc und GlcNAc.....	149
Abb. 9.3-1	Struktur des mit der Epimerase verwendeten PEG-ATP	153
Abb. 9.4.1	Fließbild der Anlage zur Produktaufreinigung.....	154

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1-1	Anzahl bekannter und kommerziell erhältlicher Enzyme.....	1
Tab. 3.2-1	Bedingungen der Messungen zum Einfluß von Erdalkalitionen auf den Gleichgewichtsumsatz	17
Tab. 3.3.3-1	Optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese (1)....	31
Tab. 3.3.3-2	Substrat- und Enzymkonzentrationen der Satzreaktorversuche (Aldolase)	36
Tab. 3.3.3-3	Kinetische Konstanten der Neu5Ac-Aldolase	40
Tab. 3.3.3-4	Vergleich der aus thermodynamischen und kinetischen Parametern berechneten Gleichgewichtsumsätze	45
Tab. 3.3.3-5	Optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese (2)....	46
Tab. 3.3.4-1	Optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese (3)....	49
Tab. 3.4-1	Daten und Ergebnisse zur Mutarotation.....	56
Tab. 3.5.3-1	Daten zu den Betriebspunkten im kontinuierlichen Prozeß (Aldolase)	71
Tab. 3.5.3-2	Raum-Zeit-Ausbeute und produktmengenspezifischer Enzymverbrauch zur Aldolase-katalysierten Neu5Ac-Synthese.....	74
Tab. 3.5.3-3	Experimentelle Daten zur Neu5Ac-Produktion bei sehr hoher Substratkonzentration.....	75
Tab. 3.5.4-1	Experimentelle Daten zur Neu5Ac-Produktion im 300-g-Maßstab	78
Tab. 4.3.3-1	Gemessene Mg- und P-Gehalte der Epimerasepräparation und daraus berechnete Werte	90
Tab. 4.3.3-2	Kinetische Parameter der <i>N</i> -Acetylglucosamin 2-Epimerase	95
Tab. 4.3.3-3	Substrat- und Enzymkonzentrationen der Satzreaktorversuche (Epimerase).....	97
Tab. 5.4.3-1	Bedingungen der kontinuierlichen Experimente mit dem gekoppelten Enzymsystem.....	125
Tab. 5.4.3-2	Vergleich der experimentellen und berechneten Konzentrationen und Angabe der Raum-Zeit-Ausbeute für kontinuierliche Experimente mit dem gekoppelten Enzymsystem.....	125
Tab. 6.2-1	Bedingungen zur Trennung von Neu5Ac, ManNAc und Pyr mittels Anionenaustauschchromatographie.....	131
Tab. 6.3-1	pK _a -Werte von Neu5Ac, Pyr, ATP und Ameisensäure.....	135
Tab. 6.3-2	Bedingungen zur Trennung von GlcNAc, ManNAc, Neu5Ac, Pyr und ATP mittels Anionenaustauschchromatographie	137
Tab. 7.2-1	Aufstellung zur Kostenübersicht der enzymatischen Neu5Ac-Synthese nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren...	145
Tab. 9.1.1-1	Bedingungen zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC.....	150
Tab. 9.1.1-2	Retentionszeiten weiterer auf der HPLC getrennter Substanzen.....	150
Tab. 9.1.2-1	Trennbedingungen für die GC-Analytik.....	151
Tab. 9.1.2-2	Retentionszeiten zur GC-Analytik	151

Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen

Symbole

[A,B,C,P]	mol/L	Konzentration der Komponente A, B, C, P
A ₁	kat/g	massenspezifische Aktivität der Neu5Ac-Synthese
A ₂	kat/g	massenspezifische Aktivität der ManNAc-Synthese
A _M	kat/g	massenspezifische Aktivität
A _{max} ^B	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von ManNAc
A _{max} ^C	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von GlcNAc
A _{max} ^H	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Neu5Ac-Synthese
A _{max} ^R	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Neu5Ac-Spaltung
A _{rest}	%	Restaktivität
E _A ^C	J/mol	Aktivierungsenergie der Epimerisierung von GlcNAc
E _A ^H	J/mol	Aktivierungsenergie der Neu5Ac-Synthese
E _A ^R	J/mol	Aktivierungsenergie der Neu5Ac-Spaltung
F	-	Faktor zur Beschreibung der Aktivitätsabnahme der Aldolase als Funktion der Substratkonzentration
Δ H ₀ ^A	J/mol	Standardreaktionsenthalpie der Synthese von Neu5Ac
k _{α,β}	1/s	Geschwindigkeit der Mutarotation
k _B	1/s	Geschwindigkeitskonstante der GlcNAc-Epimerisierung
k _C	1/s	Geschwindigkeitskonstante der ManNAc-Epimerisierung
k _{des}	%/d	Desaktivierungskonstante
k ₁	L/(mol*s)	kinetische Konstanten, verwendet bei der Ableitung der Enzymkinetiken
K _{eq} ^A	L/mol	Gleichgewichtskonstante der Synthese von Neu5Ac
K _{eq} ^B	L/mol	Gleichgewichtskonstante der Epimerisierung
K _{eq} ^C	L/mol	Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion
K _{eq} ^{Kom}	L/mol	Komplexbildungskonstante des Ca ²⁺ -Neu5Ac-Komplexes
K _{eq} ^{Mut}	-	Gleichgewichtskonstante der Mutarotation
K _i ^A	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente A = Pyr (Aldolase)
K _i ^{As}	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente A = Pyr (Epimerase)
K _i ^B	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente B = ManNAc (Aldolase)
K _i ^{Ps}	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente P = Neu5Ac (Epimerase)
K _m ^A	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente A = Pyr (Aldolase)
K _m ^B	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente B = ManNAc (Aldolase)
K _m ^{Bs}	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente B = ManNAc (Epimerase)
K _m ^C	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente C = GlcNAc (Epimerase)
K _m ^P	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente P = Neu5Ac (Aldolase)
K _v	mol/L	"Inhibierungskonstante" zur Beschreibung des Konzentrationseinflusses (Aldolase)
R	J/(mol*K)	allgemeine Gaskonstante (8,31 J/(mol*K))
RZA	g/(L*d)	Raum-Zeit-Ausbeute
T	K	absolute Temperatur

U	-	Umsatz
U _{gl}	-	Gleichgewichtsumsatz
U _{Pyr, GlcNAc}	-	Umsatz für Pyr, GlcNAc
v	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit
v ₁	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese
v ₂	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Synthese
v ₃	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Synthese unter Berücksichtigung der Pyr- und Neu5Ac-Inhibierung
v ₄	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Bildung durch basenkatalysierte Epimerisierung
V _{max}	kat/L	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X _E	-	Aktivitätsmolenbruch der Epimerase
Y _{Pyr, GlcNAc}	-	Ausbeute für Pyr, GlcNAc
η	Pa*s	dynamische Viskosität
σ _{Pyr, GlcNAc}	-	Selektivität für Pyr, GlcNAc
τ	s, d	Verweilzeit

Abkürzungen

A	Pyr
Ara	Arabinose
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
B	ManNAc
C	GlcNAc
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CSTR	kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor
E	Enzym
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
ES	Enzym-Substrat-Komplex
EtOH	Ethanol
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Gl	Gleichung
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
H	Hinreaktion, Synthese von Neu5Ac
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap	Kapitel
KDO	2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonsäure
Man	Mannose
ManNAc	N-Acetylmannosamin
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
P	Neu5Ac
PEG	Polyethylenglycol
Pyr	Brenztraubensäure
R	Rückreaktion, Spaltung von Neu5Ac
UDP	Uridindiphosphat

1 Einleitung

1.1 Synthesen mit Biokatalysatoren

Der Einsatz von Biokatalysatoren für präparative Zwecke ist weltweit Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Inzwischen sind zahlreiche industrielle Verfahren etabliert, wobei die Biokatalysatoren in Form ganzer Mikroorganismen oder aufgereinigter Enzyme eingesetzt werden. Derartige Verfahren sind immer dann vorteilhaft, wenn optisch aktive Substanzen hergestellt oder umgesetzt werden sollen, oder aber sehr milde Reaktionsbedingungen erforderlich sind. Als Beispiele für den ersten Fall sollen hier nur die fermentative Gewinnung von natürlichen Aminosäuren und die Racematspaltung von Aminosäurederivaten zur Gewinnung von nicht-natürlichen Aminosäuren genannt werden (Elferink et al., 1991). Ein Beispiel für die Ausnutzung der milden Reaktionsbedingungen ist die Hydrolyse von Acrylnitril zu Acrylamid unter Verwendung ganzer Zellen von *Rhodococcus rhodochrous*. Nach diesem Verfahren werden inzwischen 30.000 Tonnen pro Jahr Acrylamid hergestellt (Yamada, 1991).

Eine umfassende Übersicht über den Einsatz von Biokatalysatoren für präparative Synthesen und in industriellen Prozessen ist in den folgenden, kürzlich erschienenen Arbeiten und der darin zitierten Literatur zu finden: Yamada et al., 1988; Davies et al., 1989; Crout et al., 1989; Seebach, 1990; Gais et al., 1990; Leuenberger, 1990; Gerhartz, 1990; Jones, 1986.

Von den über 2500 bekannten Enzymen sind etwa 15% kommerziell erhältlich. Die Aufteilung auf die einzelnen Enzymklassen ist in Tabelle 1.1-1 angegeben (Davies et al., 1989).

E.C.-Klasse	Enzymklasse	bekannt	kommerziell erhältlich
1	Oxidoreduktasen	650	90
2	Transferasen	720	90
3	Hydrolasen	636	125
4	Lyasen	255	35
5	Isomerasen	120	6
6	Ligasen	80	5

Tab. 1.1-1: Anzahl bekannter und kommerziell erhältlicher Enzyme

Für Biotransformationen mit isolierten Enzymen werden vor allem Hydrolasen eingesetzt. Zu dieser Klasse gehören die Lipasen und Esterasen sowie Proteasen und Glucosidasen (Crout et al., 1989).

Die Gruppe der Lyasen wird bisher nur wenig für Biotransformationen benutzt, obwohl zu dieser Klasse Enzyme gehören, die die enantioselektive C-C-Verknüpfung katalysieren (nur 2% der Veröffentlichungen (Crout et al., 1989)). Dieser

Reaktionstyp ist nach wie vor eine der Herausforderungen in der organischen Chemie (Morrison, 1983–1985; Seebach, 1990).

1.2 Aldolasen als Biokatalysatoren

Aldolasen, die zur Gruppe der C-C-Lyasen gehören (E.C.-Klasse 4.1.), sind zur *de novo* Synthese von Monosacchariden vielseitig verwendbar. Diese Synthesen zeichnen sich durch einen hohen Grad an Regio- und Enantio- bzw. Diastereoselektivität aus, der selten mit klassischen Synthesemethoden erreicht werden kann (Einsatz von Schutzgruppentechnik notwendig usw.).

Der Einsatz von Enzymen in der Synthese von Kohlenhydraten ist in Übersichtsartikeln zusammengefaßt worden (Stiller et al., 1990; Toone et al., 1989, Waldmann, 1991). Die Zahl neuer Aldolasen und neuer Anwendungen bereits bekannter Aldolasen erhöht sich jedoch ständig (Brockamp et al., 1990; Barbas et al., 1990; Fessner et al., 1991; Beisswenger et al., 1991).

Aldolasen sind als ubiquitär vorkommende Enzyme bereits seit längerem bekannt. Ihre Aktivität zur Umsetzung von Hexosen und den entsprechenden C₃-Bruchstücken wurde zum ersten Mal von Meyerhof et al. 1936 beschrieben. Obwohl inzwischen ca. 25 Aldolasen isoliert und teilweise auch charakterisiert sind, wurde bisher nur für zwei Aldolasen ihr synthetisches Potential umfassend untersucht:

- **Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase (E.C. 4.1.2.13)**
Diese Aldolase, die bisher aus Kaninchenmuskel gewonnen wurde, akzeptiert eine Vielzahl von Aldehyden als Carbonylkomponente, während als Methylenkomponente nur Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt wird.
Dieses Enzym kann u. a. zur Synthese von Vorstufen von Desoxynojirimycin und Desoxymannojirimycin verwendet werden, die als Glucosidase-Inhibitoren von Interesse sind (Wong et al., 1983; Ziegler et al., 1988; Bednarski et al., 1987; Straub et al., 1990).
Inzwischen ist ein entsprechendes Enzym aus *Staphylococcus carnosus* (Brockamp et al., 1990) sowie aus einem rekombinanten *Escherichia coli*-Stamm (von der Osten et al., 1989) isoliert worden, wobei die mikrobiellen Enzyme stabiler sind als das Enzym aus Kaninchenmuskel.
- **N-Acetylneuraminsäure-Aldolase (E.C. 4.1.3.3)**
Die Aufreinigung des Enzyms aus *Clostridium perfringens* und der Einsatz zur Synthese von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) wurde zum erstenmal 1958 beschrieben (Comb et al., 1958). *In vivo* katalysiert die Aldolase die reversible Spaltung von Neu5Ac in N-Acetylmannosamin (ManNAc) und Brenztraubensäure (Pyr) (Abbildung 1.2-1). Ab 1984 erschienen in regelmäßiger Folge Veröffentlichungen, die sich mit dem Substratspektrum dieses Enzyms und seiner möglichen präparativen Anwendungen befassen (Augé et al., 1984; Augé et al., 1990a (Zusammenfassung aller vorher erschienen Artikel); Bednarski et al., 1987; Kim et al., 1988; Simon et al., 1988). Während Brenztraubensäure als Methylenkomponente nicht ersetzt werden kann, können zahlreiche Zucker als Carbonylkomponente dienen.
- Auch dieses Enzym wird inzwischen mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli*-Stammes hergestellt (Uchida et al., 1984; Aisaka et al., 1987, 1991).

2 Einleitung

- Weitere Einzelheiten zu diesem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzym sind in Kapitel 3.3 zu finden.

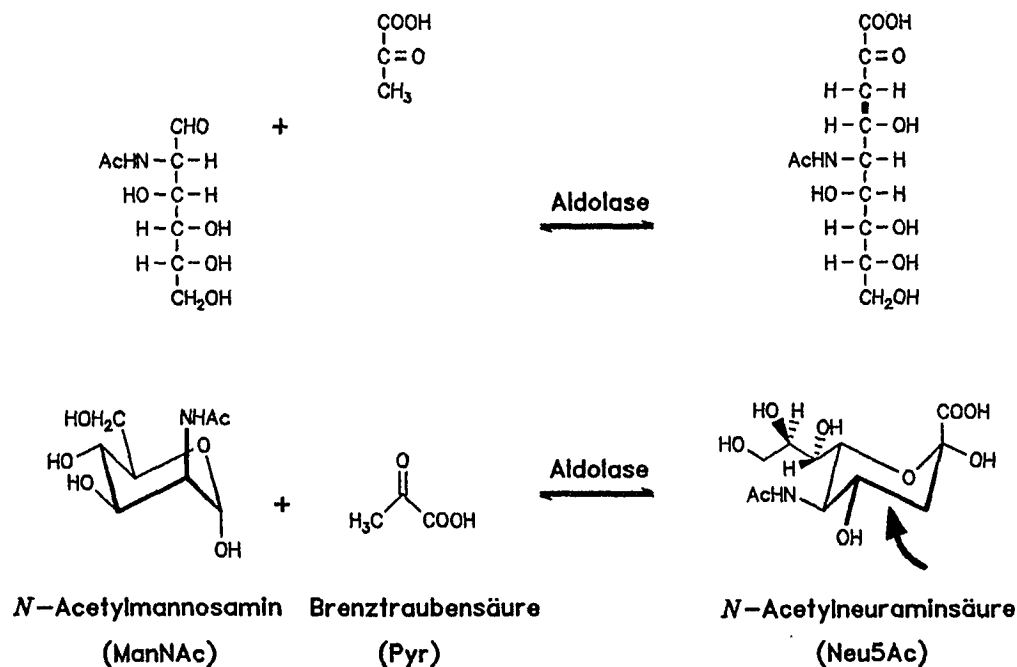


Abb. 1.2-1: Synthese und Spaltung von Neu5Ac durch Neu5Ac-Aldolase
(Die neu geknüpfte Bindung ist markiert)

Neben der nativen Form wurden beide Aldolasen in trägerfixierter Form eingesetzt, um eine mehrmalige Verwendung zu ermöglichen. Bednarski et al. (1987) schließen das Enzym in einen Dialyseschlauch ein und bringen diesen in das Reaktionsgefäß ein. Durch diese Form der Immobilisierung kann das Enzym ebenfalls mehrfach verwendet werden.

Ein kontinuierliches Verfahren wurde bisher nur für den Einsatz der Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase entwickelt (Bossow-Berke, 1989), obwohl derartige Verfahren zumindest in Bezug auf die Enzymausnutzung günstiger sind. Oft kann man jedoch auch Selektivitäten günstig beeinflussen, da Nebenreaktionen durch eine kontrollierte Einstellung optimaler Betriebsbedingungen unterdrückt werden können (Kragl et al., 1990; Schwarz, 1991).

1.3 *N*-Acetylneuraminsäure, Vorkommen und Bedeutung

N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), systematischer Name 5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonsäure, ist der bekannteste Vertreter der Sialinsäuren, einer speziellen Klasse von Aminosukern. Abbildung 1.3-1 zeigt die Struktur der Neu5Ac in den möglichen Schreibweisen. Freie Neuraminsäure, d. h. ohne *N*-Acetylgruppe, ist nicht beständig (Gielen, 1967). In wässriger Lösung

nimmt Neu5Ac die energetisch bevorzugte 2C_5 -Konformation ein, wobei über 90% als β -Anomer vorliegen (Jaques et al., 1977).

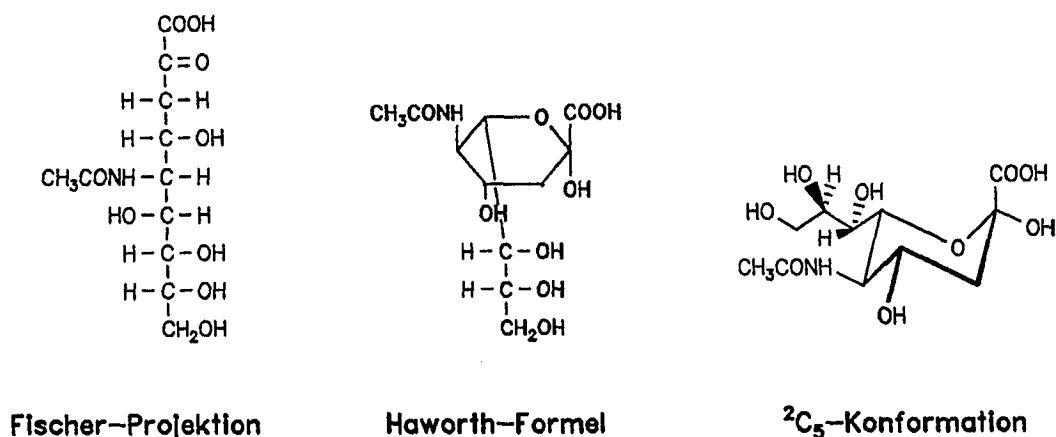


Abb. 1.3-1: Struktur von *N*-Acetylneuraminsäure (dargestellt ist das α -Anomer). (2C_5 -Konformation: Nomenklatur nach Reeves (Lehmann, 1976))

Die Biosynthese der Neu5Ac erfolgt aus ManNAc-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (Schauer, 1982a). Die in Abb. 1.3.2 dargestellte Reaktion wird durch die *N*-Acetylneuraminsäure-9-phosphat Synthetase (E.C. 4.1.3.20) katalysiert.

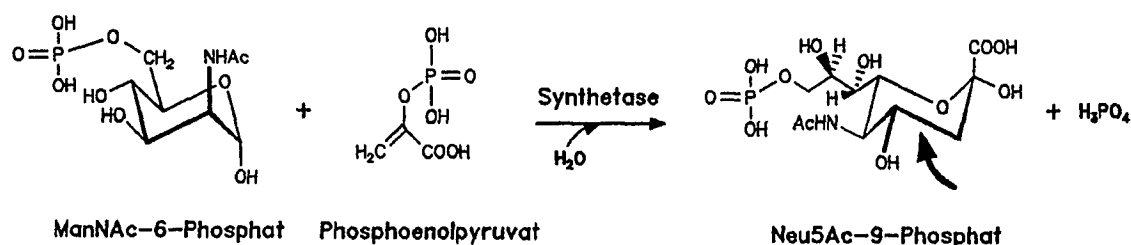


Abb. 1.3-2: Biosynthese der Neu5Ac aus ManNAc-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat; Enzym: *N*-Acetylneuraminsäure-9-phosphat Synthetase (Die neu geknüpfte Bindung ist markiert)

Die Derivate der Neuraminsäure, die sich in ihrem Acylierungsgrad und -muster unterscheiden, werden unter dem Oberbegriff Sialinsäuren zusammengefaßt. Die beiden griechischen Wortstämme (*sialon* = Speichel, *neuron* = Nervenzelle) deuten die Hauptvorkommen der Sialinsäuren an, von denen über 30 natürlich vorkommende bekannt sind (Reuter et al., 1988). Die ersten Sialinsäuren wurden 1936 von Blix aus "Submaxillarmucin", dem Glycoprotein der Unterkieferspeicheldrüse vom Rind, und 1941 von Klenk aus Nervengewebe in Reinform isoliert.

Über das Vorkommen, die Isolierung und Strukturaufklärung, Nachweismethoden, Biosynthese und die biologische Funktion gibt es zahlreiche ausgezeichnete Übersichtsartikel, wobei hier nur auf die wichtigsten und aktuellsten verwiesen sei: Schauer, 1982a,b; 1985; 1987; Schauer et al., 1988a; Schauer et al., 1988b; Schauer et al., 1990, DeNinno, 1991.

Im folgenden soll daher nur kurz die Bedeutung der Neu5Ac auch im Hinblick auf die vorliegende Arbeit beschrieben werden.

Sialinsäuren kommen vor allem in höheren Lebewesen vor, vereinzelt auch in Bakterien; in Pflanzen wurden sie bisher nicht gefunden. Sie besetzen die endständigen Positionen von Glycoproteinen und Glycolipiden, die eine wichtige Rolle bei biologischen Erkennungsprozessen spielen. In Glycoproteinen sind die Kohlenhydrateinheiten durch α -O-glycosidische Bindungen an Serin- oder Threonineinheiten der Peptidkette gebunden oder durch β -N-glycosidische Bindungen über die Amidgruppe von Asparagin (Paulsen, 1990). Bemerkenswert ist, daß trotz der Vielzahl vorkommender Glycoproteine die Bindung an die Peptidkette über eine gemeinsame Core-Struktur erfolgt, wie sie in Abbildung 1.3-3 dargestellt ist.

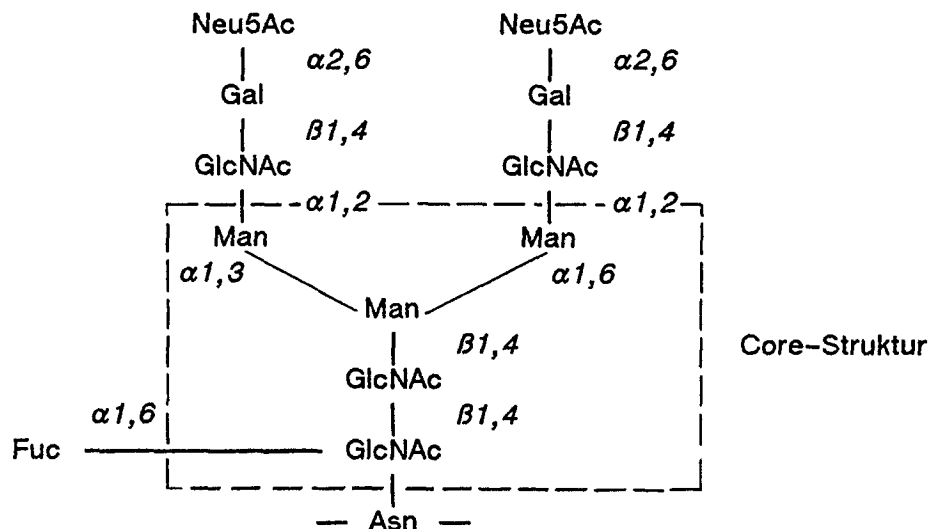


Abb. 1.3-3: Basisstruktur des Glycosidanteils in Glycoproteinen, wie sie z. B. auch in Interferon zu finden ist. GlcNAc ist durch β -N-glycosidische Bindung an die Amidgruppe von Asparagin gebunden

Neu5Ac ist in diesen natürlich vorkommenden Verbindungen immer α -glycosidisch über C-2 verknüpft (vgl. Abb. 1.3-1). Eine β -glycosidische Verknüpfung findet man nur in der mit Cytidin-5'-monophosphat aktivierten Neu5Ac.

Die freie Carboxylgruppe ist maßgeblich bestimmend für die Eigenschaften der Sialinsäure-haltigen Verbindungen. Sialinsäuren gehören als α -Ketosäuren mit pKa-Werten zwischen 1,8 und 2,6 zu den stärksten physiologischen Säuren. Sie liegen daher unter physiologischen Bedingungen als Anionen vor.

Das endständige Trisaccharid Neu5Ac-Gal-GlcNAc findet sich z. B. in Glycophorin A, einem Glycoprotein auf der Oberfläche von Erythrocyten. Ein Blutkörperchen besitzt auf seiner Oberfläche ca. $20 \cdot 10^6$ Sialinsäuremoleküle, die auf Grund ihrer negativen Ladung die Agglutination verhindern (Schauer, 1985).

Über die Maskierung von Bindungsstellen durch die Sialinsäurereste wird der Katabolismus von Glycoproteinen reguliert. Nach der Synthese werden mit zunehmendem Alter durch Sialidasen, die z. B. auf der Wand der Blutgefäße sitzen, die terminalen Sialinsäurereste abgespalten. Die dann freiliegenden Zuckerreste (z. B. Galactose) werden durch Asialoglycoproteinrezeptoren in der Plasmamembran von Leberzellen und der Milz gebunden und abgebaut. Ein entsprechender Prozeß führt auch zur Entfernung der gealterten Erythrocyten aus dem Blutstrom, wobei diese durch Makrophagen gebunden und abgebaut werden.

Die Sialinsäuren selbst dienen ebenfalls als Rezeptoren vor allem für Viren (Higa et al., 1985; Weis et al., 1988; Air et al., 1989).

Aus den vorhergehenden Ausführungen ergibt sich, daß die Sialinsäuren und im besonderen die *N*-Acetylneuraminsäure eine große Rolle *in vivo* spielen. Zur Aufklärung der Wirkmechanismen und potentiellen Nutzung im medizinischen Sinne wird dieses Gebiet weiterhin intensiv erforscht, wobei sich folgende Schwerpunkte abzeichnen:

- Synthese von Neu5Ac-Derivaten, die als selektive Inhibitoren von Enzymen (Sialidasen) und zur Blockierung von Bindungsstellen dienen können (Zbiral et al., 1987; Meindl et al., 1974).
- Synthese von Oligosacchariden mit natürlicher und nicht-natürlicher Sequenz, wobei als Substrat für Transferasen aktivierte Neu5Ac benötigt wird. In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten über die Synthese von Oligosacchariden publiziert worden, wobei es sich meist um Trisaccharide handelt (Sabesan et al., 1986; Thiem et al., 1986; Nilsson, 1988, 1989; Augé et al., 1990b; Unverzagt et al., 1990; Thiem et al., 1990; Stiller et al., 1990). Die Synthese von Oligosacchariden ist das Ziel eines durch die Europäische Gemeinschaft geförderten Projektes (Ellwood et al., 1990).
- Nutzung von Neu5Ac und Derivaten als Arzneimittel bei Erkrankungen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich (Ogasawara et al., 1988).

Für alle diese Anwendungen wird Neu5Ac als Reinsubstanz benötigt, die nach wie vor hauptsächlich aus tierischen Quellen isoliert wird. Als Rohmaterialien werden Kuhmilch (Fluka, 1991), Hühnereier (Juneja et al., 1991) oder aber chinesische Schwalbennester verwendet. Letztere haben einen besonders hohen Gehalt an Sialinsäuren (Czarniecki et al., 1977b), sind aber nicht immer in ausreichender Menge verfügbar (z. B. auf Grund von Importbeschränkungen, Zbiral, 1988). Vereinzelt wird inzwischen auch fermentativ hergestellte Neu5Ac angeboten, da bestimmte *E. coli*-Stämme ein aus Neu5Ac bestehendes Homopolymer bilden, das durch Säure hydrolysiert werden kann (Uchida et al., 1973).

Die in der Literatur beschriebene chemische Totalsynthese der Neu5Ac ist eher nach methodischen Gesichtspunkten zu bewerten, da sie mit aufwendiger Schutzgruppentechnik über 25 Stufen nur das racemische Produkt liefert (Danishefsky et al., 1988). Sie kann jedoch als Zugangsmöglichkeit für Derivate dienen, die z. B. durch die enzymatische Synthese nicht erhältlich sind (Baumberger et al., 1986).

Als weitere Methode bietet sich die enzymkatalysierte Synthese an (vgl. Abb. 1.2-1), da die erforderliche Aldolase mittlerweile preiswert und in ausreichenden Mengen verfügbar ist. Nachteilig bei diesem Verfahren ist der hohe Preis des als Substrat verwendeten ManNAc. Dennoch hat sich diese Methode zumindest im Labormaßstab etabliert (Lit. vgl. oben unter 1.2, Neu5Ac-Aldolase). Insbesondere können leicht Neu5Ac-Derivate hergestellt werden, indem entsprechende Substrate eingesetzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Optimierung der enzymkatalysierten Neu5Ac-Synthese beschrieben, wobei ein bisher in der Literatur vorgeschlagener Zugang zum erforderlichen ManNAc aus GlcNAc (Kim et al., 1988) verwirklicht werden konnte (Kragl et al., 1991a).

2 Problem, Ziel und Konzept für diese Arbeit

Als Alternative zur bisher üblichen Isolierung der Neu5Ac aus natürlichen Quellen ist die enzymatische Synthese im Labormaßstab inzwischen etabliert. Dabei wurde sowohl lösliche als auch durch kovalente Bindung auf einem Träger immobilisierte Neu5Ac-Aldolase eingesetzt (Augé et al., 1984; Kim et al., 1988). Die beschriebenen Verfahren weisen jedoch folgende Nachteile auf:

- Die Aktivitätsausbeute bei der Immobilisierung des Enzyms liegt bei etwa 50% (Augé et al., 1984; Pollak et al., 1980).
- Bei trägerfixierten Enzymen kann es zu Stofftransportlimitierungen kommen; diese treten auf, wenn das lösliche Enzym durch Einschluß in einem Dialyseschlauch immobilisiert wird (Bednarski et al., 1987; Simon et al., 1988).
- Auf Grund der eingesetzten geringen Enzymmengen dauerten die Umsetzungen bis zu 4 Tagen.
- Neben Puffersalzen wurden auch antibakterielle Mittel eingesetzt; alle diese Substanzen müssen bei der Produktisolierung abgetrennt werden.
- Um einen möglichst hohen Umsatz des teuren ManNAc zu erzielen, wurde ein 7- bis 10-facher Überschuß an Pyruvat verwendet. Das nicht umgesetzte Pyruvat erschwert die Produktisolierung (vgl. Kap. 6).

Bei einer Verbesserung des Verfahrens können die ersten vier der genannten Nachteile durch den Einsatz des Enzym-Membran-Reaktors (EMR) umgangen werden (Wandrey, 1977; Kula et al., 1987; Römpf, 1990; Kragl et al., 1991a):

- Enzyme können in homogen gelöster Form eingesetzt werden; Immobilisierungsverluste und Stofftransportlimitierungen treten in der Regel nicht auf.
- Im Reaktor können hohe Enzymkonzentrationen vorgelegt werden, so daß im kontinuierlichen Prozeß bei kurzen Verweilzeiten hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden können.
- Der EMR arbeitet als kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR) unter Auslaufbedingungen. Durch geeignete pH-Einstellung der Substratlösung kann im kontinuierlichen Betrieb auf Puffersubstanzen verzichtet werden.
- Sterile Prozeßführung ist möglich, indem der EMR mit einem vorgeschalteten Sterilfilter betrieben wird und vor Benutzung sterilisiert wird; antibakterielle Mittel sind nicht notwendig.
- Voraussetzung für den Einsatz des EMR ist allerdings eine ausreichende Stabilität der Enzyme unter Betriebsbedingungen. Hier bietet die kovalente Kopplung von Enzymen an Träger manchmal Vorteile, wenn sie zu einer Verbesserung der Stabilität führt (Hartmeier, 1986).

Die Elemente, die bei einer Prozeßentwicklung berücksichtigt werden müssen, sind schematisch in Abbildung 2.1-1 dargestellt. Unter einem Prozeß ist dabei im weitesten Sinne jede chemische Reaktion zu verstehen, die entweder kontinuierlich oder diskontinuierlich (batch) durchgeführt wird.

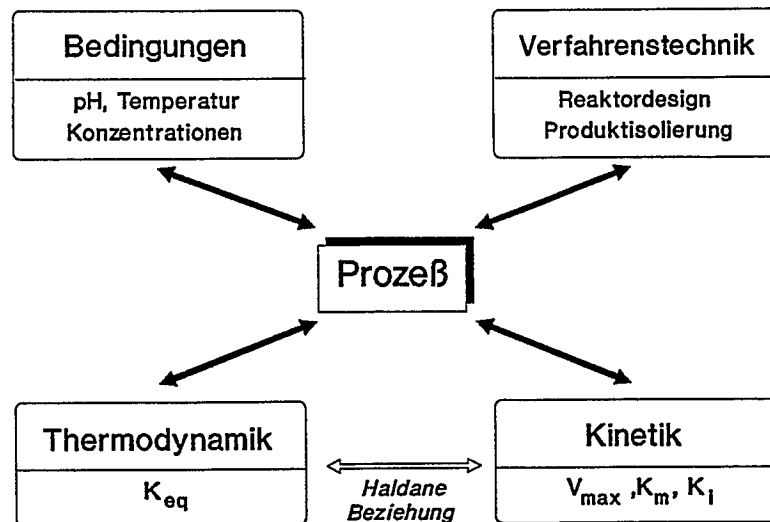


Abb. 2.1-1: Zu berücksichtigende Elemente bei einer Prozeßentwicklung

Durch die Thermodynamik wird die Gleichgewichtslage der Reaktion beschrieben, während die Kinetik die Geschwindigkeit, mit der z. B. der Gleichgewichtsumsatz erreicht werden kann, beschreibt. Durch die Haldane-Beziehung (vgl. Kap. 3.3.2) werden thermodynamische und kinetische Konstanten miteinander verknüpft. Sowohl Thermodynamik als auch Kinetik werden durch die gewählten Bedingungen (z. B. pH, Temperatur, Konzentrationen aller anwesenden Substanzen) beeinflusst. Durch die Verfahrenstechnik wird der für die betreffende Reaktion best geeignete Reaktor (Satzreaktor, kontinuierliches Verfahren, spezielle Entwicklungen) ausgewählt. Aber auch weitere Faktoren wie z. B. die Produktisolierung spielen eine wichtige Rolle. Erst die gleichzeitige Betrachtung und gegenseitige Abstimmung aller prozeßrelevanten Parameter führt zu optimalen Bedingungen, um das gewünschte Produkt möglichst effektiv herstellen zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, wie durch die Bearbeitung der einzelnen Elemente ein Prozeß zur enzymatischen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure entwickelt werden kann.

Ein wichtiger Punkt bei einer Verfahrensoptimierung ist durch die Gleichgewichtslage der Neu5Ac-Synthese in Verbindung mit dem relativ hohen Preis des ManNAc (38,20 DM/g, Sigma 1991; vgl. auch Tab. 7.2.1) gegeben. Daraus leitet sich die Forderung nach möglichst vollständigem Umsatz dieses Substrates oder aber nach alternativen Zugangswegen aus dem sehr viel preiswerteren *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) (0,98 DM/g, Fluka 1991) ab. ManNAc und GlcNAc unterscheiden sich durch die axiale oder äquatoriale Stellung der Acetamido-Gruppe an C-2. Bei einer Optimierung ergeben sich die folgenden Fragen:

- Welche Parameter beeinflussen den thermodynamisch möglichen Gleichgewichtsumsatz? (z. B. Temperatur, pH)

- Ist eine selektive Abtrennung der gebildeten Neu5Ac möglich, um das Gleichgewicht auf die Produktseite zu verschieben?
- Ist eine Optimierung (Reduzierung) des Pyruvat-Überschusses in Hinblick auf die Zielgrößen Umsatz und einfache Aufarbeitung möglich?
- Kann das benötigte ManNAc aus GlcNAc durch basenkatalysierte oder enzymatische Epimerisierung *in situ* erzeugt werden?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur enzymkatalysierten Synthese von Neu5Ac, mit dem die effektive Gewinnung von kg-Mengen möglich sein soll. Unter diesem Aspekt sind bei der Festlegung von Reaktionsbedingungen für die eigentliche Reaktion auch die Auswirkungen auf die nachfolgende Produktisolierung zu berücksichtigen.

Abbildung 2.1-2 zeigt schematisch das Konzept zur enzymkatalysierten Neu5Ac-Synthese mit den Punkten, die bei der Verfahrensentwicklung zu berücksichtigen sind.

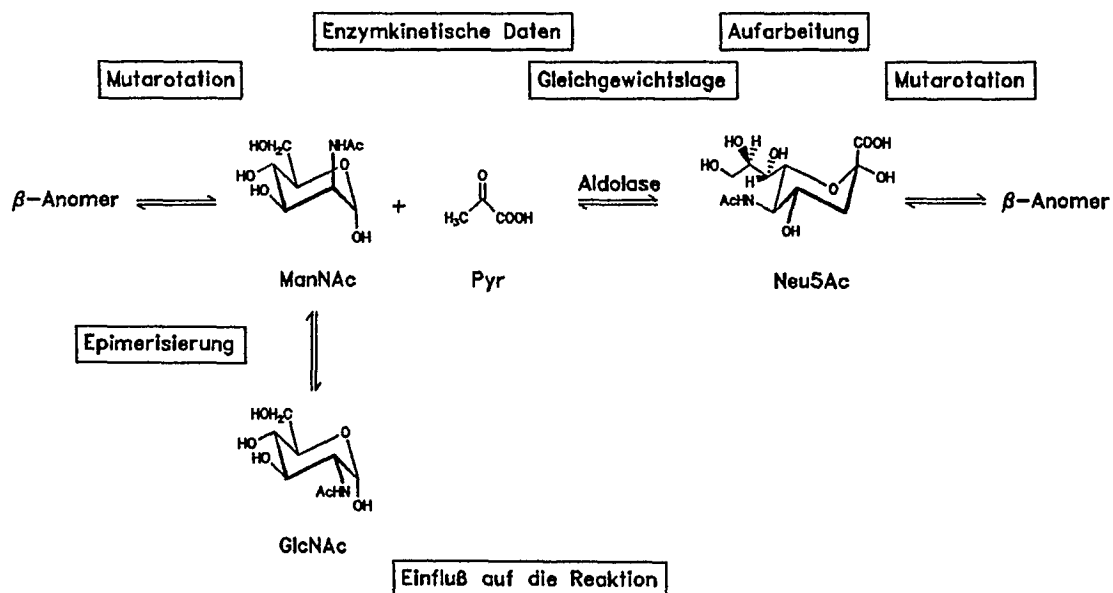


Abb. 2.1-2: Konzept zur enzymkatalysierten Synthese von Neu5Ac

Im folgenden sind die Schwerpunkte dieser Arbeit, die sich aus den vorhergehenden Ausführungen ergeben, noch einmal aufgelistet:

- Entwicklung leistungsfähiger analytischer Methoden zur Untersuchung der anstehenden Aufgaben.
- Gleichgewichtslage der beteiligten Reaktionen.
- Kinetik der beteiligten Reaktionen.
- Methoden zur Produktisolierung.
- *In situ*-Erzeugung von ManNAc.

- Untersuchung der Mutarotation der Zucker als vorgelagerte Gleichgewichtsreaktion.
- Modellrechnungen zur Ermittlung optimaler Betriebsparameter.
- Durchführung kontinuierlicher Produktionsversuche; Übertragung in einen größeren Maßstab.

Die Darstellung der zu diesen Punkten durchgeführten Untersuchungen und der gefundenen Ergebnisse erfolgt in den nächsten Kapiteln, wobei folgende Gliederung gewählt wurde:

- Optimierung der Neu5Ac-Synthese mit Neu5Ac-Aldolase ausgehend von ManNAc.
- *In situ*-Erzeugung von ManNAc, wofür ebenfalls ein enzymatisches Verfahren verwendet wird.
- Kopplung der beiden vorgenannten Reaktionen.
- Methoden zur Produktisolierung.

3 Synthese von Neu5Ac aus ManNAc und Brenztraubensäure

(ManNAc + Pyr $\rightarrow$ Neu5Ac)

3.1 Einführung

Die durch Neu5Ac-Aldolase katalysierte Addition von Brenztraubensäure an ManNAc liefert das eigentliche Zielprodukt Neu5Ac und steht daher im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Daher wurde zunächst diese Reaktion bezüglich ihrer thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften eingehend untersucht. Auf den Ergebnissen aufbauend wurde ein kontinuierliches Verfahren zur Synthese von Neu5Ac entwickelt, das auch zur Produktion im größeren Maßstab dienen kann. Die Untersuchungen sollten auch dazu beitragen, dieses enzymatische System besser kennenzulernen, da es durch Variation des Substrates ManNAc zur Synthese weiterer interessanter natürlicher und nicht-natürlicher Kohlenhydrate dienen kann (vgl. Kap. 7).

Bei der Festlegung der Reaktionsbedingungen wurde gleichzeitig auf eine möglichst einfache Produktisolierung geachtet (vgl. Kap. 6), worauf an den entsprechenden Stellen hingewiesen wird.

Im einzelnen wurden die folgenden Fragestellungen untersucht, deren Ergebnisse in diesem Kapitel dargestellt sind:

- Gleichgewichtslage – wie kann ein möglichst hoher Umsatz erzielt werden?
- Bestimmung der kinetischen Parameter der Aldolase.
- Untersuchungen zur Stabilität des Enzyms.
- Einfluß der Mutarotation von ManNAc und Neu5Ac als vorgelagerte Gleichgewichtsreaktion auf die enzymatische Umsetzung.
- Modellrechnungen zur Festlegung der optimalen Betriebsparameter der kontinuierlichen Versuche und experimenteller Beweis.
- Kontinuierliche Synthese von Neu5Ac im größeren Maßstab.

3.2 Gleichgewichtslage der Reaktion

Die Gleichgewichtskonstante der Synthese von Neu5Ac ist definiert durch Gleichung 3.2-1. In der Literatur sind für K_{eq}^A Werte zwischen 10,4 L/mol und 15,6 L/mol bei 37 °C angegeben (Comb et al., 1960; Brunetti et al. 1962; Uchida et al., 1984).

$$K_{eq}^A = \frac{[\text{Neu5Ac}]}{[\text{ManNAc}] * [\text{Pyr}]} \quad (3.2-1)$$

mit: K_{eq}^A L/mol Gleichgewichtskonstante der Synthese von Neu5Ac

Nach Einsetzen der Gleichungen 3.2-2 bis 3.2-6 in 3.2-1 ergibt sich als Lösung einer quadratischen Gleichung die Beziehung 3.2-7, mit der man aus der Gleichgewichtskonstanten und den Ausgangskonzentrationen der Substrate den möglichen Umsatz im Gleichgewicht U_{g1} berechnen kann. Da $U_{g1} \leq 1,0$ gelten

muß, liefert nur die Differenz ein physikalisch sinnvolles Ergebnis.

$$[\text{ManNAc}] = [\text{ManNAc}]_0 \cdot (1 - U) \quad (3.2-2)$$

$$[\text{Pyr}] = [\text{Pyr}]_0 - [\text{ManNAc}]_0 \cdot U \quad (3.2-3)$$

$$[\text{Neu5Ac}] = [\text{ManNAc}]_0 \cdot U \quad (3.2-4)$$

$$X = [\text{Pyr}]_0 / [\text{ManNAc}]_0 \quad (3.2-5)$$

$$Z = 1 + X + 1/([\text{ManNAc}]_0 \cdot K_{eq}^A) \quad (3.2-6)$$

$$U_{g1} = 0,5 \cdot Z \pm [(-Z)^2 / 4 - X]^{0,5} \quad (3.2-7)$$

mit: U_{g1} - Gleichgewichtsumsatz

Mit Hilfe von Gleichung 3.2-7 läßt sich auch erklären, warum bei bisher in der Literatur beschriebenen enzymatischen Synthesen von Neu5Ac ein 7- bis 10-facher Überschuß des billigeren Substrates Pyr verwendet wurde. Beispielsweise errechnet sich der folgende Gleichgewichtsumsatz, bezogen auf ManNAc, bei gegebenen Ausgangskonzentrationen:

$$K_{eq}^A = 15,6 \text{ L/mol} \quad (\text{Uchida et al., 1984})$$

$$[\text{ManNAc}]_0 = 0,1 \text{ mol/L} \quad \& \quad [\text{Pyr}]_0 = 0,1 \text{ mol/L} \quad ==> \quad U_{g1} = 0,46$$

$$[\text{ManNAc}]_0 = 0,1 \text{ mol/L} \quad \& \quad [\text{Pyr}]_0 = 0,7 \text{ mol/L} \quad ==> \quad U_{g1} = 0,91$$

Ein hoher Pyruvatüberschuß ist somit eine Möglichkeit, das teure ManNAc möglichst vollständig umzusetzen, erschwert aber die Produktisolierung durch Chromatographie auf Anionenaustauschern, da Neu5Ac und Brenztraubensäure als α -Ketosäuren etwa den gleichen pK_a -Wert um 2 besitzen (vgl. Kap. 6.3).

Auf Grund dieser Eigenschaften ist die selektive Abtrennung von Neu5Ac durch Ionenaustauschchromatographie oder Elektrodialyse nicht möglich, um dadurch beispielsweise bei Substratverhältnissen von 1:1 das Gleichgewicht auf die Produktseite zu verschieben. Die Elektrodialyse ist darüber hinaus auf Grund der großen Molekulargewichte (Pyr 88 g/mol, Neu5Ac 309 g/mol) als Trennmethode ungeeignet (Korngold, 1984; Spohn, 1988). Bei beiden Verfahren würde eher Brenztraubensäure als Neu5Ac aus dem Reaktionsmedium entfernt.

Drei weitere Möglichkeiten zur Verschiebung des Gleichgewichtes sollen im folgenden diskutiert werden:

- Einfluß der Temperatur.
- Einfluß der Gesamtkonzentration.
- Kopplung mit einer nachfolgenden Reaktion mit einer günstigeren Gleichgewichtslage.

Einfluß der Temperatur auf die Gleichgewichtslage

Abbildung 3.2-1 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^A , wobei die Untersuchung sowohl für die Spaltung als auch die Synthese mit verdünnten Lösungen erfolgte (Gesamtkonzentration $\leq 60 \text{ mM}$).

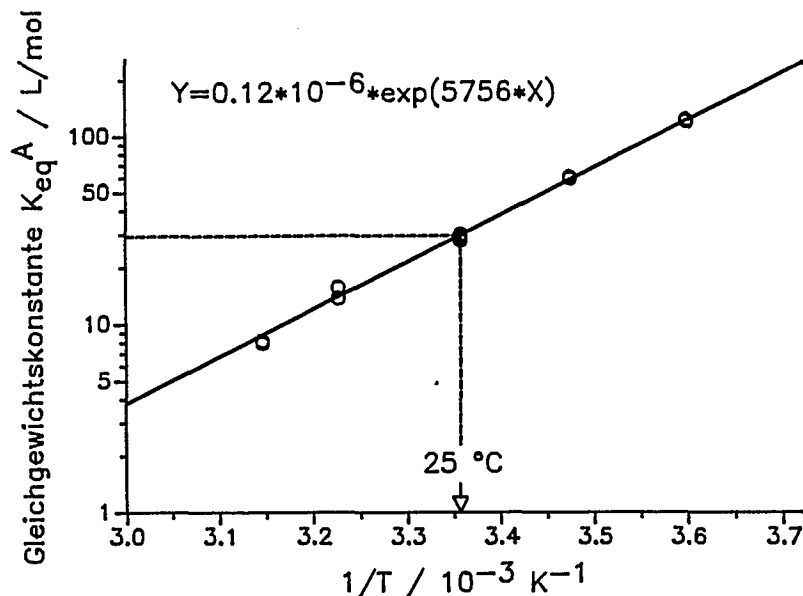


Abb. 3.2-1: Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^A
Bedingungen: pH 7,5

Die logarithmische Auftragung von K_{eq}^A gegen $1/T$ liefert eine Gerade, deren Steigung proportional zu ΔH_0^A ist. Der Zusammenhang ergibt sich durch die Integration der van't Hoffschen Reaktionsisobare (3.2-8) und ist in Gleichung 3.2-9 angegeben.

$$\frac{d(1n K_{eq}^A)}{dT} = \frac{\Delta H_0^A}{R \cdot T^2} \quad (3.2-8)$$

mit:	K_{eq}^A	L/mol	Gleichgewichtskonstante der Synthese von Neu5Ac
	T	K	absolute Temperatur
	R	J/(mol*K)	allgemeine Gaskonstante (8,31 J/(mol*K))
	ΔH_0^A	J/mol	Standardreaktionsenthalpie der Synthese von Neu5Ac

$$1n K_{eq}^A = - \frac{\Delta H_0^A}{R} * \frac{1}{T} \quad (3.2-9)$$

Damit erhält man aus der in Abbildung 3.2-1 angegebenen Regressionsgleichung:

$$\Delta H_0^A = - 47,8 \text{ kJ/mol.}$$

Mit $\Delta H_0^A < 0$ handelt es sich um eine exotherme Reaktion, bei der das Gleichgewicht durch eine Temperaturerniedrigung auf die Produktseite verschoben werden kann. Dieser Ansatz wurde auch zunächst verfolgt, da ein entsprechender Rückgang der Enzymaktivität prinzipiell durch höhere Konzentrationen ausgeglichen werden kann. Durch Vorversuche speziell im kontinuierlichen Prozeß (vgl. Kap. 3.5) konnte jedoch gezeigt werden, daß dieser Ansatz nicht zum Erfolg führt. Der prinzipiell höhere Gleichgewichtsumsatz bei 10 °C konnte trotz relativ hoher Enzymkonzentration und langer Verweilzeit nicht erreicht werden. Mit

steigender Enzymkonzentration besteht zudem die Gefahr, daß ein Teil des Proteins in einer katalytisch unwirksamen Konformation vorliegt. Ebenso könnte die Mutarotation der Zucker bei tieferen Temperaturen als vorgelagerte Gleichgewichtsreaktion geschwindigkeitsbestimmend werden.

Die weiteren Arbeiten wurden daher bei 25 °C und pH 7,5 durchgeführt. Diese Bedingungen erweisen sich auch unter dem Aspekt der Enzymaktivität und der Enzymstabilität als günstiger Kompromiß. Bei dieser Temperatur ergibt sich für die Gleichgewichtskonstante der Neu5Ac-Synthese:

$$K_{eq}^A = 29,36 \pm 0,41 \text{ L/mol} \quad (25 \text{ °C; pH } 7,5).$$

Einfluß der Gesamtkonzentration auf die Gleichgewichtslage

Bei Reaktionen des Typs $A + B \rightleftharpoons C$ steigt der erreichbare Gleichgewichtsumsatz mit zunehmendem Ausgangskonzentrationsniveau, da die Reaktion unter Molzahlverminderung abläuft. Quantitativ wird der Zusammenhang durch die oben angegebene Gleichung 3.2-7 beschrieben. In Abbildung 3.2-2 ist der erzielbare Gleichgewichtsumsatz als Funktion der Konzentration des Zweitsubstrates, das im Überschuß eingesetzt wird (hier Pyr), angegeben, wobei als Parameter die ManNAc-Konzentration variiert wird.

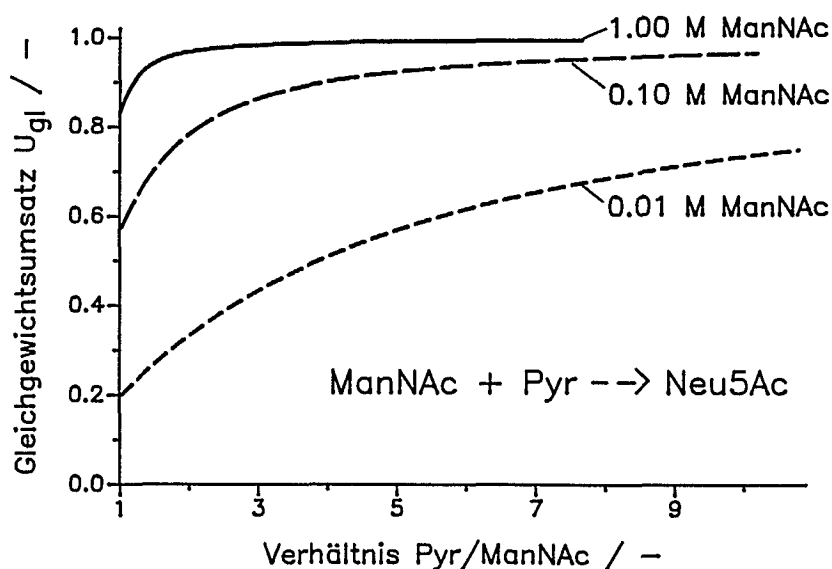


Abb. 3.2-2: Gleichgewichtsumsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratkonzentration
Bedingungen: pH 7,5; 25 °C; $K_{eq}^A = 29,4 \text{ L/mol}$

Man erkennt, daß bei einer ManNAc-Konzentration von 0,1 M bei einem zweifachen Pyruvatüberschuß bereits knapp 80% Umsatz erreichbar sind. Steigert man die ManNAc-Konzentration auf 1,0 M, so beträgt der Umsatz 97%. In der Praxis sind also bei hohen ManNAc-Konzentrationen bei nur doppeltem Überschuß an Brenztraubensäure hohe Umsätze erzielbar. Bei den später beschriebenen Berechnungen und Experimenten stellt sich eine ManNAc-Ausgangskonzentration von

etwa 0,3 M als günstig heraus, wobei ein Gleichgewichtsumsatz von etwa 90% erreicht werden kann.

pH-Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten

Eine pH-Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten wurde entgegen Literaturangaben (Baumann et al., 1989) nicht gefunden. Aus 10 Meßpunkten im pH-Bereich zwischen 4,3 und 9,1 wurde als Mittelwert für K_{eq}^A ein Wert von $29,22 \pm 0,41$ L/mol bestimmt. Dieser Wert stimmt im Rahmen der Meßgenauigkeit mit dem oben aus der Temperaturabhängigkeit bestimmten Wert überein. Eine pH-Abhängigkeit ist auch nicht zu erwarten, da Protonen nicht direkt an der Reaktion beteiligt sind (vgl. Abb. 1.2-1), und die beiden α -Ketosäuren Brenztraubensäure und Neu5Ac ähnliche pK_a -Werte um 2 besitzen.

Kopplung mit einer nachfolgenden Reaktion

Als weitere Methode zur Verschiebung des Gleichgewichts bietet sich die Kopplung mit einer Folgereaktion an, durch die Neu5Ac ständig dem Gleichgewicht entzogen wird. Diese Methode ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn das entstehende Produkt selbst interessant ist oder aber Neu5Ac leicht wieder freigesetzt werden kann. Ein Beispiel für den ersten Fall wäre die Synthese von mit Cytidin-5'-monophosphat aktivierter Neu5Ac (CMP-Neu5Ac), die für die Synthese von Sialyloligosacchariden benötigt wird. Da aber bereits die enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac auf Grund auftretender Produktinhibierungen und benötigter Effektoren sehr komplex und das Enzym bisher nicht in größeren Mengen verfügbar ist, erscheint dieser Ansatz wenig erfolgreich. Eine Methode, bei der Neu5Ac leicht wieder freigesetzt werden kann, ist die Komplexbildung mit zweiwertigen Kationen. Besonders Ca^{2+} bildet mit Neu5Ac einen 1:1-Komplex, wobei die Komplexbildung durch den Ringsauerstoff sowie verschiedene OH-Gruppen der Seitenkette und des Rings erfolgt (Behr et al., 1972; Jaques et al., 1977; Czarniecki et al., 1977a). Nur das β -Anomer bildet diesen Komplex. Die Komplexbildungskonstante K_{eq}^D wird in der Literatur angegeben zu:

$$K_{eq}^D = 121 \pm 5 \text{ L/mol} \quad (25^\circ \text{C}, \text{pH } 7,5).$$

Damit ist die Komplexbildung gegenüber der Neu5Ac-Synthese thermodynamisch begünstigt und sollte geeignet sein, das Gleichgewicht in gewünschter Weise auf die Produktseite zu verschieben.

Abbildung 3.2-3 zeigt den experimentell bestimmten Einfluß verschiedener Erdalkalitionen bei verschiedenen Konzentrationen auf den erzielbaren Gleichgewichtsumsatz. In Tabelle 3.2-1 sind die genauen Versuchsbedingungen angegeben. Der Zusatz von Ca^{2+} bewirkt nur bei niedrigen Substratkonzentrationen eine Erhöhung des möglichen Gleichgewichtsumsatzes, während bei $[\text{ManNAc}]_0 = 251$ mM eher eine Abnahme des möglichen Umsatzes mit steigender Ca^{2+} -Konzentration beobachtet wird. Es ist jedoch anzumerken, daß die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung mit HPLC bei sehr hohen Ca^{2+} - und Pyruvatkonzentrationen

trationen auf Grund starker Schwankungen der Basislinie abnimmt. Mit Magnesium und Barium treten nur geringe Veränderungen auf, so daß hierfür keine weiteren Messungen durchgeführt wurden.

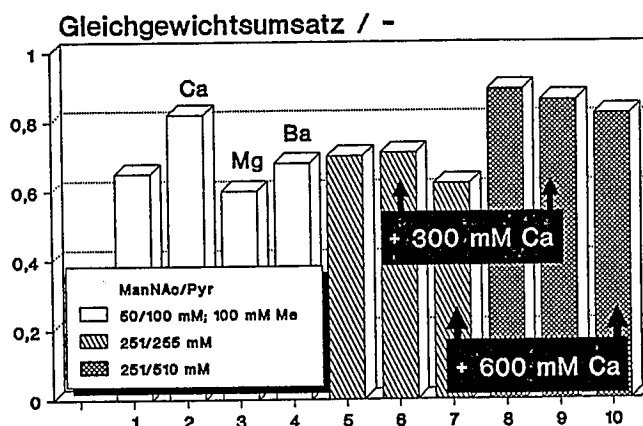


Abb. 3.2-3: Gleichgewichtsumsatz bei Zusatz verschiedener Erdalkalitionen und bei verschiedenen Substratkonzentrationen
Bedingungen: pH 7,5; 25 °C; bei 50 mM ManNAc/100 mM Pyr je 100 mM MeCl₂; der erste Balken jeder Gruppe wurde ohne Zusatz gemessen (Kontrolle); die Ziffern geben die in der Tabelle aufgelistete Versuchsnummer an

Versuch Nr.	[ManNAc] ₀ mM	[Pyr] ₀ mM	[Erdalkali] mM	U ₉₁ -
1	50	100	0	0,65
2	50	100	Ca ²⁺ 100	0,82
3	50	100	Mg ²⁺ 100	0,60
4	50	100	Ba ²⁺ 100	0,68
5	251	255	0	0,70
6	251	255	Ca ²⁺ 300	0,71
7	251	255	Ca ²⁺ 600	0,62
8	251	510	0	0,89
9	251	510	Ca ²⁺ 300	0,86
10	251	510	Ca ²⁺ 600	0,82

Tab. 3.2-1: Bedingungen der Messungen zum Einfluß von Erdalkalitionen auf den Gleichgewichtsumsatz
Bedingungen: pH 7,5; 25 °C

Neben dem Gleichgewichtsumsatz wurde auch die Aktivität der Aldolase beim Zusatz von Ca²⁺ untersucht. In Abbildung 3.2-4 sind die Ergebnisse dargestellt. Während der mögliche Umsatz um etwa 20 % steigt, sinkt die Enzymaktivität auf

40 % bei 400 mM Ca^{2+} ab. Bei höheren Substratkonzentrationen entfällt der Umsatzzuwachs, so daß eine Zugabe von Calcium nur Nachteile bringt. Die zugegebenen Calciumsalze müßten zudem bei der Produktisolierung abgetrennt werden. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

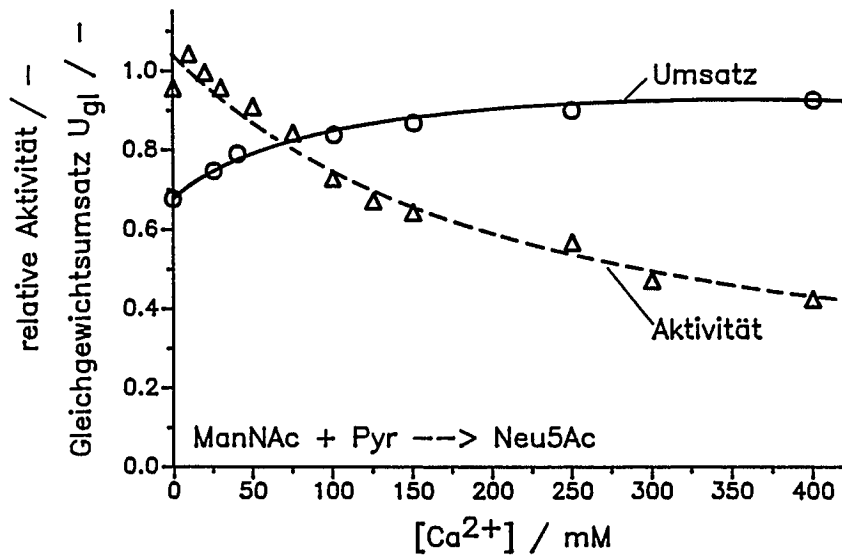


Abb. 3.2-4: Gleichgewichtsumsatz und Aktivität der Aldolase als Funktion der Ca^{2+} -Konzentration
Bedingungen: Aktivität 200 mM ManNAc, 25 mM Pyr, 25 $\mu\text{g/mL}$ Aldolase; Umsatz 50 mM ManNAc, 93 mM Pyr, 1,08 mg/mL Aldolase; pH 7,5; 25 °C

Zusammenfassung

- Die Gleichgewichtskonstante der Neu5Ac-Synthese wurde zu $K_{eq}^A = 29,4$ L/mol bestimmt.
- Die beste Möglichkeit zur Verschiebung des Gleichgewichts auf die Produktseite ist die Verwendung möglichst hoher Konzentrationen; der Pyruvatüberschuß kann dadurch auf den Faktor 2 begrenzt werden.
- Eine selektive kontinuierliche Produktabtrennung durch Chromatographie und Elektrodialyse ist nicht möglich.
- Die Komplexierung der Neu5Ac mit Ca^{2+} ist zwar thermodynamisch günstiger, der erzielbare Umsatzgewinn speziell bei hohen Konzentrationen rechtfertigt aber im Hinblick auf die Produktisolierung nicht den zusätzlichen Aufwand. Zudem ist bei den erforderlichen hohen, bezüglich Neu5Ac äquimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen eine starke Aktivitätsabnahme der Aldolase festzustellen.

3.3 Das Enzym *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase

In diesem Kapitel wird nach einer Beschreibung des Vorkommens und der Eigenschaften des Enzyms die Bestimmung der kinetischen Parameter dargelegt. Im einzelnen werden die folgenden Punkte behandelt:

- Vorkommen und Eigenschaften.
- Mechanismus und kinetisches Modell.
- Bestimmung der kinetischen Parameter.
- Enzymstabilität.
- Einfluß der Viskosität des Reaktionsmediums.

3.3.1 Vorkommen und Eigenschaften

N-Acetylneuraminsäure-Aldolase, E.C. 4.1.3.3, *N*-acetylneuraminate pyruvate-lyase, CAS-Nr. [9027-60-5], kommt in Bakterien und tierischen Geweben vor. *In vivo* katalysiert das Enzym die Spaltung von Neu5Ac in ManNAc und Brenztraubensäure bzw. Pyruvat. Das Gleichgewicht liegt auf Grund der geringen Neu5Ac-Konzentration in den Geweben weitgehend auf der Seite der Spaltprodukte (vgl. Abb. 3.2-2). Die Aldolase wurde zuerst aus hochgradig pathogenen Mikroorganismen isoliert: *Vibrio cholerae* (Choleraerreger) (Heimer et al., 1956) und *Clostridium perfringens* (Gasbranderreger) (Comb et al., 1958). Oft produzieren diese Bakterien auch Sialidasen (auch: Neuraminidasen), die in der Lage sind, die endständigen Sialinsäurereste der Glycoproteine abzuspalten.

In tierischen Geweben gehört die Aldolase ebenfalls zum Katabolismus. Die Biosynthese der Neu5Ac dagegen erfolgt aus ManNAc-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (Schauer, 1982a) (vgl. Kap. 1.3, Abb. 1.3-2).

Nach der ersten Beschreibung (Comb et al., 1960) wurde 1984 die Neu5Ac-Aldolase aus *Escherichia coli* K 235 isoliert und umfassend charakterisiert (Uchida et al., 1984). Inzwischen stehen genetisch modifizierte *E. coli*-Stämme zur Verfügung, mit der die Aldolase preiswert in größeren Mengen produziert werden kann (Aisaka et al., 1987, 1991). Die in dieser Arbeit verwendete und vom europäischen Vertreter der Firma TOYOBO, Osaka, Japan, bezogene Neu5Ac-Aldolase kostete pro 1000 U etwa 35,- DM (Neu5Ac-Spaltung, 37 °C). Das industriell hergestellte Enzym wird im wesentlichen für klinische Tests eingesetzt, da bestimmte Krankheitszustände am erhöhten Sialinsäurespiegel im Serum und im Urin erkannt werden können (Araki et al., 1984; Toyobo, 1991).

Alle Neu5Ac-Aldolasen aus den oben genannten Quellen gehören zur Gruppe der Klasse-I-Aldolasen, bei denen die Substratbindung über die Ausbildung einer Schiff'schen Base erfolgt (vgl. folgendes Kapitel). Bei den Klasse-II-Aldolasen sind zweiwertige Kationen an der Substratbindung beteiligt (Horecker et al., 1972).

Für die Aldolasen aus *C. perfringens* und *E. coli* werden im wesentlichen identische Eigenschaften berichtet. Ein Unterschied besteht lediglich in der Anzahl der Subunits: die Aldolase aus *C. perfringens* besitzt 2 subunits mit einem Molekulargewicht von ca. 50000 u, während die *E. coli*-Aldolase 3 subunits mit ca. 35000 u besitzt.

Eine Zusammenstellung der Daten ist in folgenden Stellen zu finden: Schauer, 1982a, für *C. perfringens*; Uchida et al., 1984, Aisaka et al., 1991 für *E. coli*; Anhang A1 dieser Arbeit, Datenblatt von Toyobo zur verwendeten Aldolase, die ebenfalls aus *E. coli* stammt.

Enzymeigenschaften, die für diese Arbeit relevant sind, werden an den entsprechenden Stellen diskutiert.

3.3.2 Mechanismus und kinetisches Modell

Umfassende Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus sind bisher nur für die Aldolase aus *C. perfringens* durchgeführt worden. Die Bindung der Substrate im aktiven Zentrum erfolgt wie bei zahlreichen anderen Aldolasen, die zur Klasse I gehören, über eine Schiff'sche Base (Hupe, 1987). Ein erster Reaktionsmechanismus zur reversiblen Spaltung wurde von Nees et al. 1976 vorgeschlagen. Durch ^1H -NMR-Untersuchungen konnte die Stereochemie der daran beteiligten Substrate ermittelt werden (Baumann et al., 1989). Der von dieser Arbeitsgruppe vorgeschlagene Mechanismus ist in Abb. 3.3.2-1 dargestellt und soll im folgenden erläutert werden. Über die Konformationsänderungen und Umlagerungen der Kohlenhydratkette im aktiven Zentrum während der Reaktion ist bis jetzt nichts bekannt. Ebenso ist die Frage ungeklärt, in welcher Form letztendlich die Kohlenhydrate (offenkettig oder Ringform) am Enzym gebunden werden.

- Pyruvat bildet mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes der Aldolase eine Schiff'sche Base, die mit dem tautomeren Enamin (nicht dargestellt) im Gleichgewicht steht.
- α -ManNAc wird im aktiven Zentrum gebunden, wobei das unprotonierte N-Atom eines Imidazolrings von Histidin mit der axialständigen OH-Gruppe am C-1 des ManNAc wechselwirkt.
- unter Öffnung des Pyranoserings wird eine Bindung zwischen C-1 des ManNAc und C-3 des gebundenen Pyruvats gebildet.
- durch Ringschluß bildet sich α -Neu5Ac, die durch H_2O -Anlagerung freigesetzt wird.

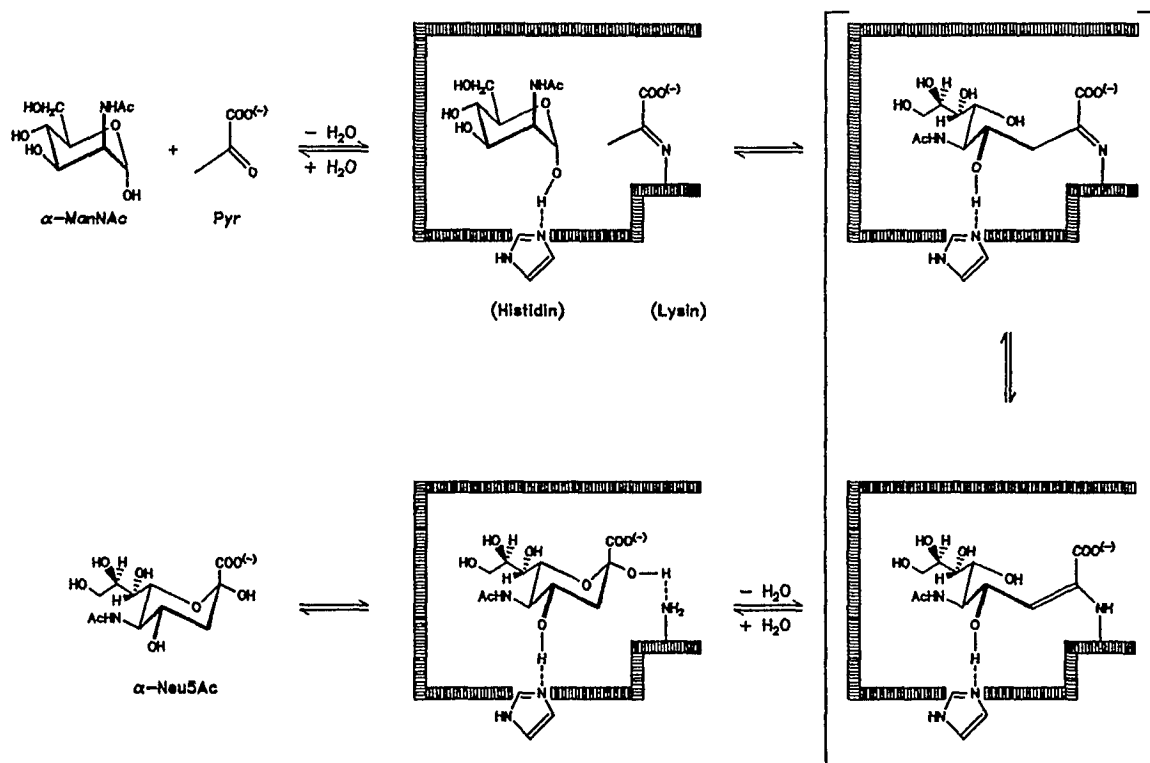


Abb. 3.3.2-1: Mechanismus der reversiblen enzymatischen Synthese von Neu5Ac; die im ersten Schritt erfolgende Anlagerung von Pyr ist nicht gesondert dargestellt; (nach Baumann et al., 1989; der Rahmen soll das aktive Zentrum des Enzyms symbolisieren)

Es ist wahrscheinlich, daß ein analoger Mechanismus auch für das Enzym aus *E. coli* gilt, da auch hier zwischen Pyr bzw. Neu5Ac als Substrat eine Schiff'sche Base gebildet wird (Aisaka et al., 1991).

Die einzelnen Reaktionen beschreiben in ihrer Gesamtheit einen "ordered bi-uni"-Mechanismus, wie er auch für andere Enzyme der E.C.-Klasse 4.1. beschrieben wird (Hupe, 1984, für FDP-Aldolase; Jorns, 1980, für (R)-Oxynitri-lase). Bei diesem Mechanismus werden bei der Synthesereaktion die beiden Substrate nacheinander in einer bestimmten Reihenfolge gebunden. Entsprechend werden die bei der Spaltung entstehenden Produkte nacheinander freigesetzt ("ordered uni-bi"-Mechanismus). Für eine Gleichgewichtsreaktion ergibt sich damit das in Abbildung 3.3.2-2 angegebene Reaktionsschema.

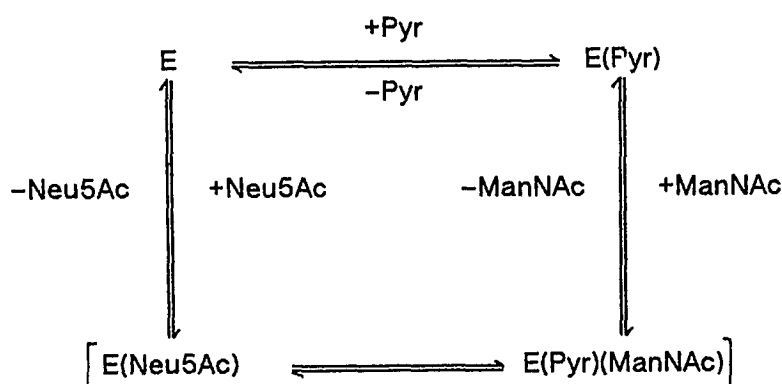


Abb. 3.3.2-2: Reaktionsschema des "ordered bi-uni"-Mechanismus
E = Enzym

Bei der nun folgenden Beschreibung des kinetischen Modells wird vorausgesetzt, daß der oben angegebene Mechanismus auch für die Aldolase aus *E. coli* gilt. Ursprünglich war bei Beginn der Arbeiten davon ausgegangen worden, daß das verwendete Enzym aus *C. perfringens* stammt (Herstellerangabe!). Eine eingehende Untersuchung (Gelelektrophorese, Isoelektrische Fokussierung, Herstellerbefragung) lieferte jedoch das Ergebnis, daß *E. coli* als Enzymquelle diente. Eigene Untersuchungen zur weiteren Aufklärung des Mechanismus dieses Enzyms waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Das zur Beschreibung der Kinetik verwendete Modell muß folgenden Anforderungen genügen:

- Beschreibung aller wesentlichen Einflußgrößen mit möglichst wenigen, signifikanten Parametern.
- Gültigkeit für einen möglichst großen Konzentrationsbereich der Reaktanden.
- Gültigkeit über den gesamten Umsatzbereich bei Konzentrationen, wie sie für die spätere Anwendung relevant sind.
- Korrekte Beschreibung der kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften des Reaktionssystems.
- Berücksichtigung von Erkenntnissen über den Reaktionsmechanismus.

Das Modell dient letztlich zur Aufstellung von Stoffbilanzen von Reaktoren und soll die Vorhersage von deren Betriebszuständen ermöglichen.

Im folgenden werden zwei Modelle mit unterschiedlicher Eignung für das hier betrachtete Reaktionssystem vorgestellt.

Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik

Ein sehr einfacher formalkinetischer Ansatz zur Beschreibung einer enzymatischen Reaktion mit zwei Substraten ist die multiplikative Verknüpfung zweier Michaelis-Menten-Kinetiken für Ein-Substrat-Reaktionen, wie er in Gleichung 3.3.2-1 für eine Reaktion $A + B \rightleftharpoons P$ angegeben ist (sog. Michaelis-Menten-Doppelsubstrat-

kinetik). Durch Erweiterungen können z. B. Produktinhibierungen in das Modell eingebaut werden.

$$v_H = [E] * A_{max}^H * \frac{[A]}{K_m^A * (1 + [P]/K_i^P) + [A]} * \frac{[B]}{K_m^B + [B]} \quad (3.3.2-1)$$

mit:	v_H	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese
	A_{max}^H	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Synthese
	$K_m^{A,B}$	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente A, B
	K_i^P	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente P, kompetitiv

Für die Spaltung ergibt sich unter Berücksichtigung der möglichen Produktinhibierungen:

$$v_R = [E] * A_{max}^R * \frac{[P]}{K_m^P * (1 + [A]/K_i^A) + [P] * (1 + [B]/K_i^B)} \quad (3.3.2-2)$$

mit:	v_R	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der Spaltung
	A_{max}^R	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Spaltung
	K_m^P	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente P
	K_i^A	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente A, kompetitiv
	K_i^B	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente B, unkompetitiv

Dieser Ansatz weist einige Vor- und Nachteile auf, die im folgenden diskutiert werden:

- Mit diesem Modell sind Ergebnisse aus Messungen von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten beschreibbar.
- Alle Parameter haben eine physikalisch chemische Bedeutung.
- Synthese und Hydrolyse werden völlig unabhängig voneinander betrachtet, obwohl beide Reaktionen am gleichen aktiven Zentrum ablaufen.
- Für jede Komponente wird neben der Michaelis-Menten-Konstante noch eine Inhibierungskonstante angenommen, obwohl die Konkurrenz z. B. des Substrates A und des Produktes P um die Bindung bereits durch die beiden K_m -Werte beschrieben wird.
- Kenntnisse über den Mechanismus der Reaktion finden keine Berücksichtigung.
- Mit diesem Modell ist bei Gleichgewichtsreaktionen die Berechnung von K_{eq} aus den kinetischen Daten nicht möglich! Führt man Simulationen für Satzreaktorversuche durch, so findet man für die aus den Gleichgewichtskonzentrationen berechnete Gleichgewichtskonstante eine Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration, was im Widerspruch zur Thermodynamik steht (Biselli, 1991).

Gerade der letztgenannte Nachteil beschränkt die Anwendbarkeit dieses Modells auf Reaktionen, deren Gleichgewicht weit auf Seiten der Produkte liegt. Für Gleichgewichtsreaktionen wie auch im vorliegenden Fall sind komplexere Ansätze notwendig. Nachfolgend wird das nach dem "steady-state Ansatz" erhaltene kinetische Modell beschrieben, das die oben genannten Nachteile vermeidet.

Kinetisches Modell nach dem "steady-state Ansatz"

Zunächst soll der Unterschied zwischen dem "rapid equilibrium" und dem "steady-state" Ansatz an Hand einer einfachen Reaktion beschrieben werden (Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1981).



mit:	k_1	L/(mol*s)	Geschwindigkeitskonstante der Bildung des ES-Komplexes
	k_{-1}	1/s	Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des ES-Komplexes
	k_H	1/s	Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Umwandlung

Nach beiden Ansätzen leitet sich eine äußerlich gleiche Geschwindigkeitsgleichung ab, wobei die Bedeutung der Konstanten K jedoch unterschiedlich ist:

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K + [S]} \quad (3.3.2-4)$$

mit:	v	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit
	$V_{\max}$	kat/L	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
	K	mol/L	Konstante (Bedeutung siehe unten)
	$[S]$	mol/L	Substratkonzentration

- "rapid equilibrium Ansatz"

Der Enzym-Substrat-Komplex ES wird in einer schnellen vorgelagerten Gleichgewichtsreaktion gebildet. Der Zerfall des ES-Komplexes in Enzym und Produkt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ($k_{-1} \gg k_H$).

Die Konstante K aus Gleichung 3.3.2-4 ist die Dissoziationskonstante K_s des ES-Komplexes, für die folgende Beziehung gilt:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3.3.2-5)$$

- "steady-state Ansatz"

Die Annahme der schnellen vorgelagerten Gleichgewichtsreaktion wird durch die Annahme ersetzt, daß sich bald nach Beginn der Reaktion eine konstante Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes einstellt ($d[ES]/dt=0$). Die Konstante K aus Gleichung 3.3.2-4 ist eine kinetische Konstante und wird als Michaelis-Menten-Konstante K_m bezeichnet. Es gilt die folgende Beziehung:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_H}{k_1} \quad (3.3.2-6)$$

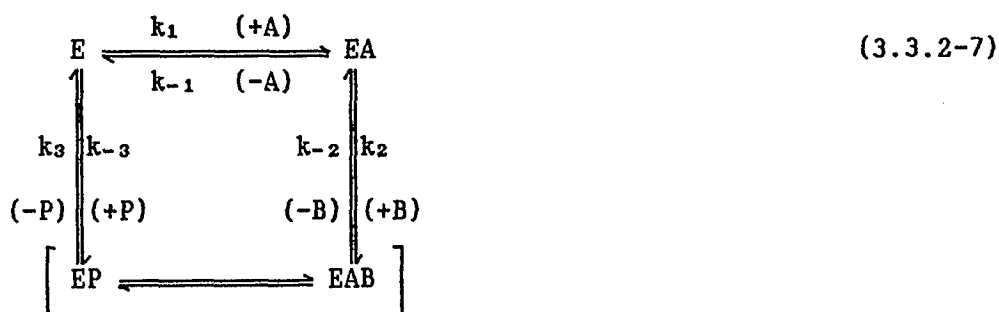
Die Herleitung von Geschwindigkeitsgleichungen nach dem "rapid equilibrium Ansatz" ist auch für kompliziertere Reaktionssysteme möglich, allerdings muß die

Reaktion nach einem "random"-Mechanismus erfolgen, d. h. die Bindung der Substrate bei einer 2-Substratreaktion erfolgt in beliebiger Reihenfolge (Segel, 1975). Für den hier vorliegenden Fall einer reversiblen sequentiellen Reaktion ("ordered"-Mechanismus) muß die Ableitung nach dem "steady-state Ansatz" erfolgen (Segel, 1975). Prinzipiell kann mit diesem Ansatz auch die Geschwindigkeitsgleichung für den "random"-Mechanismus abgeleitet werden. Da einzelne Terme der erhaltenen Gleichung jedoch nicht signifikant sind, wird nach Vereinfachung der gleiche Ausdruck wie bei der Ableitung nach dem "rapid equilibrium Ansatz" erhalten (Cornish-Bowden, 1981).

Das Prinzip der Herleitung sowie die verwendeten Gleichungen werden im folgenden beschrieben. Es handelt sich dabei um einen entsprechend modifizierten Auszug aus dem Buch von I. H. Segel, 1975, Kapitel 9. Dabei werden zur Vereinfachung der Schreibweise die Reaktionspartner mit den Buchstaben A, B und P bezeichnet, wobei folgende Zuordnung besteht:

A = Pyr (Substrat, das als erstes gebunden wird)
 B = ManNAc (Substrat, das als zweites gebunden wird)
 P = Neu5Ac
 H = Hinreaktion, Synthese von Neu5Ac
 R = Rückreaktion, Spaltung von Neu5Ac.

Damit ergibt sich als Reaktionsschema des "ordered bi-uni"-Mechanismus mit Angabe der Geschwindigkeitskonstanten:



In diesem Schema treten 4 verschiedene Zustände des Enzyms auf: E, EA, EAB und EP. Bezüglich der Verteilung des verfügbaren Enzyms auf die einzelnen Spezies sind EAB und EP gleichwertig (angedeutet durch die Klammer []), weshalb nur noch 3 verschiedene Enzymzustände für die kinetische Beschreibung berücksichtigt werden müssen.

Für die Ableitung der Geschwindigkeitsgleichung gibt es mehrere schematische Methoden, wobei das weitere Vorgehen hier nur angedeutet werden kann (vgl. hierzu Segel, 1975 und Cornish-Bowden, 1981):

- nach der Methode von King-Altman wird der Anteil der einzelnen Spezies an der Gesamtzymmenge mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten und den Konzentrationen der Reaktionskomponenten beschrieben, wie z. B. für den Anteil an freiem Enzym in Gleichung 3.3.2-8. Die Angabe der Enzymkonzentration muß dabei in mol/L erfolgen, was durch "E" gekennzeichnet wird.

$$\frac{[E]^{\ddagger}}{[E]^{\ddagger}_{\text{gesamt}}} = \frac{k_{-2}k_{-1} + k_2k_3[B] + k_{-1}k_{-3}}{\text{Nenner}} \quad (3.3.2-8)$$

$$\frac{[EAB+EP]^{\ddagger}}{[E]^{\ddagger}_{\text{gesamt}}} = \frac{k_1k_2[A][B] + k_{-3}k_2[B][P] + k_{-1}k_{-3}[P]}{\text{Nenner}} \quad (3.3.2-9)$$

$$\frac{[EA]^{\ddagger}}{[E]^{\ddagger}_{\text{gesamt}}} = \frac{k_1k_{-2}[A] + k_{-3}k_{-2}[P] + k_3k_1[A]}{\text{Nenner}} \quad (3.3.2-10)$$

Nenner = Summe aller Zähler der Gl. 3.3.2-8 bis 3.3.2-10

- Die Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese ist gegeben als die Differenz aus der Synthesegeschwindigkeit und der Spaltungsgeschwindigkeit:

$$v_1 = k_3 * [EP+EAB]^{\ddagger} - k_{-3} * [E]^{\ddagger} * [P] \quad (3.3.2-11)$$

- durch Vereinfachung und Zusammenfassung können die Geschwindigkeitskonstanten zu Termen zusammengefaßt werden, die mit kinetischen Konstanten (V_{max} bzw. A_{max} , K_m etc.) gleichgesetzt werden können. Dabei haben die zusammengefaßten Konstanten zum Teil keine mechanistische Bedeutung. Lediglich K_1^A und K_1^P entsprechen klassischen Dissoziationskonstanten. Dies zeigt sich auch daran, daß gemäß Gl. 3.3.2-17 verschiedene Konstanten definiert und in der endgültigen Geschwindigkeitsgleichung verwendet werden können.

$$V_{\text{max}}^H = k_3 * [E]^{\ddagger}_{\text{gesamt}} \quad V_{\text{max}}^R = \frac{k_{-1} * k_{-2} * [E]^{\ddagger}_{\text{gesamt}}}{k_{-1} + k_{-2}} \quad (3.3.2-12)$$

$$K_m^A = \frac{k_3}{k_1} \quad K_m^B = \frac{k_3 + k_{-2}}{k_2} \quad (3.3.2-13)$$

$$K_1^A = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad K_1^B = \frac{k_{-2} + k_{-1}}{k_2} \quad (3.3.2-14)$$

$$K_m^P = \frac{k_{-1} * (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} * (k_{-2} + k_{-1})} \quad K_1^P = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad (3.3.2-15)$$

Damit ergibt sich Gleichung 3.3.2-16 für die Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese, die sich aus der Hin- und Rückreaktion zusammensetzt. Die Bedeutung der Konstanten sowie die Bedeutung der einzelnen Terme im Nenner soll kurz diskutiert werden. Dazu wird ihr Anteil durch Betrachtung der Zahlwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen berechnet (Zahlwerte der kinetischen Konstanten s. Tab. 3.3.3-3).

$$v_1 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[E]_{\text{Ald}} * \left(\frac{A_{\text{max}}^{\text{H}} * [A] * [B]}{K_1^{\text{A}} * K_m^{\text{B}}} - \frac{A_{\text{max}}^{\text{R}} * [P]}{K_m^{\text{P}}} \right)}{1 + \frac{[A]}{K_1^{\text{A}}} + \frac{K_m^{\text{A}} * [B]}{K_1^{\text{A}} * K_m^{\text{B}}} + \frac{[A] * [B]}{K_1^{\text{A}} * K_m^{\text{B}}} + \frac{[P]}{K_m^{\text{P}}} + \frac{[P] * [B]}{K_1^{\text{B}} * K_m^{\text{P}}}} \quad (3.3.2-16)$$

mit:	v_1	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese
	$A_{\text{max}}^{\text{H}}$	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Synthese
	$A_{\text{max}}^{\text{R}}$	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Spaltung
	K_m^{A}	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente A = Pyr
	K_m^{B}	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente B = ManNAc
	K_m^{P}	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente P = Neu5Ac
	K_1^{A}	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente A = Pyr
	K_1^{B}	mol/L	Inhibierungskonstante der Komponente B = ManNAc
	[A, B, P]	mol/L	Konzentration der Komponente A, B, P
	$[E]_{\text{Ald}}$	g/L	Enzymkonzentration (Aldolase)

- Der "ordered"-Mechanismus ist bezüglich der Substrate A und B nicht symmetrisch. Mit A ist immer das Substrat zu bezeichnen, das zuerst am Enzym gebunden wird.
- Neben den rein mechanistischen Untersuchungen kann durch kinetische Messungen zur Produktinhibierung bei verschiedenen Substratkonzentrationen festgestellt werden, welches Substrat zuerst vom Enzym gebunden wird. Ebenso kann durch diese Messungen zwischen einem "ordered"- und einem "random"-Mechanismus unterschieden werden, da letzterer bezüglich der Substrate A und B keine Unterschiede zeigt. Derartige Messungen waren hier jedoch nicht mit ausreichender Genauigkeit möglich, da bei Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit geringfügige Zunahmen der Reaktionsprodukte bestimmt werden müssen, was bei bereits vorhandenem Produkt schwierig ist (vgl. auch Abb. 3.3.3-10 und -11, jeweils Kurve C mit der Darstellung von Messungen zur Produktinhibierung mit relativ starker Streuung der Meßwerte). Daher wurde auf eigene Untersuchungen zu diesem Komplex verzichtet und die Modellentwicklung auf der Grundlage der Literaturdaten durchgeführt.
- A_{max} ist die maximale massenspezifische Aktivität. Das Produkt $A_{\text{max}} * [E]$ beschreibt die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit, wenn die Sättigungskonzentration der jeweiligen Substrate erreicht wird.
- K_m^{A} , K_m^{B} und K_m^{P} sind die Michaelis-Menten-Konstanten der Substrate, wobei im Fall der Hin-Reaktion für das zweite Substrat die Sättigungskonzentration vorliegt.
- K_1^{A} ist die Dissoziationskonstante des EA-Komplexes und spielt nur eine Rolle, wenn die Konzentration von B gegen 0 geht.
- K_1^{B} beschreibt den inhibierenden Einfluß von B auf die Rück-Reaktion (Spaltung).
- K_1^{P} (vgl. Gl. 3.3.2-15) kommt in der verwendeten Form von Gleichung 3.3.2-16 nicht vor; sie ist die Dissoziationskonstante des EP-Komplexes. Im übrigen gilt folgende Beziehung 3.3.2-17:

$$K_1^A * K_m^B * K_1^P = K_m^A * K_1^B * K_m^P \quad (3.3.2-17)$$

- Die Form der einzelnen Terme ergibt sich aus dem formalistischen Ansatz zur Ableitung der Geschwindigkeitsgleichung. Ein anschaulicher Grund für das Auftreten des Produktes $[P] \cdot [B]$ im Term 6 läßt sich nicht angeben. Aus den Zahlwerten ergibt sich, daß dieser Term die Produktinhibierung bei hohen Substratkonzentrationen bei der Synthese sowie die Inhibierung der Spaltung durch die Komponente B beschreibt.
- Bei niedrigen Substratkonzentrationen wirkt sich zugegebenes Produkt vor allem in den Zahlwerten des Zählers aus, da dann aufgrund der Gleichgewichtslage die Spaltung abläuft.
- Der Term 5 im Nenner ($[A] \cdot [B]$) spielt nur bei hohen Substratkonzentrationen eine Rolle.
- Der Term 3 im Nenner ($K_m^A \cdot [B]$) trägt unter allen denkbaren Bedingungen nur einen vernachlässigbaren Teil zum Gesamtwert des Nenners bei. Dies ist kein Anzeichen für ein fehlerhaftes kinetisches Modell, da derartige Verhalten auch bei einem "random"-Mechanismus auftritt, der den einfachsten Fall für eine Zweisubstratreaktion darstellt (Biselli, 1991). Möglicherweise spielt hier die Art der Ermittlung der kinetischen Parameter eine entscheidende Rolle, indem die kinetischen Messungen nicht bei allen möglichen Kombinationen der Substrat- und Produktkonzentrationen durchgeführt wurden.

Die Haldane-Beziehung verknüpft die kinetischen Konstanten mit der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^A . Sie ergibt sich aus der Gleichgewichtsbedingung $d[P]/dt = 0$ und läßt sich aus Gleichung 3.3.2-16 herleiten:

$$K_{eq}^A = \frac{A_{max}^H * K_m^P}{A_{max}^R * K_1^A * K_m^B} \quad (3.3.2-18)$$

mit: K_{eq}^A L/mol Gleichgewichtskonstante der Neu5Ac-Synthese

Mit Hilfe der Haldane-Beziehung läßt sich Gleichung 3.3.2-16 umformen, wodurch an Stelle von K_1^A die mit guter Genauigkeit bestimmbare Gleichgewichtskonstante in die Geschwindigkeitsgleichung eingeht. Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter aus den Messwerten reduziert sich dadurch die Zahl der anzupassenden Größen.

$$v_1 = \frac{[E]_{Al d} * (A_{max}^H * A_{max}^R * [A] * [B] * K_{eq}^A - A_{max}^H * A_{max}^R * [P])}{A_{max}^H * K_m^P + A_{max}^H * [P] + A_{max}^R * K_m^A * [B] * K_{eq}^A + \dots} \quad (3.3.2-19)$$

$$\dots + A_{max}^R * K_m^B [A] * K_{eq}^A + \frac{A_{max}^H * [P] * [B]}{K_1^B} + A_{max}^R * [A] * [B] * K_{eq}^A$$

Das hier vorgestellte Modell (Gleichungen 3.3.2-16 bzw. 3.3.2-19) dient zur formalkinetischen Beschreibung der durch die Aldolase katalysierten Neu5Ac-Synthese. Der dabei gewählte Ansatz berücksichtigt auch die Gleichgewichtslage der Reaktion. Die Ermittlung der kinetischen Parameter wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der Neu5Ac-Aldolase

In diesem Kapitel wird die Bestimmung der kinetischen Parameter der Neu5Ac-Aldolase beschrieben. Dabei werden nach einer Einführung folgende Punkte behandelt:

- Kurze Beschreibung der verwendeten Methoden.
- Untersuchungen zur Festlegung der Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur).
- Bestimmung der kinetischen Parameter aus Satzreaktorversuchen und Vergleich mit Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit.

Einführung und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal alle kinetischen Daten zur vollständigen Beschreibung der enzymatischen Neu5Ac-Synthese bestimmt. In der Literatur wird zur Charakterisierung des Enzyms in der Regel nur der K_m -Wert für Neu5Ac angegeben. Vereinzelt finden sich auch Werte für die Inhibierung durch Pyruvat (Uchida et al., 1984; Nees et al., 1976) sowie K_m -Werte für ManNAc und Pyruvat (Kim et al., 1988). Als analytische Methode wurde bei diesen Arbeiten die Menge des entstehenden oder verbrauchten Pyruvats durch Reduktion mit Lactatdehydrogenase unter Verbrauch von NADH photometrisch bestimmt. Bei der Untersuchung der Neu5Ac-Spaltung können die Aldolase und die Dehydrogenase in einem gekoppelten Test verwendet werden (Araki et al., 1984; Toyobo, 1991).

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die gleichzeitig die Quantifizierung aller (!) relevanten Substanzen ermöglicht. Dabei gelingt neben der relativ einfachen Trennung von Neu5Ac, Pyr und ManNAc auch die Trennung der beiden Epimere (= Diastereomere) ManNAc und GlcNAc. Des weiteren kann Ameisensäure sowie als interner Standard Oxalsäure detektiert werden. Die genauen Einzelheiten hierzu sind in Kapitel 9.1.1 zu finden.

Bei den experimentellen Arbeiten wurden folgende Punkte beachtet:

- Eine sichere Konzentrationsbestimmung der Komponenten ist im Bereich von etwa 0,2 mM bis 5 mM bei einer Reproduzierbarkeit von $\pm 5\%$ möglich.
- Bei Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde das entstehende Reaktionsprodukt (Neu5Ac bei der Synthese, Pyr und/oder ManNAc bei der Spaltung) quantifiziert. Der Umsatz sollte bei diesen Messungen $\leq 5\%$ sein, so daß trotz vorhandener Produktinhibierungen noch Bedingungen vorliegen, unter denen annähernd Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gemessen werden (Cornish-Bowden, 1981).
- Die Inkubationszeit der Ansätze zur Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurde, soweit erforderlich, angepaßt, um immer bei gleichem Umsatz zu messen (z. B. bei Messungen von Inhibierungen). Bei Messungen der Temperaturabhängigkeit wurde auch die Enzymkonzentration verändert.

- Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurde mit 0,1 M H_2SO_4 verdünnt (HPLC-Laufmittel war 6 mM H_2SO_4); bei Raumtemperatur war innerhalb von 24 Stunden keine Veränderung der Konzentrationen der Komponenten feststellbar, obwohl bei höheren Temperaturen und extremen pH-Werten Zersetzungsprodukte der Neu5Ac entstehen (Saito et al., 1989).
- Zum Ansetzen der Lösungen wurde verdünnter Phosphatpuffer (10 mM – 20 mM KH_2PO_4 , titriert auf pH 7,5) verwendet, um die Einstellung des pH-Wertes zu erleichtern. Konzentrationen zwischen 0 und 200 mM Phosphatpuffer beeinflussen die Reaktionsgeschwindigkeit der Aldolase nicht. Wie für zahlreiche biologische Systeme wird auch für dieses Enzym eine Inhibierung durch Tris-HCl-Puffer berichtet (Anonymus, 1991; Good et al., 1972; Uchida et al., 1984). Nach der pH-Einstellung wurde die Konzentration der Komponenten mit HPLC bestimmt.
- Brenztraubensäure wurde in Form des Na-Salzes eingesetzt.
- Nach der Probenahme zur Konzentrationsbestimmung wurde der pH-Wert mit einer Mikroelektrode überprüft.
- Die kinetischen Messungen wurden z. T. mit sehr geringen Enzymkonzentrationen durchgeführt, um zu vermeiden, daß vorgelagerte Reaktionen geschwindigkeitsbestimmend werden (z. B. Mutarotation).
- Enzymeinwaagen werden immer in g bzw. mg des verwendeten Lyophilisats angegeben, das laut Angaben des Herstellers etwa 70% Protein und 30% Stabilisatoren enthält (Toyobo 1991). Eigene Messungen ergaben einen Proteingehalt von 58%. Der Einfluß der Stabilisatoren wird in Kap. 3.5.3 bei den Ergebnissen der kontinuierlichen Experimente diskutiert.
- Mit Ausnahme der Neu5Ac-Produktion im 300-g-Maßstab wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen mit einer einzigen Enzymcharge durchgeführt, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Bei Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ konnte über 2 Jahre hinweg keine Aktivitätsabnahme festgestellt werden. Weitere Chargen der Aldolase, die für andere Arbeiten verwendet wurden (vgl. Kap. 3.5.4; Appel, 1990), zeigten weitgehend identische Eigenschaften.

Untersuchungen zur Festlegung der Reaktionsbedingungen

Wie bereits beschrieben (Kap. 3.2) beeinflussen die Reaktionsbedingungen nicht nur die enzymatische Reaktion, sondern auch die Gleichgewichtslage der Reaktion. Da das Ziel ein kontinuierlicher Prozeß ist, bei dem eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute bei hohem Umsatz und möglichst geringem Enzymverbrauch erreicht werden soll, müssen die Reaktionsbedingungen in dieser Hinsicht optimiert werden. In Tabelle 3.3.3-1 sind qualitativ die Reaktionsbedingungen unter den Aspekten Thermodynamik, Kinetik und Enzymstabilität zusammenfassend angegeben, soweit sie bisher beschrieben wurden. Im folgenden wird die Ermittlung der pH- und Temperaturabhängigkeit der Aldolase dargestellt; Angaben zur Stabilität finden sich in Kap. 3.3.4.

	Thermodynamik	Kinetik	Stabilität
Temperatur	tief	hoch (?)	niedrig (?)
pH	-	optimal	optimal
Konzentration	hoch	?	?

Tab. 3.3.3-1: Optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese (1):
-: kein Einfluß, ?: noch unklar, (?): vermutlich

pH-Abhängigkeit der Aktivität der Neu5Ac-Aldolase

In Abbildung 3.3.3-1 ist die pH-Abhängigkeit sowohl der Synthese als auch der Spaltung von Neu5Ac dargestellt. Der pH-Wert wurde unmittelbar nach Probenahme für die HPLC mit einer Mikroelektrode in den verwendeten Reaktionsgefäßen bestimmt.

Sowohl für die Synthese als auch für die Spaltung liegt ein breites und relativ schwach ausgeprägtes Optimum zwischen pH 7 und 8, wie es auch in der Literatur beschrieben wird. Die weiteren Arbeiten wurden daher in diesem Bereich durchgeführt, Lösungen wurden in der Regel auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

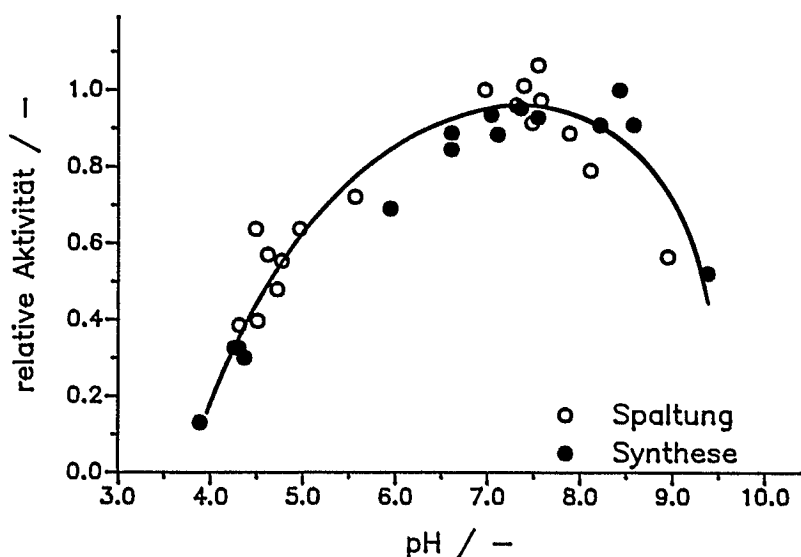


Abb. 3.3.3-1: pH-Abhängigkeit der Synthese und Spaltung von Neu5Ac
Bedingungen: Synthese 51,7 mM ManNAc, 19,6 mM Pyr;
Spaltung 20 mM Neu5Ac; beide 26,5 µg/mL Aldolase; 25 °C

Temperaturabhängigkeit der Aktivität der Neu5Ac-Aldolase

Sowohl für die Synthese als auch für die Spaltung steigt die Aktivität der Aldolase mit steigender Temperatur an. In Abbildung 3.3.3-2 ist die massenspezifische Aktivität logarithmisch gegen $1/T$ aufgetragen. Durch die Linearisierung ist die zunehmende thermische Desaktivierung bei höheren Temperaturen durch die stärkere Abweichung der Meßpunkte von der eingezeichneten Regressionsgerade gut zu erkennen.

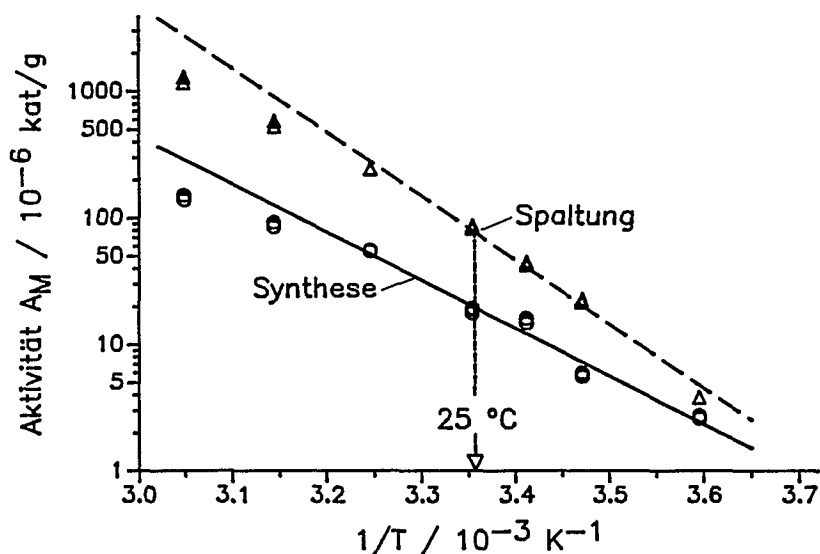


Abb. 3.3.3-2: Temperaturabhängigkeit der Synthese und Spaltung von Neu5Ac
Bedingungen: Synthese 45,5 mM ManNAc, 25,3 mM Pyr;
Spaltung 20,2 mM Neu5Ac; 2–900 $\mu\text{g/mL}$ Aldolase; pH 7,5

Aus den Daten lassen sich nach Arrhenius die Aktivierungsenergien der beiden Reaktionen berechnen:

$$\text{Synthese: } E_A^{\text{H}} = 72,6 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{Spaltung: } E_A^{\text{R}} = 96,6 \text{ kJ/mol}$$

Aisaka et al., 1991, geben für die Spaltung eine Aktivierungsenergie E_A^{R} von 51,9 kJ/mol an, wobei allerdings der Temperaturbereich zwischen 37 °C und 70 °C ausgewertet wurde. Allgemein werden für enzymkatalysierte Reaktionen Aktivierungsenergien zwischen 20–60 kJ/mol angegeben (Segel, 1975); die hier gefundenen Werte liegen zwar höher, aber doch in der gleichen Größenordnung. Die Differenz der Aktivierungsenergien $E_A^{\text{H}} - E_A^{\text{R}}$ entspricht der Standardreaktionsenthalpie ΔH_0^{A} (vgl. Gl. 3.2–8). Die Differenz der Aktivierungsenergien ist mit –24 kJ/mol kleiner als der für ΔH_0^{A} gefundene Wert von –47,8 kJ/mol. Vermutlich sind die Messungen zur Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reaktion fehlerbehaftet. Bei niedrigen Temperaturen werden vorgelagerte Gleichgewichtsreaktionen wie z. B. die Mutarotation geschwindigkeitsbestimmend, so daß zu kleine Aktivitäten bestimmt werden. Dies führt in der logarithmischen Auftragung zu größeren Steigungen und damit zu scheinbar höheren Aktivierungsenergien. Bei der Bestimmung von ΔH_0^{A} spielen derartige Effekte keine Rolle.

In der Literatur wird in der Regel als Temperaturoptimum einer enzymkatalysierten Reaktion die Temperatur angegeben, ab der auf Grund der überwiegenden Desaktivierung die Aktivität scheinbar abnimmt. Je nach Einsatzzweck des Enzyms ergeben sich dabei verschiedene "optimale Temperaturen":

- Bei der Verwendung in enzymatischen Tests, bei denen eine möglichst geringe Enzymmenge nur einmal eingesetzt wird, ist eine hohe Temperatur anzustreben, um eine möglichst hohe Aktivität (= minimaler Enzymverbrauch) zu erzielen.
- Für den Einsatz in kontinuierlichen Prozessen – wie auch hier geplant – ist eine möglichst gute Langzeitstabilität für den Katalysator gefordert, um so die produktmengenspezifischen Enzymkosten zu reduzieren. In der Regel nimmt die Stabilität von Enzymen mit sinkender Temperatur zu.

Im vorliegenden Fall wurde für die Festlegung der optimalen Temperatur vor allem die Gleichgewichtslage der Synthese von Neu5Ac berücksichtigt (vgl. Kap. 3.2). Die dadurch erforderlichen niedrigen Temperaturen sind jedoch auch im Hinblick auf die Enzymstabilität günstig (vgl. Kap. 3.3.4).

Aktivität der Aldolase als Funktion der Proteinkonzentration

Zwischen der Proteinkonzentration und der volumenspezifischen Aktivität (= Reaktionsgeschwindigkeit) der Aldolase bei bestimmten Substratkonzentrationen besteht nach Gl. 3.3.2-16 ein linearer Zusammenhang. Bei sehr hohen Proteinkonzentrationen kann es jedoch zu Abweichungen vom linearen Verhalten kommen, da auf Grund von Konformationsänderungen nur ein Teil des Enzyms in einer aktiven Form vorliegt. Abbildung 3.3.3-3 zeigt die experimentelle Überprüfung für die Synthesereaktion. Der gewählte Konzentrationsbereich deckt sich mit den bei allen Experimenten verwendeten Enzymkonzentrationen.

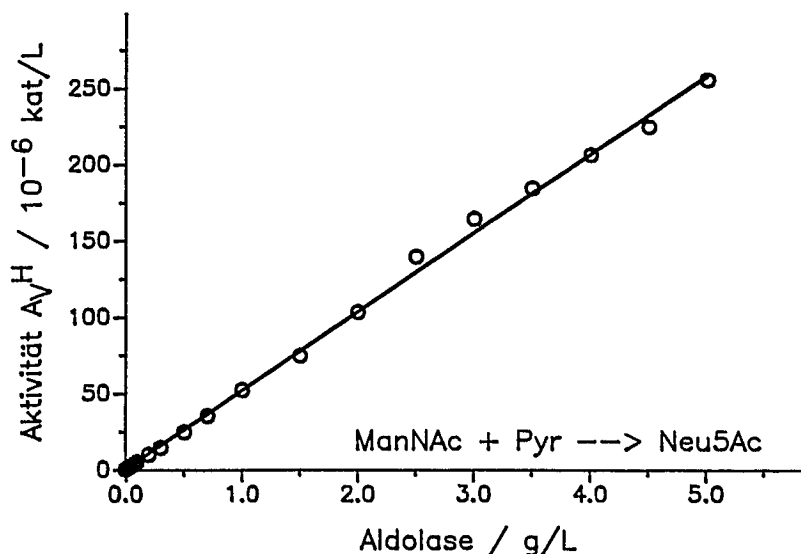


Abb. 3.3.3-3: Volumenspezifische Aktivität der Aldolase für die Synthese als Funktion der Enzymkonzentration
Bedingungen: 100 mM ManNAc, 200 mM Pyr; pH 7,5; 25 °C

Standardbedingungen

Auf Grund der vorstehend beschriebenen Ergebnisse wurden die kinetischen Konstanten bei folgenden Standardbedingungen bestimmt:

- pH 7,5.
- 25 °C.
- Puffer 10 mM – 20 mM KH_2PO_4 , titriert mit NaOH auf pH 7,5.

Bestimmung der kinetischen Parameter durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und aus Satzreaktorversuchen

Die zur Beschreibung der Kinetik erforderlichen Konstanten lassen sich entweder aus Messungen von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten oder aus Satzreaktorversuchen ermitteln, wie es schematisch in Abbildung 3.3.3-4 dargestellt ist.

Anfangsreaktionsgeschwindigkeit

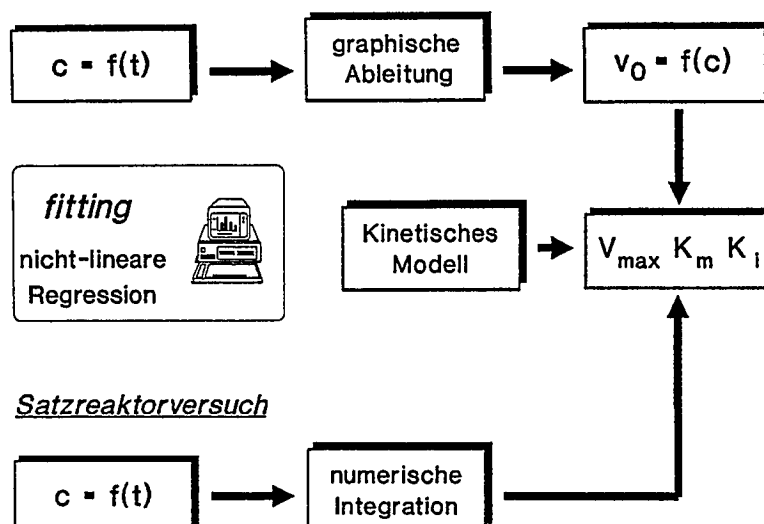


Abb. 3.3.3-4: Ermittlung der kinetischen Parameter aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit oder aus Satzreaktorversuchen

In beiden Fällen ist ein kinetisches Modell erforderlich, das die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. massenspezifische Enzymaktivität als Funktion der Substratkonzentrationen beschreibt (hier Gleichung 3.3.2-16). Während bei Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit die Konzentration nur einer Komponente verändert wird und die der anderen Komponenten konstant gehalten werden, wird bei Satzreaktorversuchen die Konzentrationsänderung aller (!) Komponenten als Funktion der Zeit gemessen. Bei der Auswertung sind daher die Stoffbilanzen aller Komponenten erforderlich, die ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem erster Ordnung bilden (vgl. Kap. 3.5.2). Bei beiden Verfahren werden zur Berechnung

der Parameter Methoden zur nicht-linearen Regression verwendet, im Fall der Satzreaktorversuche ergänzt durch numerische Integration der Geschwindigkeitsgleichungen. Beide Methoden weisen Vor- und Nachteile auf, die im folgenden kurz beleuchtet werden sollen:

- Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen sind leicht durchzuführen und einfach auszuwerten; sie sind sehr gut geeignet, um einzelne Aspekte der Kinetik wie z. B. die Inhibierung durch Produkte oder Fremdsubstanzen zu überprüfen. Prinzipiell können die damit ermittelten Konstanten zur Modellierung von Satzreaktorversuchen dienen (Biselli, 1991).
- Satzreaktorversuche sind ebenfalls leicht durchzuführen, die Berechnung der Konstanten ist jedoch aufwendiger (spezielle Software erforderlich). Sie können dazu dienen, die Kinetik unter Bedingungen zu ermitteln, die auch für den späteren Prozeß gewählt werden sollen (hohe Substratkonzentrationen, Erfassung eines großen Umsatzbereiches). Satzreaktorversuche sind dann vorteilhaft, wenn z. B. entstehende Produkte nicht in Reinsubstanz für kinetische Messungen zur Verfügung stehen.

Im vorliegenden Fall wurden die kinetischen Konstanten aus Satzreaktorversuchen bestimmt. Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten allein lieferten Parameter, die für die Modellierung von Satzreaktorversuchen und kontinuierlichen Experimenten nur eingeschränkt brauchbar waren. Diese Daten lieferten jedoch erste Anhaltswerte über die zu erwartenden Größenordnungen der kinetischen Parameter. Mit den aus den Satzreaktorversuchen bestimmten Konstanten gelang jedoch problemlos die Beschreibung aller Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen.

Bestimmung der kinetischen Parameter aus Satzreaktorversuchen

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten wurde sowohl die Synthese als auch die Spaltung von Neu5Ac untersucht. Dabei wurden die Konzentrationen von ManNAc, Pyr und Neu5Ac als Funktion der Zeit mittels HPLC bestimmt. In Tabelle 3.3.3-2 sind die verwendeten Ausgangskonzentrationen der Substrate sowie die eingewogene Enzymkonzentration angegeben.

Zur Parameteridentifikation wurde ein Programm zur simultanen Anpassung an verschiedene Konzentrations-Zeit-Datensätze durch numerische Integration der zugehörigen Geschwindigkeitsgleichungen verwendet (Programm OPTIPLUS; Joks, 1987). Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch Gleichung 3.3.2-19 beschrieben, die an Stelle der zu bestimmenden Konstanten K_1^A die mit guter Genauigkeit bestimmbare Gleichgewichtskonstante K_{eq}^A enthält. Der Wert für K_1^A läßt sich aus der Haldane-Beziehung 3.3.2-18 berechnen.

Die Abbildung 3.3.3-5 zeigt die experimentellen Daten und die mit Hilfe der erhaltenen kinetischen Konstanten simulierten Konzentrations-Zeit-Kurven für die Synthesereaktion, Abbildung 3.3.3-6 zeigt vergrößert zwei Kurven bei niedrigen Konzentrationen. Die ermittelten kinetischen Konstanten finden sich am Ende

dieses Abschnittes. Eine befriedigende Übereinstimmung für den Gleichgewichtsumsatz und die Anstiegsgeschwindigkeit findet man nur, wenn eine effektive Enzymaktivität angenommen wird, die mit steigender Konzentration abnimmt. Für den Versuch Nr. 5 (305 mM ManNAc, 562 mM Pyr) ist gestrichelt der simulierte Konzentrations-Zeit-Verlauf unter Annahme von 100% Enzymaktivität eingezeichnet. Die beste Anpassung findet man für eine Restaktivität von 65%. Rechnerisch wird die verminderte Enzymaktivität durch eine entsprechend verringerte Enzymkonzentration in der Geschwindigkeitsgleichung verwirklicht. Die ermittelten effektiven Enzymkonzentrationen sind in Tabelle 3.3.3-2 in Klammern angegeben.

Versuch Nr.	[ManNAc] ₀ mM	[Pyr] ₀ mM	[Neu5Ac] ₀ mM	[Aldolase] mg/mL
1	57	104	0	0,9 (0,83)
2	112	107	0	0,9 (0,77)
3	110	211	0	0,9 (0,74)
4	210	387	0	1,8 (1,30)
5	305	562	0	1,8 (1,17)
6	0	0	50	0,9 (0,86)
7	0	0	104	0,9 (0,82)
8	0	0	191	1,8 (1,57)
9	0	0	295	1,8 (1,44)
10	110	211	0	0,9 (0,74)
11	110	211	0	1,8 (1,48)
12	110	211	0	2,1 (1,73)

Tab. 3.3.3-2: Substrat- und Enzymkonzentrationen der Satzreaktorversuche (in Klammern effektive Enzymkonzentration, s. u.)
Bedingungen: 25 °C; pH 7,5; 20 mM Phosphat-Puffer

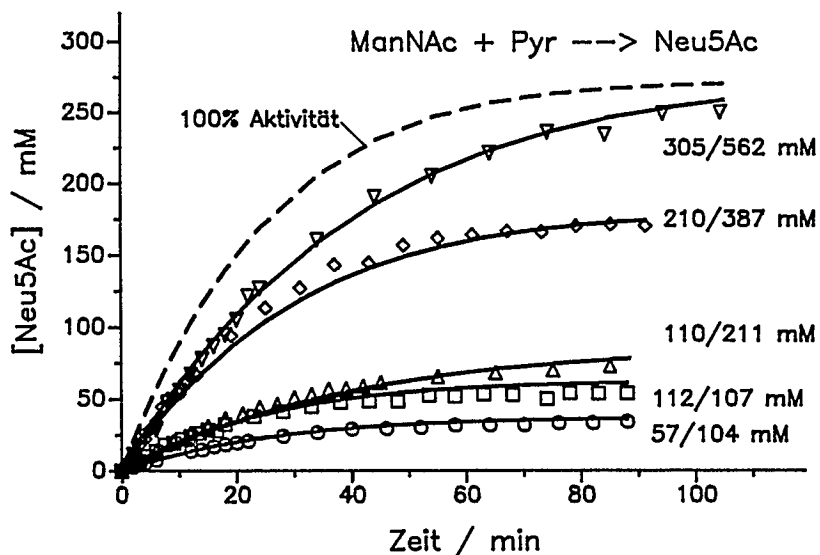


Abb. 3.3.3-5: Gemessene und gerechnete Konzentrations-Zeit-Verläufe der Synthese von Neu5Ac mit Angabe der ManNAc/Pyr-Konzentrationen (Satzreaktorversuche)

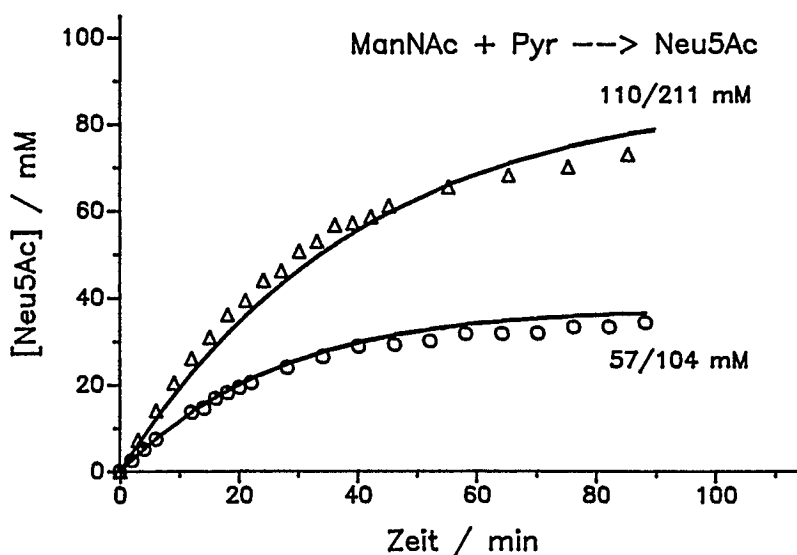


Abb. 3.3.3-6: Konzentrations-Zeit-Verläufe der Synthese von Neu5Ac (Ausschnitt)

Die Abnahme der Enzymaktivität mit steigenden Konzentrationen kann mit der zunehmenden Viskosität der Lösung begründet werden. Die zunehmende Ionenstärke hat keinen Einfluß, wie durch Zusatz von inerten Elektrolyten, die die Viskosität nur wenig erhöhen, gezeigt werden kann. Eine ausführliche Diskussion hierzu ist in Kapitel 3.3.5 zu finden. Eine Substratüberschußinhibition kann auf Grund der Ergebnisse der Messungen zur Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ausgeschlossen werden (siehe unten). Denkbar wäre, daß die Konzentration der Form des ManNAc, die letztendlich am Enzym gebunden wird (offenkettig, Ringform),

durch die Gesamtkonzentration beeinflusst wird. Für das quantitative Verständnis der Kinetik ist die Einführung einer effektiven Enzymkonzentration ausreichend, zumal ein Zusammenhang zwischen der verringerten Enzymaktivität (angegeben in Prozent Restaktivität) und der Substratkonzentration für die Synthesereaktion besteht (Abbildung 3.3.3-7). Mathematisch kann die Restaktivität als Funktion der Gesamtkonzentration mit Hilfe von Gleichung 3.3.3-1, die formal eine nicht-kompetitive Inhibierung angibt, beschrieben werden. In erster Näherung wird dabei die Abnahme der Gesamtkonzentration auf Grund der Molzahlverminderung mit zunehmendem Umsatz nicht berücksichtigt. Die gleiche Beziehung beschreibt auch die Inhibierung der Spaltreaktion mit steigender Neu5Ac-Konzentration.

$$A_{\text{Rest}} = 100 * \frac{1}{1 + ([\text{ManNAc}]_0 + [\text{Pyr}]_0 + [\text{Neu5Ac}]_0) / K_v} \quad (3.3.3-1)$$

mit: A_{Rest} % Restaktivität
 K_v mol/L "Inhibierungskonstante" zur Beschreibung des Konzentrationseinflusses

Aus den in Abb. 3.3.3-7 gezeigten Meßwerten errechnet sich K_v zu 1556 mM. Gleichung 3.3.3-1 wird auch zur Abschätzung der Enzymaktivität beim Vergleich von berechneten und experimentellen Betriebspunkten für den Einsatz der Aldolase im kontinuierlichen Prozeß benutzt.

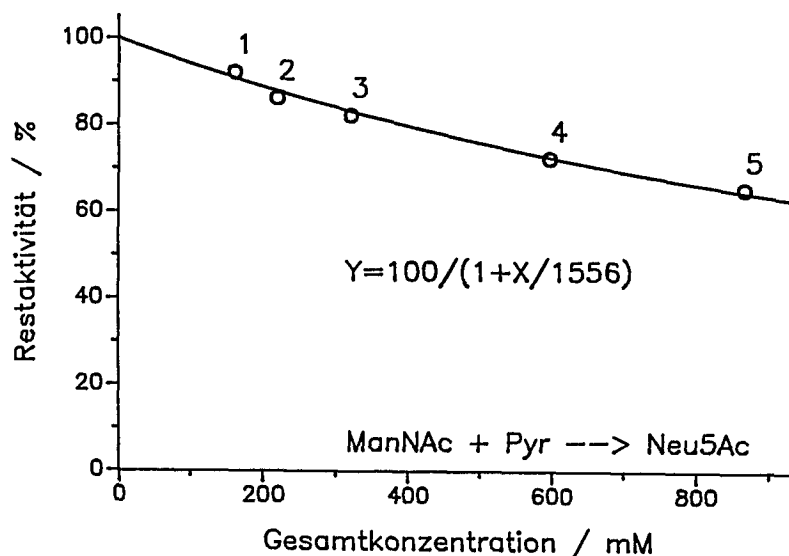


Abb. 3.3.3-7: Restaktivität als Funktion der Gesamtsupstratkonzentration (Synthese); die Zahlen geben die Versuchsnummer an

Abbildung 3.3.3-8 zeigt die Konzentrations-Zeit-Verläufe für die Spaltung von Neu5Ac.

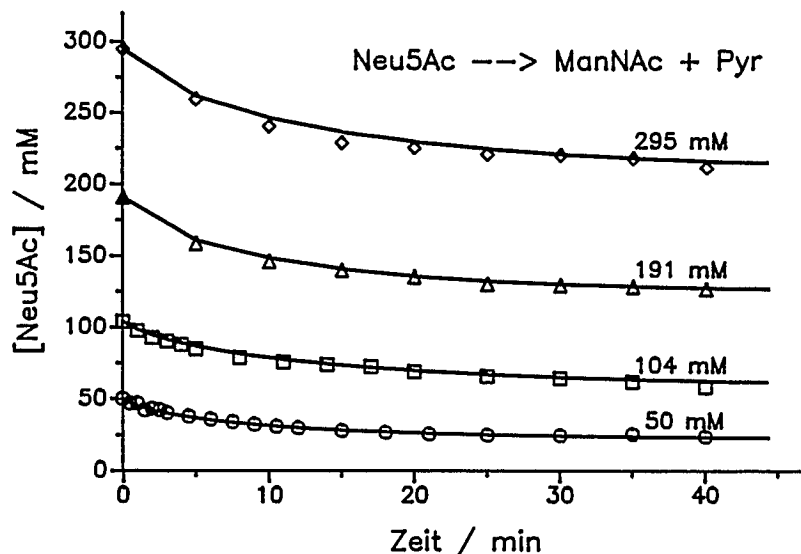


Abb. 3.3.3-8: Konzentrations-Zeit-Verläufe der Spaltung von Neu5Ac mit Angabe der Neu5Ac-Konzentrationen (Satzreaktorversuche)

Um zu zeigen, daß keine vorgelagerten Reaktionen wie z. B. die Mutarotation der Zucker geschwindigkeitsbestimmend sind, wurden die Versuche 10-12 bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Unter Berücksichtigung der effektiven Enzymaktivität von 82% ergibt sich auch hier eine gute Übereinstimmung von experimentellen Daten und Simulation. Dies ist ein Indiz dafür, daß alle wesentlichen Einflußgrößen bei der Erstellung des Modells und der Parameterbestimmung berücksichtigt worden sind.

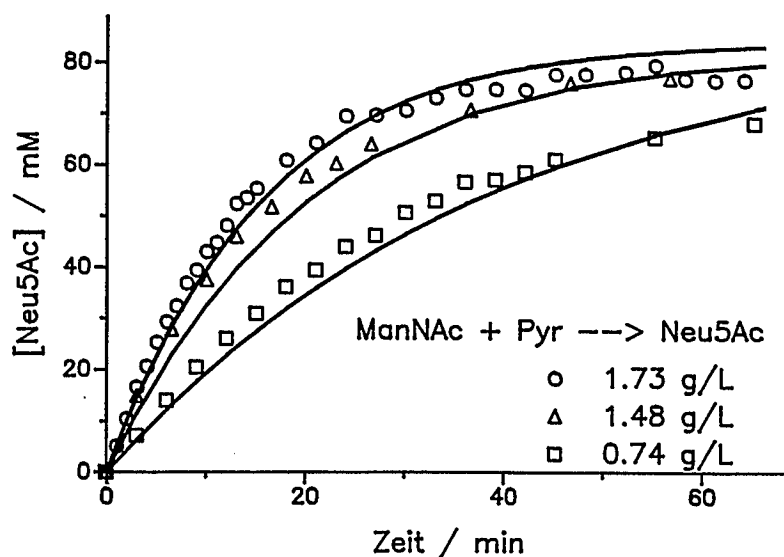


Abb. 3.3.3-9: Konzentrations-Zeit-Verläufe der Synthese von Neu5Ac bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen (angegeben sind die effektiven Enzymkonzentrationen); 110 mM ManNAc, 211 mM Pyr

Tabelle 3.3.3-3 zeigt die aus den Satzreaktorversuchen ermittelten kinetischen Parameter der Neu5Ac-Aldolase unter den gewählten Standardbedingungen (25 °C, pH 7,5). Zur Orientierung ist die zugehörige Geschwindigkeitsgleichung ebenfalls angegeben. Gleichung 3.3.3-2 setzt sich aus Gl. 3.3.2-16 zur Beschreibung der Geschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese und Gl. 3.3.3-1 zur Beschreibung des Konzentrationseinflusses auf die Enzymaktivität zusammen.

$A_{\max}^H$	230,5	µkat/g
	13,8	U/mg
$A_{\max}^R$	141,8	µkat/g
	8,51	U/mg
$K_m^A = K_m^{Pyr}$	0,136	mmol/L
$K_m^B = K_m^{ManNAc}$	402,2	mmol/L
$K_m^P = K_m^{Neu5Ac}$	9,44	mmol/L
$K_i^A = K_i^{Pyr}$	1,301	mmol/L
$K_i^B = K_i^{ManNAc}$	23,76	mmol/L
K_v	1556	mmol/L
K_{eq}^A	29,36	L/mol

Tab. 3.3.3-3: Kinetische Konstanten der Neu5Ac-Aldolase

$$v_1 = \frac{[E]_{Ald} \cdot \left(\frac{A_{\max}^H \cdot [A] \cdot [B]}{K_i^A \cdot K_m^B} - \frac{A_{\max}^R \cdot [P]}{K_m^P} \right) \cdot \frac{1}{1 + ([A]_0 + [B]_0 + [P]_0) / K_v}}{1 + \frac{[A]}{K_i^A} + \frac{K_m^A \cdot [B]}{K_i^A \cdot K_m^B} + \frac{[A] \cdot [B]}{K_i^A \cdot K_m^B} + \frac{[P]}{K_m^P} + \frac{[P] \cdot [B]}{K_i^B \cdot K_m^P}} \quad (3.3.3-2)$$

Im folgenden sollen die ermittelten Werte kurz diskutiert werden:

- Die kinetischen Parameter beschreiben eine Formalkinetik, die auf Grund der Art der Bestimmung geeignet ist, Reaktionsgeschwindigkeiten für den gesamten Umsatzbereich bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu berechnen. Dies ist die erste vollständige Beschreibung aller Substrat- und Produkt-einflüsse auf die Kinetik der Neu5Ac-Aldolase.
- Ein direkter Vergleich der ermittelten Konstanten mit Literaturwerten ist nicht möglich, da dort Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten z. B. nur der Spaltung untersucht wurden. So wird für die Spaltung ein K_m^{Neu5Ac} von etwa 3 mM angegeben (Uchida et al., 1984; Toyobo, 1991; Aisaka, 1991).
- Bei Neu5Ac und ManNAc wurden die Gesamtkonzentrationen verwendet; eine Unterscheidung zwischen Furanose- und Pyranoseform, α- und β-Anomer und offenkettiger Form erfolgte nicht (weitere Angaben hierzu finden sich im Kap. 3.4, Mutarotation). Möglicherweise ist der hohe K_m -Wert für ManNAc darauf zurückzuführen, daß die vom Enzym gebundene Form nur zu einem geringen prozentualen Anteil in der Lösung vorliegt (vgl. Kap. 3.3.2; Kim et al., 1988).

- Das Enzym zeigt die höchste Affinität gegenüber Pyr; die Spaltung von Neu5Ac wird durch Pyr sehr stark inhibiert. Dies zeigt sich auch in den Messungen zur Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (vgl. folgenden Abschnitt).
- Auf Grund des Modells wird keine Inhibierungskonstante des Produktes Neu5Ac auf die Synthesereaktion benötigt.

Beschreibung von Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit durch das Modell

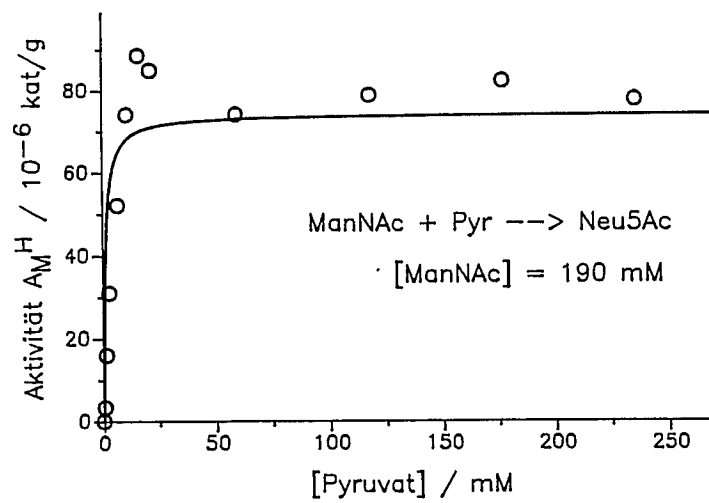
Durch die Satzreaktorversuche wurden kinetische Parameter ermittelt, die über den gesamten Umsatzbereich gültig sind. Sie können auch benutzt werden, um Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu beschreiben, wie im folgenden gezeigt wird.

Die Abbildungen 3.3.3-10 und 3.3.3-11 zeigen die massenspezifische Aktivität der Neu5Ac-Aldolase als Funktion der Substrat- bzw. inhibierenden Produktkonzentrationen. Die jeweils unveränderten Konzentrationen sind in den Diagrammen angegeben. Zur Berechnung der Kurven wurden die in Tab. 3.3.3-3 angegebenen kinetischen Parameter und die Geschwindigkeitsgleichung 3.3.2-16 verwendet. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dabei auf die Enzymmenge normiert, um die massenspezifische Aktivität zu erhalten.

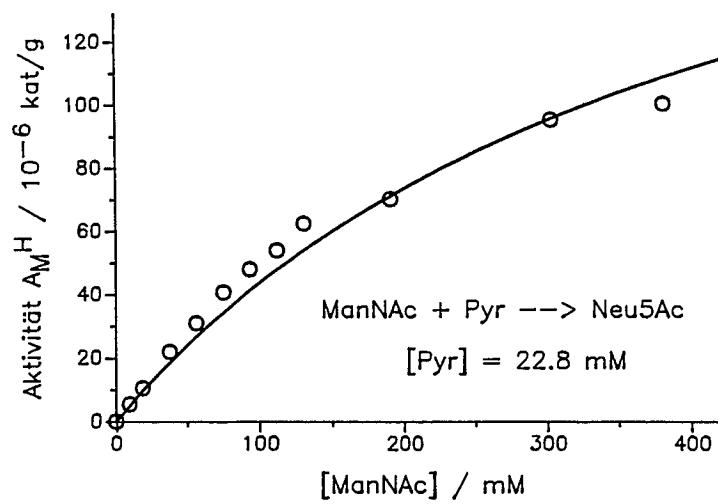
Genau wie bei den Satzreaktorversuchen werden die experimentellen Daten sehr gut durch das Modell beschrieben. Im folgenden sollen einige Beobachtungen diskutiert werden:

- Da das Enzym Pyr und ManNAc oder Neu5Ac als Substrat binden kann und entweder die Synthese oder Spaltung von Neu5Ac katalysiert, treten für beide Reaktionen im Verhalten gegenüber den Substraten bzw. Reaktionsprodukten Regelmäßigkeiten auf. Eine große Affinität des Enzyms gegenüber Pyruvat als Substrat, erkennbar am kleinen K_m -Wert, bewirkt entsprechend eine starke Inhibierung der Spaltung durch das Spaltprodukt Pyr (vgl. Abb. 3.3.3-10A und 3.3.3-11B). Das Enzym bindet Pyr sehr gut, so daß für die Spaltungsreaktion bereits bei kleinen Pyr-Konzentrationen nur noch wenig freies Enzym zur Verfügung steht. In gleicher Weise zeigt der große K_m -Wert für ManNAc an, daß auch die Spaltung durch das entstehende Produkt nur wenig inhibiert wird (vgl. Abb. 3.3.3-10B und 3.3.3-11C). Der im Vergleich zu den Werten für Pyr relativ große K_m -Wert für Neu5Ac ist mit einer deutlich schwächeren Inhibierung der Synthese durch die gebildete Neu5Ac verbunden (vgl. Abb. 3.3.3-11A und 3.3.3-10C).
- Bei den Messungen zum Einfluß der Pyr-Konzentration könnte auf Grund der höheren beobachteten Aktivitäten bei etwa 20 mM eine nur schwach ausgeprägte Substratüberschußinhibierung diskutiert werden (Abb. 3.3.3-10A). Da aber bei der Produktion von Neu5Ac mit Pyr-Überschuß gearbeitet wird, lagen die Konzentrationen selbst bei hohem Umsatz über 50 mM. Für diesen Konzentrationsbereich werden die Meßwerte gut durch das Modell beschrieben, so daß eine Erweiterung nicht nötig ist.

A



B



C

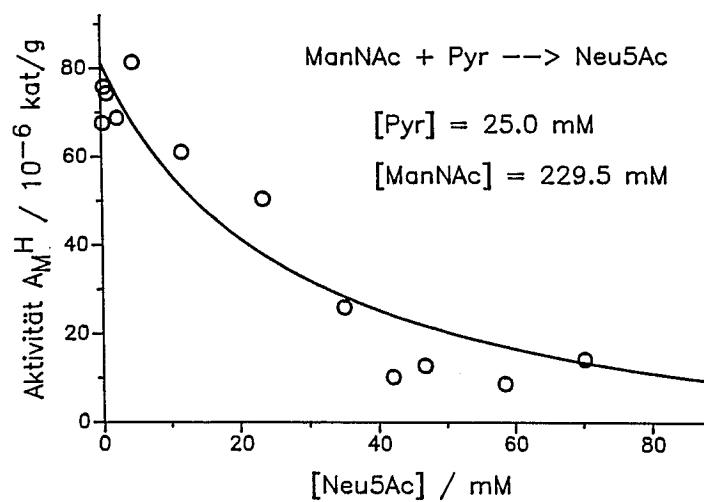


Abb. 3.3.3-10: Massenspezifische Aktivität der Synthese von Neu5Ac
Standardbedingungen; Aldolase $\approx 30 \mu\text{g/mL}$

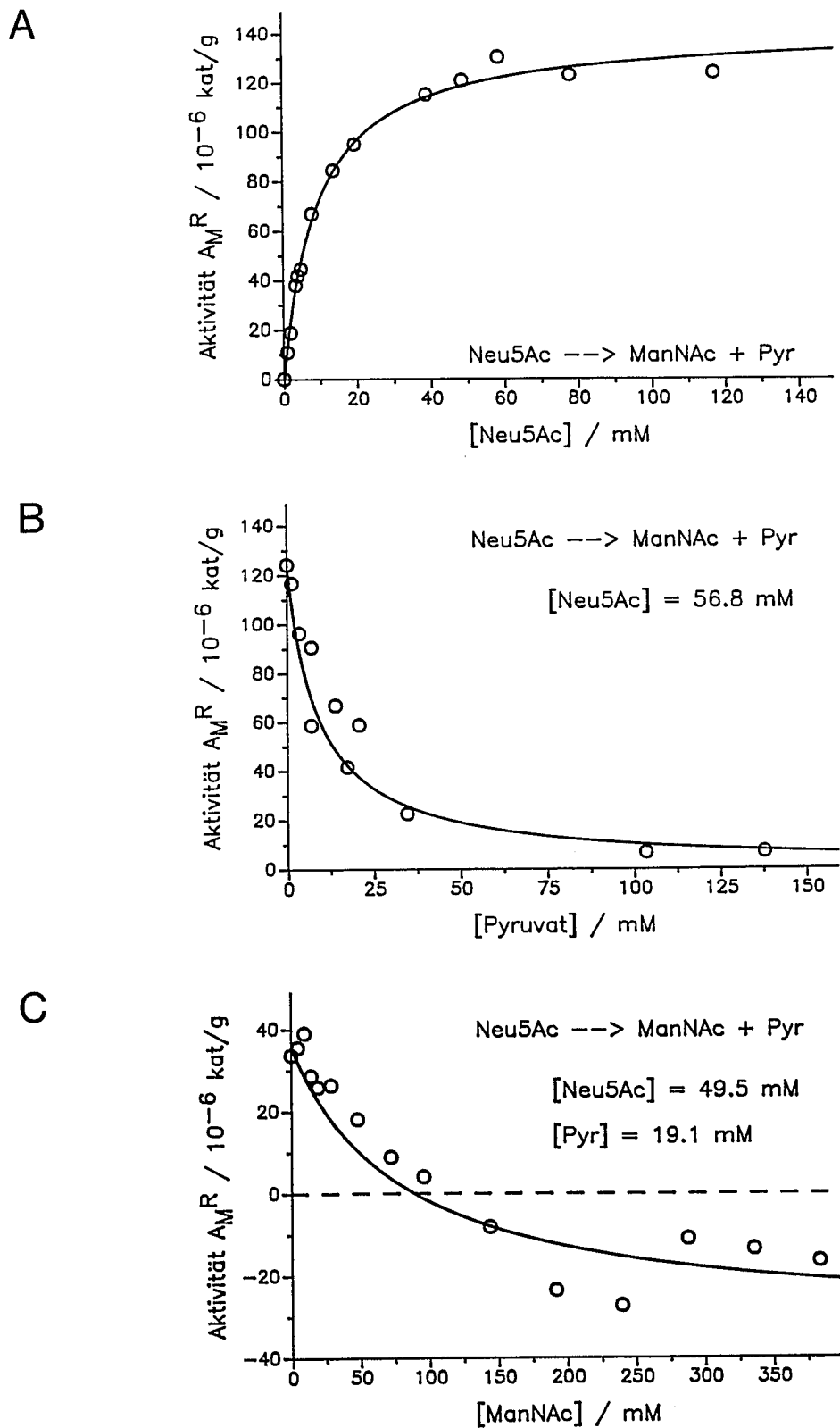


Abb. 3.3.3-11: Massenspezifische Aktivität der Spaltung von Neu5Ac
Standardbedingungen; Aldolase A, B $\approx$ 30 μ g/mL,
C $\approx$ 100 μ g/mL

- Es gibt keine Anzeichen für eine Substratüberschußinhibierung, durch die die Abnahme der Enzymaktivität in den Satzreaktorversuchen mit steigender Substratkonzentration begründet werden kann.
- Die starke Streuung der Meßpunkte bei der Untersuchung der Produktinhibierung der Synthese (Abb. 3.3.3-10C) ist durch die Meßmethode und die Genauigkeit der HPLC-Messungen gegeben. Es wurde die geringe Zunahme einer bereits recht hohen Konzentration bestimmt, was trotz Mehrfachbestimmungen zu der beobachteten Streuung führte. Neu5Ac bewirkt eine starke Inhibierung der Synthesereaktion. Bei Neu5Ac-Konzentrationen bis 160 mM erfolgt die Synthese von Neu5Ac. Bei höheren Konzentrationen kommt es auf Grund der Gleichgewichtslage zur Spaltung von Neu5Ac (vgl. auch Abb. 3.3.3-11C).
- In Abb. 3.3.3-11C ist die gleichzeitige Inhibierung der Spaltung durch ManNAc und Pyr dargestellt. Bei ManNAc-Konzentrationen bis ca. 100 mM erfolgt die Spaltung von Neu5Ac. Bei höheren Konzentrationen kommt es auf Grund der Gleichgewichtslage zur Synthese von Neu5Ac, was durch negative Aktivitätswerte beschrieben wird. Die Streuung der Meßwerte wird durch die notwendige Messung einer geringen Konzentrationszunahme der Spaltprodukte, die z. T. in recht hohen Konzentrationen vorgelegt werden, verursacht.

Schlußfolgerungen

Mit Hilfe der bestimmten kinetischen Parameter lassen sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der Synthese und Spaltung als Funktion des Umsatzes berechnen. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in Abbildung 3.3.3-12 dargestellt. Aufgetragen sind die beiden Terme aus Gleichung 3.3.2-16 für drei ausgewählte Startkonzentrationen an ManNAc und Pyr; es wurde eine Enzymkonzentration von 1 g/L verwendet. Der oben diskutierte Viskositätseinfluß auf die Enzymaktivität wurde nicht berücksichtigt.

Man erkennt, wie mit zunehmender Gesamsubstratkonzentration der erzielbare Gleichgewichtsumsatz ansteigt (Schnittpunkt der Kurven von Synthese und Spaltung). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Synthesereaktion steigt stark mit der Substratkonzentration an. Dies ist auf den hohen K_m -Wert für ManNAc von 402 mM zurückzuführen, da erst bei Konzentrationen größer 800 mM für dieses Substrat die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Durch die starke Produktinhibierung nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese mit wachsendem Umsatz stark ab. Auf Grund der zunehmenden Inhibierung durch Pyr und ManNAc fällt die Geschwindigkeit der Spaltung mit steigender Substratkonzentration leicht ab.

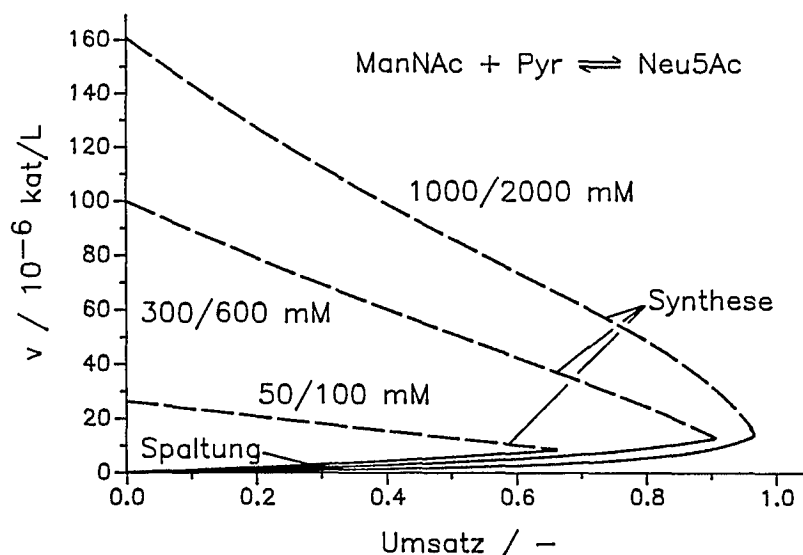


Abb. 3.3.3-12: Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Synthese von Neu5Ac; Substratkonzentrationen in der Zeichnung angegeben (ManNAc/Pyr); 1 g/L Aldolase

In Tab. 3.3.3-4 sind die Gleichgewichtsumsätze, die sich aus der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^A nach Gl. 3.2-7 berechnen lassen, denen gegenübergestellt, die sich unter Verwendung der kinetischen Parameter berechnen lassen. Letztere entsprechen den Schnittpunkten der in Abb. 3.3.3-12 dargestellten Kurven für die Synthese und die Spaltung. Für alle hier betrachteten Konzentrationen findet man für den erzielbaren Gleichgewichtsumsatz eine sehr gute Übereinstimmung. Auch die aus dem Gleichgewichtsumsatz berechneten Werte für die Gleichgewichtskonstante zeigen eine gute Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert von 29,4 L/mol.

[ManNAc] ₀ mM	[Pyr] ₀ mM	$U_{gl}^{1)}$ -	$U_{gl}^{2)}$ -	$K_{eq}^A^{2)}$ L/mol
50	100	0,665	0,660	29,0
300	600	0,906	0,900	27,3
1000	2000	0,970	0,967	28,4

Tab. 3.3.3-4: Vergleich der aus thermodynamischen und kinetischen Parametern berechneten Gleichgewichtsumsätze

1) berechnet aus der experimentell bestimmten Gleichgewichtskonstanten $K_{eq}^A = 29,4$ L/mol

2) berechnet aus den in Abb. 3.3.3-12 dargestellten Kurven auf der Basis der kinetischen Parameter

Aus den vorgestellten Ergebnissen ergibt sich, daß neben der Thermodynamik auch die Kinetik der Neu5Ac-Synthese für die Durchführung der Reaktion bei möglichst hohen Substratkonzentrationen spricht.

Mit Kenntnis der Kinetik ergeben sich für die optimalen Reaktionsbedingungen die in Tabelle 3.3.3-5 aufgelisteten Aspekte:

	Thermodynamik	Kinetik	Stabilität
Temperatur	<u>25 °C</u> ¹⁾	<u>25 °C</u> ¹⁾	niedrig (?)
pH	-	<u>7,5</u>	optimal
Konzentration	hoch	<u>hoch</u>	?

Tab. 3.3.3-5: Optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese (2):
 -: kein Einfluß, ?: noch unklar, (?): vermutlich; ¹⁾ günstigster Kompromiß; neue Werte unterstrichen

Zusammenfassung

- Die vollständige Kinetik der Neu5Ac-Aldolase wurde aus Satzreaktorversuchen bestimmt. Dadurch ist sie über den gesamten Umsatzbereich und auch bei hohen Ausgangskonzentrationen gültig. Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit dienten zur Kontrolle der kinetischen Parameter und lieferten zusätzliche Informationen.
- Das verwendete kinetische Modell beschreibt die Kinetik und die Gleichgewichtslage der Reaktion korrekt, wenn man Viskositätseinflüsse auf die Enzymaktivität berücksichtigt.
- Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen bestätigen die auf Grund der Thermodynamik festgelegten Reaktionsbedingungen: 25 °C, möglichst hohe Substratkonzentrationen.

3.3.4 Stabilität der *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase

Für den Einsatz in kontinuierlichen Prozessen spielt die Enzymstabilität unter Betriebsbedingungen eine entscheidende Rolle. Eine gute Langzeitstabilität ermöglicht stabile Betriebszustände über längere Zeiträume hinweg und führt zu niedrigen produktmengenspezifischen Enzymkosten. In diesem Kapitel soll aufgezeigt werden, wie durch die Auswahl geeigneter Werkstoffe die Stabilität der Neu5Ac-Aldolase auf einfache Weise erhöht werden kann.

Bossow-Berke (1989) hatte für die Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase aus Kaninchenmuskel gefunden, daß zahlreiche, zum Bau von Enzym-Membran-Reaktoren im Labormaßstab verwendete Materialien das Enzym desaktivieren. Auf diesen Arbeiten aufbauend wurde auch für die Neu5Ac-Aldolase der Einfluß dieser Materialien untersucht. In Abbildung 3.3.4-1 ist die relative Aktivität der Neu5Ac-Aldolase bei Inkubation in einem Polypropylen-Reaktionsgefäß ("Eppendorf-Cup", Volumen 1,5 mL), einem herkömmlichen EMR aus Edelstahl 1.4571 (gemeinhin als "V4A-Stahl" bezeichnet) und einem aus Polypropylen gefertigten EMR als Funktion der Zeit aufgetragen.

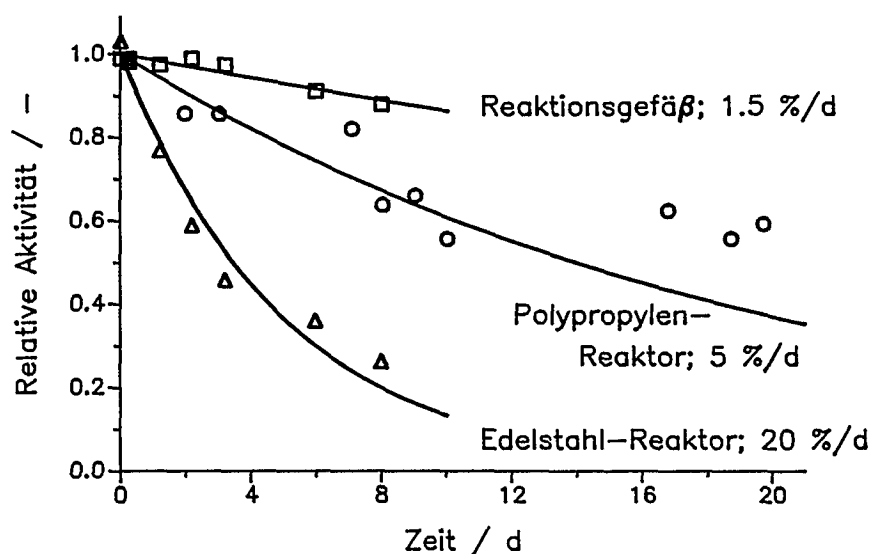


Abb. 3.3.4-1: Aktivität der Neu5Ac-Aldolase als Funktion der Zeit in Enzym-Membran-Reaktoren aus verschiedenen Werkstoffen
Bedingungen: pH 7,5; 25 °C; 50 mM KH_2PO_4 ;
Aldolase $\approx 30 \mu\text{g/mL}$

Man sieht deutlich, daß im aus Polypropylen gefertigten EMR die Enzymdesaktivierung deutlich geringer ist als im EMR aus Edelstahl. Die Wahl von Polypropylen (PP DWU der Firma Simova, Kirn) erfolgte auf Grund der guten Stabilität des inkubierten Enzyms in den aus ähnlichem Material bestehenden Reaktionsgefäßen (Kragl et al., 1991b). In den kontinuierlichen Prozessen wurden für den Polypropylen-EMR entsprechende Desaktivierungsraten gefunden (vgl. Kap. 3.5.3).

Neben dem "Komplettsystem" EMR wurde die Stabilität der Aldolase in Gegenwart verschiedener Materialien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.4-2 zusammengefaßt. Die Ermittlung der Desaktivierung erfolgte unter Standardbedingungen (pH 7,5; 25 °C, Puffer), indem etwa gleichgroße Materialstückchen zusammen mit der Enzymlösung in Reaktionsgefäßen (Volumen 1,5 mL) inkubiert wurden. Die Enzymaktivität wurde durch Probenahme in geeigneten Zeitintervallen bestimmt. Die angegebenen Schlauchmaterialien wurden untersucht, da sie für den Aufbau eines Enzym-Membran-Reaktors mit 70 mL Volumen benötigt wurden (vgl. Kap. 3.5.4; Appel, 1990).

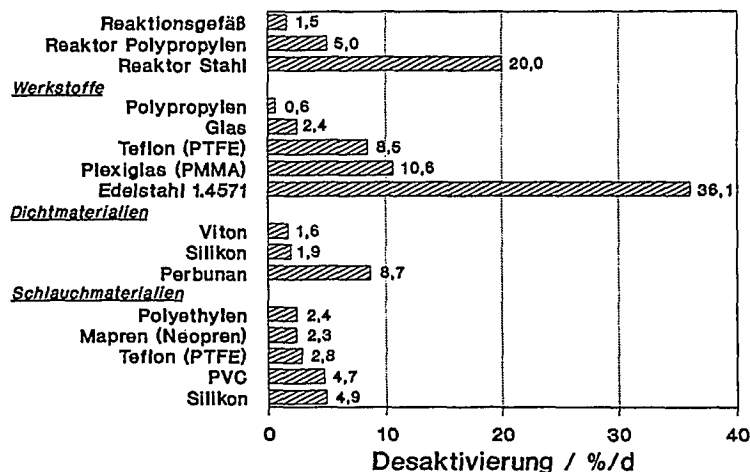


Abb. 3.3.4-2: Desaktivierungskonstanten der Neu5Ac-Aldolase in Gegenwart verschiedener Werkstoffe
Bedingungen wie in Abb. 3.3.4-1

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen keinen Rückschluß auf die Mechanismen der Enzymdesaktivierung zu. Ebenso ist ein Vergleich der Zahlwerte nur beschränkt möglich, da z. B. der Einfluß unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheiten (gesägt, poliert, gebeizt usw.) nicht näher untersucht werden konnte. Trotzdem zeigen diese Ergebnisse, daß die Auswahl geeigneter Werkstoffe eine wichtige Rolle spielt.

Ein großer Materialeinfluß auf die Enzymstabilität wurde auch für die Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* gefunden (Peters, 1990). Die Verwendung von Polypropylen an Stelle von Edelstahl für den EMR verringerte die gefundene Desaktivierung von 47 %/d auf 32 %/d. Nach Ersatz des verwendeten Dichtrings im EMR aus Perbunan durch einen aus Silikongummi (Fa. Seybold, Düren) war über 5 Tage hinweg keine Aktivitätsabnahme der TBADH mehr feststellbar. Der desaktivierende Einfluß von Perbunan wurde auch für die Neu5Ac-Aldolase gefunden.

Alle kontinuierlichen Experimente mit Ausnahme der Synthese von Neu5Ac im größeren Maßstab wurden daher im Polypropylen-EMR unter Verwendung von Dichtringen aus Silikongummi durchgeführt.

Der Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Stabilität der Neu5Ac-Aldolase wurde nur in beschränktem Umfang untersucht, da durch die Gleichgewichtslage eine möglichst niedrige Temperatur gefordert wird (vgl. Kap. 3.2). Messungen bei 15, 25 und 35 °C zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Desaktivierungsraten von 1-2 %/d. Ebenso brachte die Inkubation mit Substraten (ManNAc, Pyr) bei diesen Temperaturen keine Verbesserung der Stabilität, obwohl in der Literatur von einer Verbesserung der Thermostabilität der Neu5Ac-Aldolase bei Anwesenheit der Substrate berichtet wird (Kolis et al., 1980; Aisaka et al., 1991). Allerdings wurden diese Effekte bei Temperaturen über 70 °C beobachtet. Wahrscheinlich wird durch die Bindung des Substrates die Aktivierungsenergie der Enzymdesaktivierung heraufgesetzt, was aber bei den hier untersuchten niedrigeren Temperaturen noch keine Rolle spielt.

Zusammenfassung

- Als wesentliche Einflußgröße auf die Stabilität der Neu5Ac-Aldolase wurden die für den Enzym-Membran-Reaktor verwendeten Materialien identifiziert.
- Die im Polypropylen-EMR gefundene Desaktivierung von 5 %/d ist niedrig genug, um das Enzym in löslicher Form für die Produktion von Neu5Ac einsetzen zu können. Der niedrige Preis der Aldolase (20000 U für 760,- DM entsprechend ca. 10000 U für die Synthese unter den hier gewählten Bedingungen) macht weitere Untersuchungen zur Stabilisierung durch Trägerfixierung oder Zusätze nicht erforderlich.
- Die optimale Reaktionstemperatur wird durch die Gleichgewichtslage der Reaktion, nicht durch die Enzymstabilität bestimmt.
- Der pH-Einfluß auf die Enzymstabilität wurde nicht untersucht; alle Untersuchungen wurden bei pH 7,5 durchgeführt.
- Ein Einfluß der Substrate auf die Enzymstabilität wurde nicht gefunden.

Damit läßt sich Tabelle 3.3.3-1 bzw. 3.3.3-4 mit den optimalen Reaktionsbedingungen vervollständigen:

	Thermodynamik	Kinetik	Stabilität
Temperatur	25 °C	25 °C	<u>25 °C</u>
pH	-	7,5	<u>7,5</u>
Konzentration	hoch	hoch	<u>-</u>

Tab. 3.3.4-1: Optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese (3):
-: kein Einfluß; ¹⁾ günstigster Kompromiß; neue Werte unterstrichen

Die Festlegung der optimalen Konzentrationen mit Hilfe von Modellierungen wird in Kap. 3.5.2 beschrieben.

3.3.5 Einfluß der Viskosität des Reaktionsmediums auf die Aktivität der *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase

Die Aktivität von Enzymen ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Makroskopisch läßt sich die Enzymaktivität z. B. als Funktion des pH-Wertes oder der Substratkonzentration beschreiben.

Wie sich bei der Ermittlung der kinetischen Parameter der Aldolase aus Satzreaktorversuchen gezeigt hat, spielen weitere Faktoren eine Rolle, die durch die übliche formalkinetische Beschreibung nicht erfaßt werden können. Obwohl aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten keine Substratüberschußinhibition gefunden wurde, mußte zur vollständigen Anpassung des Modells an die experimentellen Daten eine mit zunehmender Substratkonzentration abnehmende Enzymaktivität definiert werden (vgl. Kap. 3.3.3). Im folgenden soll gezeigt werden, daß dieser Aktivitätsrückgang durch die zunehmende Viskosität des Reaktionsmediums erklärt werden kann.

Der Einfluß der Viskosität des Reaktionsmediums wurde für verschiedene Enzyme untersucht. Eine gute Übersicht und Erklärung dieses Phänomens findet sich in dem Buch "The Fluctuating Enzyme", herausgegeben von G. R. Welch (1986) und der darin zitierten Literatur. Die Grundidee soll hier kurz skizziert werden (Gavish et al., 1979):

- Die Theorie des aktivierten Komplexes beschreibt als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt den Übergang des Enzym-Substrat-Komplexes über die Energiebarriere.
- Der Enzym-Substrat-Komplex wechselwirkt auf zwei Arten mit den Lösungsmittelmolekülen: zufällige Kollisionen erhöhen die kinetische Energie des Komplexes, während Scherkräfte zu einer Verringerung des Energieinhalts führen. Anschaulich nimmt die Mobilität der Partikel mit steigender Viskosität ab.
- Eine quantitative Beschreibung des Prozesses liefert die Beziehung, daß die Geschwindigkeitskonstante k umgekehrt proportional der dynamischen Viskosität η ist:

$$k = f (1/\eta)$$

mit:	k	1/s	Geschwindigkeitskonstante
	η	Pa*s	dynamische Viskosität

Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Viskosität ist für eine Reihe von Enzymen getestet und bestätigt worden (Welch, 1986). Es wurden jedoch auch Ausnahmen beobachtet, bei denen es zu einer Aktivitätszunahme kam (Varga et al., 1978). Andere Autoren fanden, daß die Viskosität des Reaktionsmediums allein nicht ausreicht, um die beobachteten Effekte zu erklären (Damjanovich et al., 1972; Jancsik et al., 1975/76). Je nach verwendetem Viskositätserhöher wurden unterschiedliche Aktivitätsabnahmen gefunden, was mit einer zusätzlichen Änderung der Konformation des Enzyms erklärt wurde.

Bei allen bisher beschriebenen Untersuchungen wurden inerte Alkohole oder Polymere zugesetzt, um die Viskosität zu erhöhen. Untersuchungen zum Einfluß der

Viskositätserhöhung durch die Substrate sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

Für die Neu5Ac-Aldolase wurde der Einfluß folgender Substanzen auf die Syntheseaktivität untersucht und mit der resultierenden Viskosität des Reaktionsmediums korreliert: Glycerin, Polyethylenglycol 400, NaCl, GlcNAc, Bernsteinsäure und 2-Methylbuttersäure. Die Auswahl ist willkürlich, es wurden jedoch ionogene und nicht-ionogene Substanzen untersucht. NaCl diente zur Untersuchung des Einflusses hoher Ionenstärken. Die Untersuchungen wurden folgendermaßen durchgeführt:

- Für einen geeigneten Konzentrationsbereich (ca. 0 bis 500 mM) wurden zunächst die Viskositäten der Lösungen bestimmt. Es wurde ein Rheometer Rotovisco RV 100 (Haake, Karlsruhe) verwendet, bei dem die laminare Scherströmung zwischen einem rotierenden und einem coaxial feststehenden Zylinder gemessen wird (Römpf, 1990). Jede Messung wurde mindestens zweimal durchgeführt und die erhaltenen dynamischen Viskositäten gemittelt. Meßbedingungen: 3 mL Probenvolumen, 25 °C, pH 7,5, 50 mM KH_2PO_4 .
- Für die gleichen Konzentrationen der gelösten Substanzen wurde die Aktivität der Neu5Ac-Aldolase in Syntheserichtung bestimmt. Meßbedingungen: 100 mM ManNAc, 100 mM Pyr, 25 $\mu\text{g/mL}$ Aldolase, 25 °C, pH 7,5, 50 mM KH_2PO_4 .

Wie Abbildung 3.3.5-1 zeigt, steigt die Viskosität mit steigender NaCl-Konzentration nur geringfügig an; ebenso nimmt die Enzymaktivität nur wenig ab. Damit beeinflusst die Ionenstärke der Lösung die Enzymaktivität nicht; die beobachtete Abnahme bei den Satzreaktorversuchen muß also auf andere Ursachen zurückgeführt werden. Für Bernsteinsäure ergibt sich ein ähnliches Bild; beide Effekte sind etwas stärker ausgeprägt.

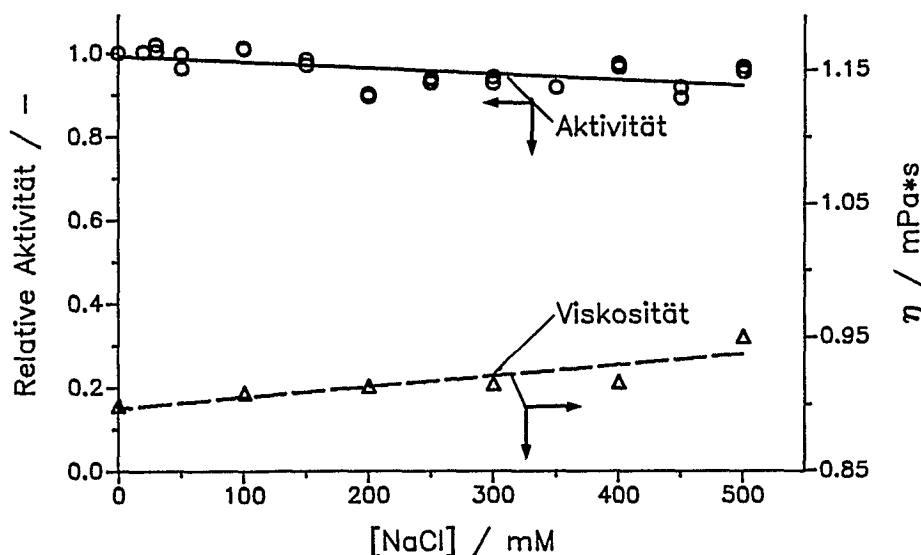


Abb. 3.3.5-1: Dynamische Viskosität des Reaktionsmediums und Aktivität der Neu5Ac-Aldolase als Funktion der NaCl-Konzentration
Bedingungen vgl. Text

In Abbildung 3.3.5-2 ist die Enzymaktivität als Funktion der Viskosität für die restlichen untersuchten Substanzen dargestellt. Man erkennt deutlich, daß neben der Viskosität noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen, da z. B. Glycerin im Gegensatz zu Polyethylenglycol 400 bei geringen Viskositäten eine sehr große Desaktivierung bewirkt. Anscheinend kommt es je nach Substanz zu spezifischen Wechselwirkungen mit dem Enzym, die jedoch nicht weiter untersucht wurden.

Die schraffierten Bereiche in Abbildung 3.3.5-2 markieren die Viskositätsbereiche, die bei Messung verschiedener Substratlösungen und der daraus erhaltenen Produktlösungen aus den Satzreaktorversuchen und kontinuierlichen Experimenten (vgl. Kap. 3.5.3) gefunden wurden.

Die Viskosität von Wasser bei 25 °C beträgt 0,912 mPa*s (Barrow, 1977).

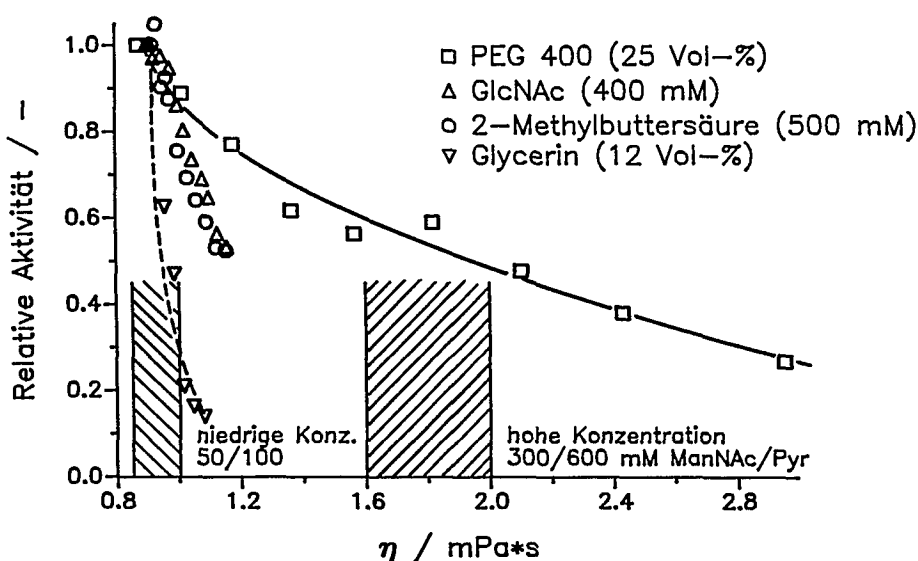


Abb. 3.3.5-2: Aktivität der Neu5Ac-Aldolase als Funktion der dynamischen Viskosität; die Zahlen in Klammern geben die größte verwendete Konzentration der Substanz an; Bedingungen vgl. Text

Die Ergebnisse zeigen, daß die Viskosität des Reaktionsmediums eine mögliche Erklärung für die in den Satzreaktorversuchen und kontinuierlichen Experimenten gefundene Abnahme der Enzymaktivität mit zunehmender Substratkonzentration ist. Mit Hilfe der kontinuierlichen Versuche konnte durch Wechsel der Substratkonzentrationen gezeigt werden, daß die Aktivitätsabnahme reversibel ist! Unter der Annahme, daß bei Zusatz von PEG 400 reine Viskositätseffekte zu einer Aktivitätsabnahme führen, beschreibt diese Kurve in Abb. 3.3.5-2 recht gut die ermittelten effektiven Enzymaktivitäten (vgl. Kap. 3.3.3) als Funktion der Viskosität der Substratlösungen. Auf eine eingehende quantitative Beschreibung und Berücksichtigung in der Geschwindigkeitsgleichung für die enzymatische Neu5Ac-Synthese wurde verzichtet. Statt dessen wird, wenn nötig, eine effektive Enzymkonzentration verwendet, um Modellierungen an experimentelle Daten anzupassen.

In Kap. 5.3.1 wird bei der Beschreibung des gekoppelten Systems aus Aldolase und Epimerase gezeigt, daß der inhibierende Einfluß des GlcNAc ebenfalls mit Gl. 3.3.3-1 beschrieben werden kann.

Zusammenfassung

- Die Aktivität der Neu5Ac-Aldolase nimmt mit zunehmender Viskosität des Reaktionsmediums ab. Damit läßt sich auch die abnehmende Aktivität mit steigender Substratkonzentration erklären (reversibler Vorgang).
- Hohe Ionenstärken allein beeinflussen die Enzymaktivität nicht.

3.4 Mutarotation von ManNAc, GlcNAc und Neu5Ac

Wäßrige Lösungen von Kohlenhydraten enthalten eine Mischung der folgenden tautomeren Formen: α - und β -Pyranose, α - und β -Furanose sowie die offenkettige Form mit der freien Carbonylfunktion. Je nach Zucker variieren die Anteile der verschiedenen Formen; der Anteil der offenkettigen Form beträgt in der Regel weniger als 0,1% (Angyal, 1984). Bei Monosacchariden, deren Mutarotation einem Zeitgesetz 1. Ordnung folgt, liegt der Anteil an Furanosen in der Gleichgewichtsmischung bei weniger als 1% (Lehmann, 1976). Da die Mutarotation von ManNAc und GlcNAc nach einer Reaktion 1. Ordnung verläuft (Morgan et al., 1974), sind in der Literatur entsprechend auch nur Anteile für die beiden pyranosen Formen zu finden (vgl. Tab. 3.4-1).

Bei enzymatischen Reaktionen, in denen nur ein Anomer umgesetzt wird, kann die Mutarotation geschwindigkeitsbestimmend werden, wenn sie deutlich langsamer verläuft als die enzymatische Umwandlung. Der Einfluß der Mutarotation beispielsweise auf die Spaltung von Lactose mit einer β -Galactosidase wurde von Flaschel beschrieben (Flaschel, 1982).

Um auszuschließen, daß im vorliegenden Fall die Mutarotation die enzymatische Reaktion beeinflusst, wurden ihre Geschwindigkeitskonstanten für die beteiligten Monosaccharide bestimmt. Durch Modellrechnungen wurde der Einfluß der Mutarotation auf die enzymatische Reaktion ermittelt.

In Abbildung 3.4-1 ist stellvertretend die Mutarotation von ManNAc dargestellt.

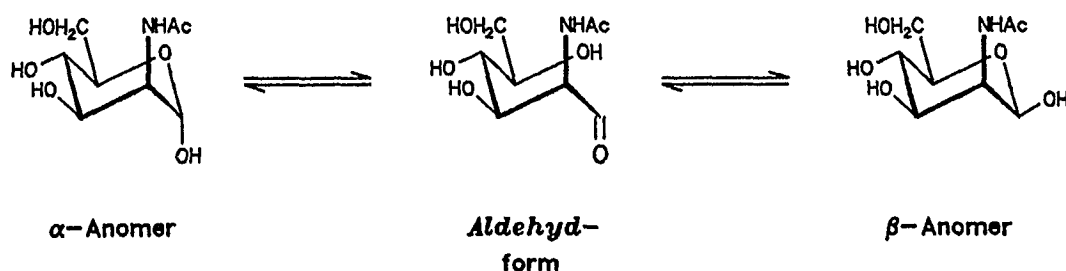


Abb. 3.4-1: Mutarotation von ManNAc

Da der Anteil der offenkettigen Form nicht bestimmt werden kann, werden bei der Aufstellung der Geschwindigkeitsgleichungen nur die Konzentrationen des α - bzw. β -Anomers verwendet (Fletcher et al., 1972; Capon et al., 1974; Butenuth et al., 1974). Es ergeben sich die folgenden Beziehungen:



mit: $k_{\alpha, \beta}$ 1/s Geschwindigkeitskonstante der Mutarotation

$$\frac{d[\alpha]}{dt} = -k_{\alpha} * [\alpha] + k_{\beta} * [\beta] \quad (3.4-2)$$

$$\frac{d[\beta]}{dt} = k_{\alpha} * [\alpha] - k_{\beta} * [\beta] \quad (3.4-3)$$

Die Gleichgewichtslage der Mutarotation wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben:

$$K_{eq}^{Mut} = \frac{[\beta]}{[\alpha]} = \frac{k_{\alpha}}{k_{\beta}} \quad (3.4-4)$$

mit: K_{eq}^{Mut} - Gleichgewichtskonstante der Mutarotation

Die Kinetik der Mutarotation wurde folgendermaßen bestimmt (Butenuth et al., 1974):

- Für verschiedene Konzentrationen des Zuckers wurde der Drehwert-Zeit-Verlauf mit Hilfe eines Polarimeters (Perkin Elmer 241) bestimmt.
Meßbedingungen: 25 °C, pH 7,5, 10 mM KH_2PO_4 , Wellenlänge 365 nm, Schichtdicke 10 cm.
- Kristallines ManNAc und Neu5Ac liegen als β -Anomer, GlcNAc als α -Anomer vor.
- Nach Bestimmung des Gleichgewichtsdrehwertes α_{eq} wird $\log(\alpha_{eq} - \alpha)$ gegen die Zeit aufgetragen (im Falle des GlcNAc bei abnehmendem α wird $\log(\alpha - \alpha_{eq})$ gegen t aufgetragen). Die erhaltenen Geraden besitzen die Steigung m , wobei $\log e = 0,434$ den dekadischen Logarithmus der Euler'schen Zahl angibt:

$$m = (k_{\alpha} + k_{\beta}) * \log e \quad (3.4-5)$$

Zur Ableitung der hier verwendeten Beziehung wird die Geschwindigkeitsgleichung 3.4-2 einer reversiblen Reaktion 1. Ordnung unter vorgegebenen Randbedingungen integriert. Die vollständige Beschreibung der Ableitung findet sich bei Butenuth et al., 1974.

- Zur Berechnung der Steigung wurden nur die Meßpunkte aus dem linearen Bereich der Kurve verwendet; aus den bei unterschiedlichen Konzentrationen ermittelten Steigungen wurde der angegebene Mittelwert berechnet.
- Durch Einsetzen von Gleichung 3.4-5 in 3.4-4 kann k_{β} berechnet werden. k_{α} ergibt sich danach aus Gleichung 3.4-5.

$$k_s = \frac{m}{(K_{eq}^{Mut} + 1) * \log e} \quad (3.4-6)$$

In Abbildung 3.4-2 ist die Mutarotation des ManNAc, in Abbildung 3.4-3 die des GlcNAc dargestellt. Die zur Rechnung verwendeten Daten sowie die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4-1 zusammengefaßt.

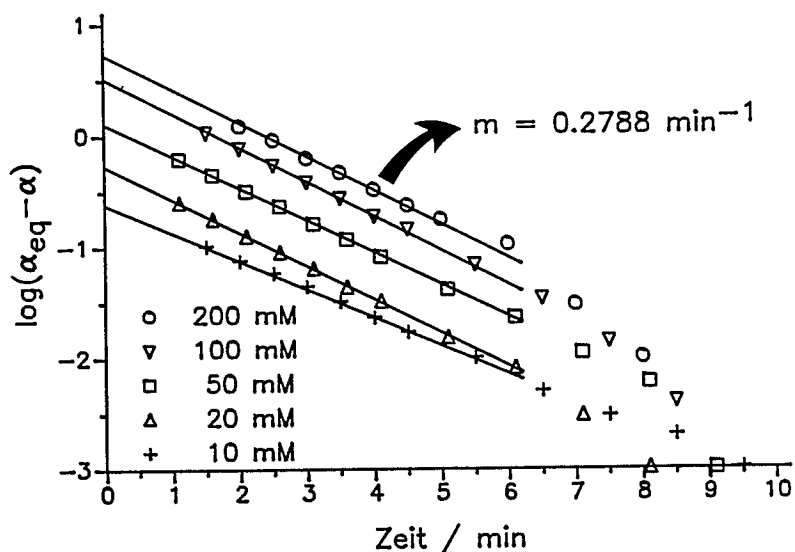


Abb. 3.4-2: Mutarotation von ManNAc; Bedingungen sind im Text angegeben

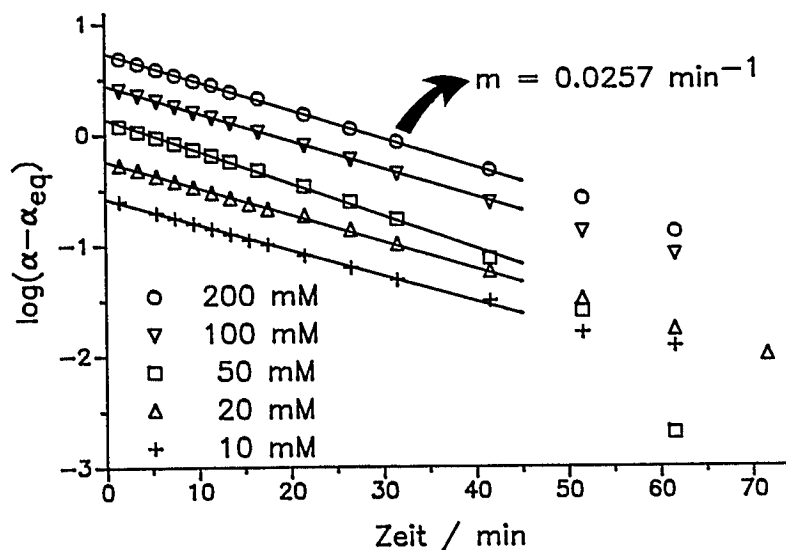


Abb. 3.4-3: Mutarotation von GlcNAc; Bedingungen sind im Text angegeben

Für Neu5Ac ist die Mutarotation nicht meßbar, da sie bei pH 7,5 selbst bei 5 °C zu schnell verläuft (eigene Messungen; Deijl et al., 1983). Die in der Tabelle angegebenen Geschwindigkeitskonstanten für die Mutarotation der Neu5Ac

wurden in D₂O für einen pD von 5,4 bestimmt. Werte für das Anomerengleichgewicht wurden aus der Literatur entnommen bzw. mit NMR bestimmt (außer GlcNAc). Diese Werte sowie die in Tabelle 3.4-1 angegebenen Literaturwerte für die Geschwindigkeitskonstanten wurden für 22 °C und D₂O ermittelt. Aus Messungen des Gleichgewichtsdrehwertes von ManNAc und GlcNAc bei verschiedenen Bedingungen (pH, Pufferkonzentrationen) konnte jedoch geschlossen werden, daß das Anomerengleichgewicht in H₂O und verdünntem Phosphatpuffer gleich ist und somit die für D₂O ermittelten Werte zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten verwendet werden können. Die Geschwindigkeit der Mutarotation steigt jedoch mit steigendem pH-Wert an (Morgan et al., 1973).

	ManNAc	GlcNAc	Neu5Ac
kristallin	β-Anomer	α-Anomer	β-Anomer
α:β	57:43 (a)	68:32 (a)	7:93 (b)
α:β (NMR)	54:46	nicht bestimmt	6:94
Steigung m	0,2788 min ⁻¹	0,0257 min ⁻¹	nicht meßbar
k _α	4,60*10 ⁻³ s ⁻¹	315,7*10 ⁻⁶ s ⁻¹	-
(Literatur)	1,47*10 ⁻³ s ⁻¹ (b)	-	380,0*10 ⁻⁶ s ⁻¹ (b)
k _β	6,10*10 ⁻³ s ⁻¹	670,5*10 ⁻⁶ s ⁻¹	-
(Literatur)	2,17*10 ⁻³ s ⁻¹ (b)	-	31,0*10 ⁻⁶ s ⁻¹ (b)

Tab. 3.4-1: Daten und Ergebnisse zur Mutarotation
Literatur: (a) Angyal, 1984; (b) Deijl et al., 1983 (pD 5,4!)

Modellrechnungen zum Einfluß der Mutarotation

Um auszuschließen, daß die Mutarotation als vorgelagerte Gleichgewichtsreaktion für die enzymatische Synthese geschwindigkeitsbestimmend wird, wurden für Satzreaktorversuche Modellrechnungen mit und ohne Einbeziehung der Mutarotation durchgeführt. Bei der Synthese von Neu5Ac ausgehend von ManNAc und Pyr ergaben sich bei hohen Enzymkonzentrationen geringfügige Unterschiede in den berechneten Konzentrations-Zeit-Kurven. Für die Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc spielt die Mutarotation auf Grund der geringen in Lösungen erreichbaren Enzymaktivität der Epimerase keine Rolle (vgl. Kap. 4.3.3). Die Durchführung und das Ergebnis der Modellrechnungen für die Aldolase-katalysierte Neu5Ac-Synthese wird im folgenden beschrieben:

- Für die Berücksichtigung der Mutarotation wurde für α-ManNAc und β-ManNAc je eine eigene Stoffbilanz erstellt (Gl. 3.4-7 und 3.4-8) (zur Stoffbilanz vgl. Kap. 3.5.2).

$$\frac{d[\alpha\text{-ManNAc}]}{dt} = -v_1 - k_\alpha * [\alpha\text{-ManNAc}] + k_\beta * [\beta\text{-ManNAc}] \quad (3.4-7)$$

mit: v_1 kat/L Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese
(vgl. Gl. 3.3.2-16)

$$\frac{d[\beta\text{-ManNAc}]}{dt} = k_\alpha * [\alpha\text{-ManNAc}] - k_\beta * [\beta\text{-ManNAc}] \quad (3.4-8)$$

- In erster Näherung wurden an Stelle der ermittelten kinetischen Konstanten für K_{mManNAc} und K_{iManNAc} gemäß dem Anomerengleichgewicht korrigierte Werte in die Gleichung für v_1 eingesetzt; eine Inhibierung durch das β -Anomer sowie die Mutarotation der Neu5Ac wurden nicht berücksichtigt.

Die Berechnungen wurden für verschiedene Substrat- und Enzymkonzentrationen durchgeführt. In Abbildung 3.4-4 sind ausgewählte Konzentrations-Zeit-Kurven für die Neu5Ac-Synthese dargestellt:

- Die Mutarotation spielt erst bei hohen Enzymkonzentrationen eine gewisse Rolle; bei Aldolasekonzentrationen kleiner 4 mg/mL ist ihr Einfluß zu vernachlässigen.
- Die Abweichung zwischen den Kurven mit und ohne Mutarotation wird mit zunehmender Substratkonzentration größer.
- Wie der Vergleich mit den eingetragenen experimentellen Daten aus den Satzreaktorversuchen bei höchster Konzentration (305 mM ManNAc, 562 mM Pyr, 1,8 mg/mL Enzym) zeigt, ist durch die Mutarotation die Abweichung zwischen Simulation und experimentellen Daten nicht zu erklären. Eine befriedigende Erklärung liefert nur die Annahme einer abnehmenden Enzymaktivität mit zunehmender Viskosität des Reaktionsmediums (vgl. Kap. 3.3.5).

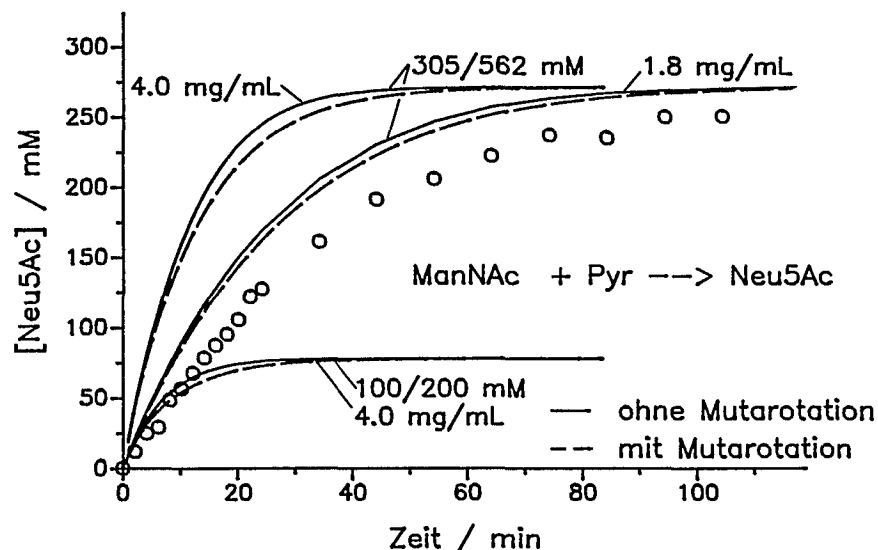


Abb. 3.4-4: Modellrechnungen zum Einfluß der Mutarotation auf die Neu5Ac-Synthese bei unterschiedlichen Substrat- und Enzymkonzentrationen; experimentelle Daten vgl. Tab. 3.3.3-2

Zusammenfassung

- Die Geschwindigkeitskonstanten der Mutarotation von ManNAc und GlcNAc bei 25 °C und pH 7,5 wurden bestimmt.
- Durch Modellrechnungen konnte gezeigt werden, daß die Mutarotation im Vergleich zur enzymatischen Reaktion schnell verläuft und daher bei Modellierungen nicht berücksichtigt zu werden braucht.

3.5 Kontinuierliche Produktion von Neu5Ac ausgehend von ManNAc

In diesem Kapitel wird nach einer kurzen Einführung die Ermittlung der optimalen Prozeßbedingungen für die kontinuierliche Neu5Ac-Produktion durch Modellrechnungen beschrieben. Neben dem experimentellen Beweis der berechneten Betriebspunkte wurde ein Experiment zur Produktion von Neu5Ac im 300-g-Maßstab durchgeführt. Damit sollte die mögliche Maßstabsvergrößerung des entwickelten Verfahrens gezeigt werden.

3.5.1 Einführung

Mit Hilfe der in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Ergebnisse (z. B. kinetische Konstanten, Enzymstabilität) lassen sich die optimalen Betriebsbedingungen für die enzymkatalysierte Synthese von Neu5Ac im kontinuierlichen Prozeß festlegen. Bei den Berechnungen und Experimenten standen folgende Punkte im Mittelpunkt des Interesses:

- Als Ziel soll ein möglichst hoher Umsatz des Substrates ManNAc bei hoher Raum-Zeit-Ausbeute an Neu5Ac erreicht werden.
- Der Pyruvatüberschuß soll auf Grund der vereinfachten Produktisolierung möglichst niedrig gehalten werden.
- Wenn wirklich die Viskosität des Reaktionsmediums die Enzymaktivität beeinflusst, muß dieser Effekt auch in den kontinuierlichen Experimenten auftreten; es sollte ein reversibler Vorgang sein, was durch den Wechsel der Substratzulaufkonzentrationen einfach gezeigt werden kann.
- Neben der Raum-Zeit-Ausbeute sind Daten zum Enzymverbrauch bzw. zur Enzymstabilität von besonderem Interesse für die Beurteilung der Wirtschaftlichkeit eines Verfahrens.

Aus folgenden Gründen wurde für die kontinuierliche Prozeßführung der Enzym-Membran-Reaktor (EMR) mit dem homogen gelösten Enzym gewählt:

- Die Stabilität der Aldolase ist ausreichend, so daß keine Maßnahmen zur Stabilitätserhöhung durch Trägerfixierung notwendig sind.
- Gegenüber einem Festbettreaktor mit trägerfixiertem Enzym ist der EMR auf Grund seines Aufbaus steril zu betreiben, so daß keine antibakteriellen Mittel erforderlich sind (z. B. NaN₃), die später vom Produkt abgetrennt werden müßten.

- Auf Grund der einfacheren Steriltechnik wurde am EMR festgehalten, obwohl auf Grund der starken Produktinhibierung (vgl. Abb. 3.3.3-12) ein Rohrreaktor besser geeignet wäre als ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR), wie ihn der EMR darstellt. Bei Bedarf könnte man Strömungsrohrverhalten durch eine aus EMRs aufgebaute Rührkesselkaskade annähern, wenn die dadurch mögliche Einsparung an Enzym bzw. die etwas größere Raum-Zeit-Ausbeute bei gleicher Enzymmenge aus wirtschaftlichen Gründen erforderlich wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Berechnung und praktische Verwirklichung verzichtet, da für die eigentliche Prozeßentwicklung keine neuen Erkenntnisse zu erwarten waren. Stattdessen wurde der weitere Schwerpunkt auf alternative Zugangswege zum ManNAc gelegt, da dies der limitierende Faktor in der durch die Neu5Ac-Aldolase katalysierten Reaktion ist.
- Der EMR ist auch in Hinblick auf die Erweiterung des Systems günstig, da mit Hilfe eines zweiten ebenfalls homogen gelösten Enzyms, der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase, das ManNAc *in situ* erzeugt werden kann (vgl. Kap. 4 und 5). In homogener Lösung wird der Stoffaustausch zwischen den Enzymen nicht durch Stofftransportlimitierungen beeinflusst, was bei trägerfixierten Enzymen der Fall sein könnte.

3.5.2 Modellrechnungen zur Ermittlung optimaler Prozeßbedingungen

Stoffbilanzen der Reaktanden

Für die Modellierung eines Reaktors sind die Stoffbilanzen für alle beteiligten Reaktanden erforderlich. Die Stoffbilanzen sämtlicher Edukte und Produkte bilden dabei ein gekoppeltes System von Differentialgleichungen erster Ordnung. Die Konzentrationsänderung eines Stoffes pro Zeiteinheit und Volumenelement (= "Akkumulation") wird durch die Summe folgender Terme beschrieben:

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Diffusion} + \text{Reaktion} \quad (3.5.2-1)$$

- Konvektion: dieser Term beschreibt die Konzentrationsänderung durch konvektiv zu- und abgeführte Reaktanden im Volumenelement; im Satzreaktor ist dieser Term definitionsgemäß Null.
- Diffusion: dieser Term beschreibt die Konzentrationsänderung durch diffusiv zu- und abgeführte Reaktanden im Volumenelement; im Rührkesselreaktor (batch oder kontinuierlich) ist dieser Term definitionsgemäß Null.
- Reaktion: dieser Term beschreibt die Konzentrationsänderung der Reaktanden im Volumenelement durch die chemische bzw. enzymatische Reaktion; er enthält die Geschwindigkeitsgleichung der Reaktion.

Die Bezeichnung "Satzreaktor" wird in dieser Arbeit zur Beschreibung eines idealen Rührkesselreaktors verwendet, bei dem Konvektion und Diffusion definitionsgemäß Null sind. Für diesen Reaktor ist die Stoffbilanz identisch mit der Geschwindigkeitsgleichung.

Der EMR verhält sich wie ein kontinuierlich betriebener idealer Rührkesselreaktor, dessen Stoffbilanz den Konvektions- und Reaktionsterm enthält. Die folgenden Gleichungen geben die Stoffbilanzen für die hier betrachteten Reaktanden ManNAc, Pyr und Neu5Ac an. Die im Reaktionsterm enthaltene Geschwindigkeitsgleichung (vgl. Gl. 3.3.2-16) wird dabei so modifiziert, daß das Produkt aus Enzymkonzentration und der massenspezifischen Aktivität verwendet wird. Dadurch kann für den stationären Zustand (Akkumulation gleich Null) das Produkt " $E \cdot \tau$ " als Parameter, über den beispielsweise der Umsatz aufgetragen wird, verwendet werden. Zur Einstellung eines anderen Betriebspunktes kann entweder die Enzymkonzentration oder in gleicher Weise die Verweilzeit verändert werden. Da gezeigt werden konnte, daß die Mutarotation keinen signifikanten Einfluß auf die enzymatische Reaktion hat, wird in den Stoffbilanzen nicht zwischen α - und β -Anomeren unterschieden.

$$\frac{d[\text{Pyr}]}{dt} = \frac{[\text{Pyr}]_0 - [\text{Pyr}]}{\tau} - [E]_{\text{Ald}} * A_1 \quad (3.5.2-2)$$

$$\frac{d[\text{ManNAc}]}{dt} = \frac{[\text{ManNAc}]_0 - [\text{ManNAc}]}{\tau} - [E]_{\text{Ald}} * A_1 \quad (3.5.2-3)$$

$$\frac{d[\text{Neu5Ac}]}{dt} = \frac{[\text{Neu5Ac}]_0 - [\text{Neu5Ac}]}{\tau} + [E]_{\text{Ald}} * A_1 \quad (3.5.2-4)$$

$$v_1 = [E]_{\text{Ald}} * A_1 \quad (3.5.2-5)$$

mit:	Index 0	Zulaufkonzentration der Komponente
	τ s	Verweilzeit
	$[E]_{\text{Ald}}$ g/L	Enzymkonzentration (Aldolase)
	A_1 kat/g	massenspezifische Aktivität der Neu5Ac-Synthese
	v_1 kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese (vgl. Gl. 3.3.2-16)

Durch Nullsetzen des Konvektionsterms sind die Stoffbilanzen auch für den Satzreaktor verwendbar. Das Differentialgleichungssystem wurde sowohl für den Satzreaktor als auch für den kontinuierlich betriebenen Reaktor mit Hilfe des Runge-Kutta-Verfahrens gelöst (Zurmühl, 1965; Joks, 1987).

Durchführung der Berechnungen

Ausgehend von den aufgestellten Stoffbilanzen und den ermittelten kinetischen Parametern wurden die erreichbaren Konzentrationen für den stationären Zustand ermittelt und daraus der Umsatz und die Raum-Zeit-Ausbeute berechnet. Zu den Berechnungen ist folgendes anzumerken:

- Folgende Parameter wurden variiert:
 - die Gesamtkonzentration der Substrate; Modellrechnungen wurden für Zulaufkonzentrationen zwischen 10 mM und 3000 mM ManNAc durchgeführt. Bei der Darstellung der Ergebnisse sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ausgewählte, charakteristische Kurvenverläufe dargestellt.
 - das Verhältnis ManNAc zu Pyr; in der Regel wurde ein zweifacher Überschuß an Pyr verwendet.
 - die Enzymkonzentration; auf Grund des "E* τ "-Konzeptes könnte analog die Verweilzeit verändert werden.
- Der Umsatz wird auf das im Unterschluß eingesetzte Substrat, meist ManNAc, bezogen.
- Der Einfluß der Viskosität des Reaktionsmediums auf die Enzymaktivität wurde bei der Modellierung zunächst nicht berücksichtigt, da der Aktivitätsrückgang leicht durch eine erhöhte Enzymkonzentration ausgeglichen werden kann. Nachteilig wirkt sich dieser Effekt erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen aus (1 M ManNAc, 2 M NaPyr), da dann die Enzymaktivität sehr stark abfällt. Die Aussagekraft der Rechnungen für diese Bedingungen ist daher gering. Da jedoch die Löslichkeit der Reaktanden (ManNAc 1,5 M, NaPyr 3 M, Neu5Ac > 1 M, ungefähre Werte bei 25 °C, pH 7,5) prinzipiell hohe Konzentrationen zuläßt, wurde ein entsprechender Versuch durchgeführt, der in Kap. 3.5.3 beschrieben ist. Technische Probleme, auch bei der späteren Aufarbeitung, sowie der sehr starke Abfall der Aktivität auf ca. 10% lassen die Verwendung derartig hoher Konzentrationen allerdings nicht sinnvoll erscheinen.
- Als bester Kompromiß für die kontinuierliche Neu5Ac-Produktion stellte sich eine ManNAc-Konzentration von 300 mM bei einem zweifachen Pyr-Überschuß heraus, wie im folgenden gezeigt wird.

In Abb. 3.5.2-1 ist der im kontinuierlichen Prozeß erreichbare Umsatz als Funktion des Überschusses des zweiten Substrates aufgetragen. Als weiterer Parameter dient die Gesamtkonzentration der Substrate. Die Enzymkonzentration bzw. Verweilzeit wurde so gewählt, daß nahezu Gleichgewichtsumsatz erreicht wird (vgl. Abb. 3.5.2-5). Genau wie bei der Betrachtung der Thermodynamik allein (vgl. Abb. 3.2-2) ergibt sich auch hier, daß der Umsatz, der beim stationären Zustand des Reaktors erreicht wird, mit steigendem Konzentrationsniveau zunimmt. Während jedoch im vorhergehenden Fall lediglich die Gleichgewichtslage der Reaktion betrachtet wurde, verursacht hier die Kinetik der Reaktion ein ähnliches Bild. Da auf Grund der K_m -Werte der Substrate unterschiedliches Verhalten zu erwarten ist, wurde sowohl ein Überschuß von Pyruvat (rechte Seite) als auch ein ManNAc-Überschuß (linke Seite) eingesetzt, wobei letzteres jedoch aus Kostengründen nicht experimentell überprüft wurde. Im folgenden sollen einige Aspekte von Abb. 3.5.2-1 diskutiert werden:

- Die Kurve für 50 mM Pyr (linke Seite) steigt stärker mit zunehmendem ManNAc-Überschuß an als die Kurve für 50 mM ManNAc mit zunehmendem Pyr-Überschuß (rechte Seite). Dies ist mit dem großen K_m -Wert des ManNAc (402,2 mM) zu begründen, da auf der linken Seite mit zunehmender ManNAc-Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt. Dadurch stellt sich im Fließgleichgewicht, das im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor vorliegt, ein höherer Umsatz ein. Bezüglich des Pyr sind jedoch bereits bei geringen Konzentrationen V_{max} -Bedingungen für das Enzym erreicht, so daß eine weitere Erhöhung des Überschusses nur eine geringere Wirkung zeigt (vgl. auch Abb. 3.3.3-10A).
- Der bei 300 mM Zulaufkonzentration an Pyr erreichbare Umsatz ist geringer als der bei entsprechender ManNAc-Konzentration. Dies läßt sich nur mit Hilfe von Gl. 3.3.2-16 bzw. 3.3.3-2 erklären. Der dritte Term im Nenner, der die ManNAc-Konzentration enthält, wird mit steigendem ManNAc-Überschuß sehr groß und führt zu einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit. Beim zweiten Term, der die Pyr-Konzentration enthält, ist die Zunahme nicht so ausgeprägt.
- Die Kurve für eine Zulaufkonzentration von 1000 mM ManNAc verläuft nur geringfügig oberhalb der Kurve für 300 mM und ist daher nicht dargestellt.

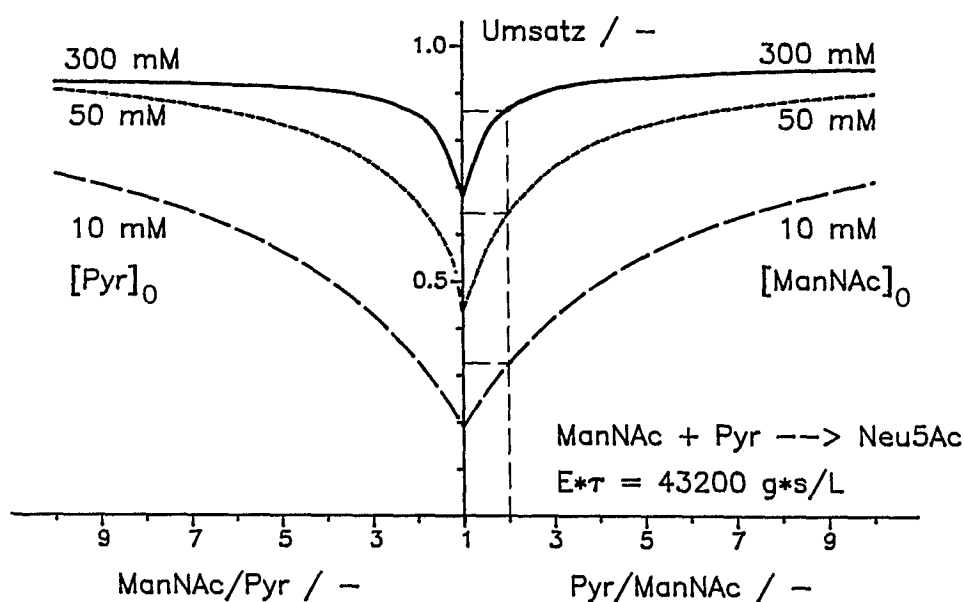


Abb. 3.5.2-1: Umsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratzulaufkonzentration im kontinuierlichen Prozeß;
linke Seite: ManNAc-Überschuß, rechte Seite: Pyr-Überschuß;
Bedingungen: $[E]_{Ald} = 4 \text{ g/L}$, $\tau = 10800 \text{ s}$

In Abb. 3.5.2-2 sind daher neben dem Umsatz auch die errechneten stationären Konzentrationen für Pyr und Neu5Ac aufgetragen. Ein zweifacher Pyruvatüberschuß genügt bei einer ManNAc-Konzentration von 300 mM bereits, um einen Umsatz von knapp 90% zu erzielen. Eine weitere Vergrößerung des Überschusses führt zwar zu einer weiteren Zunahme des Umsatzes, allerdings bleibt mehr nicht

umgesetztes Pyr in Lösung, das bei der Produktisolierung abgetrennt werden muß. Auf die Werte für 50 mM ManNAc soll hier nicht näher eingegangen werden. Würde man nur die Aufarbeitung des Reaktorauslaufes als Kriterium für die Wahl des Pyr-Überschusses heranziehen, so wären äquimolare Mengen ausreichend. Die Produktlösung enthält dann 200 mM Neu5Ac, 100 mM Pyr und 100 mM ManNAc. Da jedoch der Umsatz nur bei etwa 68 % liegt, sollte nicht umgesetztes ManNAc zurückgewonnen werden. Durch das verwendete Verfahren zur Produktisolierung ist dies zwar möglich, erfordert aber einen zusätzlichen Entsalzungsschritt (vgl. Kap. 6). Bei einem zweifachen molaren Überschuß an Pyruvat liegt der Umsatz bei knapp 90%, so daß eine Rückgewinnung des ManNAc unter Umständen entfallen kann. Die Produktlösung enthält neben 260 mM Neu5Ac etwa 340 mM Pyr. Dadurch ist zur Isolierung der Neu5Ac zwar ein größeres Säulenvolumen des verwendeten Anionenaustauschers erforderlich, das Verfahren bleibt aber prinzipiell gleich (nur ein chromatographischer Schritt erforderlich). Ein dreifacher Pyruvatüberschuß an Stelle des zweifachen bringt keine Vorteile (Umsatzsteigerung nur 4%).

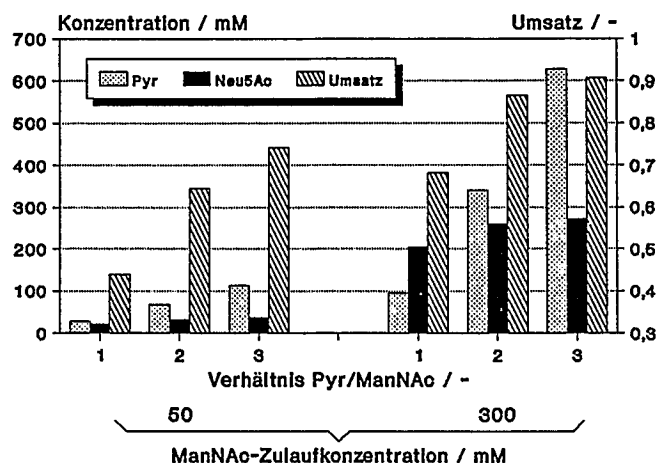


Abb. 3.5.2-2: Neu5Ac-, Pyr-Konzentrationen und Umsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratzulaufkonzentration;
Bedingungen: $[E] = 4 \text{ g/L}$, $\tau = 10800 \text{ s}$

In Abbildung 3.5.2-3 und 3.5.2-4 sind der Umsatz und die Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der Substratkonzentration bei konstantem " $E \cdot \tau$ " und zweifachem Pyruvatüberschuß aufgetragen. Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) ergibt sich aus Gl. 3.5.2-6.

$$RZA = \frac{U \cdot [ManNAc]_0 \cdot 309}{\tau} \quad (3.5.2-6)$$

mit:	RZA	g/(L*d)	Raum-Zeit-Ausbeute
	U	-	Umsatz
	$[ManNAc]_0$	mol/L	Zulaufkonzentration von ManNAc
	309	g/mol	Molekulargewicht von Neu5Ac
	τ	d	Verweilzeit

Die Berechnung der Daten für Abbildung 3.5.2-3 erfolgte ohne Berücksichtigung der Inhibierung der Aldolase mit steigender Substratkonzentration, während sie bei Abb. 3.5.2-4 in die Rechnung einbezogen wurde. Bei ManNAc-Konzentrationen bis etwa 750 mM spielt die Inhibierung keine Rolle, so daß die Kurven für den Umsatz und die Raum-Zeit-Ausbeute für beide Fälle deckungsgleich verlaufen.

Das gefundene Verhalten der Umsatzkurve (stetiger Anstieg und Erreichen eines Maximums) ist auf den großen K_m -Wert für ManNAc zurückzuführen. Wie auch aus Abbildung 3.3.3-12, S. 45, hervorgeht, steigt mit zunehmender ManNAc-Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit an, was dazu führt, daß der Umsatz bei etwa 300 mM ein Maximum erreicht. Unterhalb von 300 mM wird auf Grund der gewählten Verweilzeit und Enzymkonzentration der Gleichgewichtsumsatz fast erreicht, so daß hier der durch die Thermodynamik beschriebene Umsatzzuwachs mit steigender Substratkonzentration zum Tragen kommt. Bei zunehmender Substratkonzentration steigt damit die Raum-Zeit-Ausbeute ebenfalls an.

Bei Vernachlässigung der Inhibierung sinkt der erzielbare Umsatz erst ab Substratkonzentrationen größer 2 M ManNAc und 4 M Pyr ab (nicht dargestellt), da dann bei der gewählten Enzymkonzentration die Verweilzeit zu kurz ist, um den Umsatz konstant zu halten (Abb. 3.5.2-3). Bei Berücksichtigung der zunehmenden Inhibierung der Aldolase mit steigender Substratkonzentration tritt der Abfall des Umsatzes und eine Abflachung der Kurve für die Raum-Zeit-Ausbeute bereits bei ManNAc-Zulaufkonzentrationen ab etwa 750 mM auf.

Auf Grund des dargestellten Verlaufes der Umsatzkurve ist eine Substratkonzentration von 300 mM ManNAc gut für die Produktion von Neu5Ac geeignet, wenn ein zweifacher Pyruvatüberschuß gewählt wird. Bei diesen Bedingungen sind hoher Umsatz (knapp 90%) und eine gute Raum-Zeit-Ausbeute (ca. 650 g/(L*d)) erreichbar. Die Raum-Zeit-Ausbeute läßt sich noch steigern, wenn bei gleichzeitiger Erhöhung der Enzymkonzentration die Verweilzeit verkürzt wird (vgl. Gl. 3.5.2-6).

Nach Abb. 3.5.2-4 wären auch noch Substratkonzentrationen von 1 M ManNAc und 2 M Pyr für die Synthese günstig. Bei einem unter entsprechenden Bedingungen durchgeführten Versuch wurde jedoch nur ein Umsatz von 41% erreicht (vgl. Tab. 3.5.3-3). Anscheinend beeinflussen diese hohen Substratkonzentrationen das Enzym stärker, als aus den Ergebnissen zu erwarten ist, die in Kap. 3.3.3 und 3.3.5 beschrieben sind (Viskositätsmodell). Möglicherweise führen hohe Substratkonzentrationen zu einer Aussalzung und damit Desaktivierung des Enzyms.

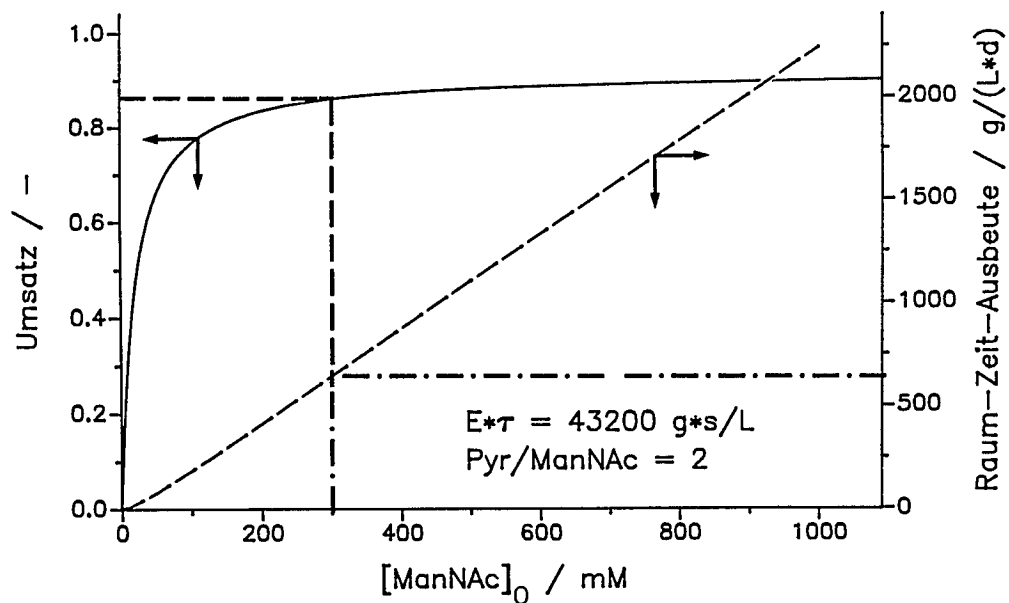


Abb. 3.5.2-3: Umsatz und Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der ManNAc-Zulaufkonzentration bei 2-fachem Pyr-Überschuß ohne Berücksichtigung des Konzentrationseinflusses;
 Bedingungen: $[\text{E}]_{\text{Ald}} = 4 \text{ g/L}$, $\tau = 10800 \text{ s}$

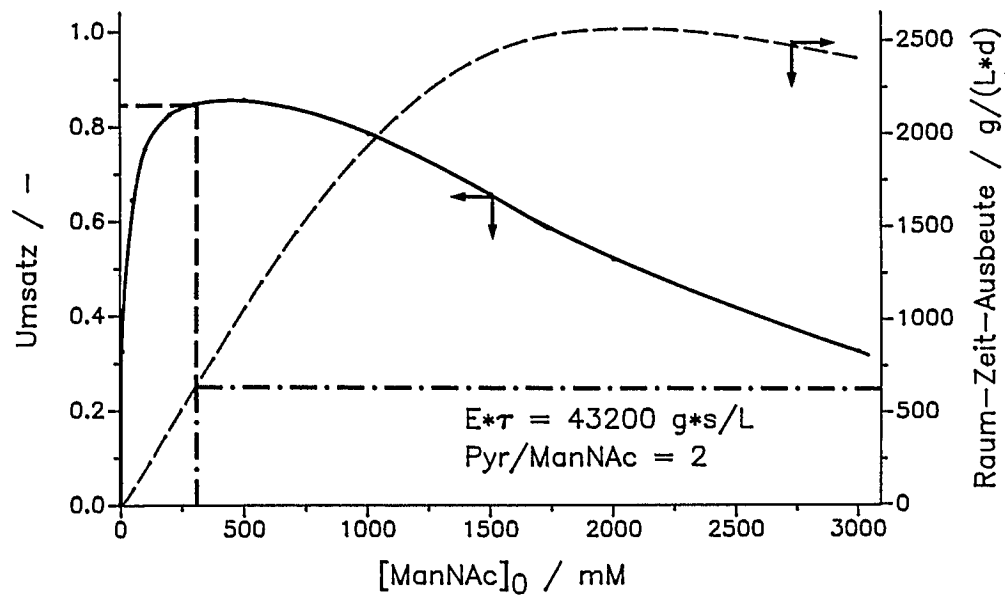


Abb. 3.5.2-4: Umsatz und Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der ManNAc-Zulaufkonzentration bei 2-fachem Pyr-Überschuß mit Berücksichtigung des Konzentrationseinflusses;
 Bedingungen: $[\text{E}]_{\text{Ald}} = 4 \text{ g/L}$, $\tau = 10800 \text{ s}$

In Abbildung 3.5.2-5 ist der erzielbare Umsatz als Funktion des Produktes aus Enzymkonzentration und Verweilzeit ("E* τ ") aufgetragen. Als zusätzliche Angabe ist auf einer zweiten x-Achse bei konstanter Verweilzeit die zugehörige Enzymkonzentration angegeben. Die bei den oben vorgestellten Berechnungen gewählten Bedingungen (E* τ = 43200 g*s/L, markiert durch Pfeil A) sind selbst bei hohen Substratkonzentrationen ausreichend, um nahezu den möglichen Gleichgewichtsumsatz zu erreichen. Führt man die kontinuierliche Produktion unter entsprechenden Bedingungen durch, so wirkt sich selbst die Verringerung der Enzymaktivität durch höhere Substratkonzentrationen auf den erreichbaren Umsatz nur wenig aus. Durch Pfeil B ist der entsprechende 60%-Wert für die effektive Enzymkonzentration markiert. Dieser Wert entspricht in etwa Punkt 5 in Abb. 3.3.3-7, in der die Restaktivität als Funktion der Gesamts substratkonzentration dargestellt ist.

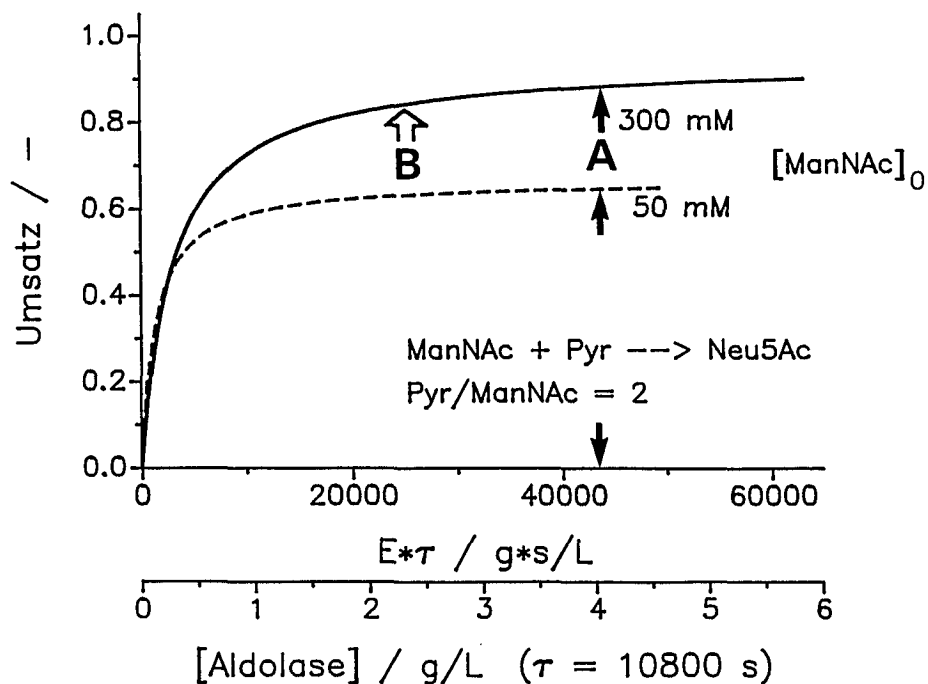


Abb. 3.5.2-5: Umsatz als Funktion des Produktes aus Enzymkonzentration und Verweilzeit bei 50 mM und 300 mM ManNAc und 2-fachem Pyr-Überschuß; die Pfeile markieren "E* τ "=43200 g*s/L (A), wie es bei den oben dargestellten Rechnungen verwendet wurde, bzw. den 60%-Wert (B)

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Stoffbilanzen für den kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor können die optimalen Betriebsbedingungen für die Neu5Ac-Produktion durch Modellrechnungen ermittelt werden:

- Bezüglich ManNAc ist eine Konzentration von 300 mM ein günstiger Kompromiß, da bei höheren Konzentrationen zwar die Raum-Zeit-Ausbeute ansteigt, gleichzeitig aber auf Grund der Viskositätszunahme die Enzymaktivität abnimmt.
- Um hohen Umsatz zu erreichen, ist ein zweifacher Pyr-Überschuß günstig; bei höheren Konzentrationen steigt der Umsatz zwar noch geringfügig an, gleichzeitig wird aber die Produktisolierung aufwendiger.
- Eine Enzymkonzentration von etwa 4 g/L und eine Verweilzeit von 3 h erscheinen für die Produktion von Neu5Ac geeignet; eine Abnahme der Enzymaktivität durch Desaktivierung wirkt sich bei diesen Bedingungen nur wenig auf den Umsatz aus, da mit einem "E* τ -Überschuß" gearbeitet wird. Zur Verringerung des produktmengenspezifischen Enzymverbrauchs kann auch bei kleineren E* τ -Werten gearbeitet werden, allerdings verringert sich dadurch der erzielbare Umsatz.

3.5.3 Kontinuierliche Experimente zur Überprüfung der Modellrechnungen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden mit den folgenden Zielen durchgeführt:

- Beweis der Eignung des enzymatischen Systems für den Einsatz in kontinuierlichen Prozessen.
- Überprüfung der Modellrechnungen.
- Ermittlung von Daten zur Enzymstabilität im kontinuierlichen Prozeß und zum Enzymverbrauch.
- Bestätigung, daß die Abnahme der Enzymaktivität mit steigender Viskosität ein reversibler Vorgang ist.

Apparativer Aufbau

Der Enzym-Membran-Reaktor hat sich bereits bei einer Reihe von Prozessen als geeignete Methode für den Einsatz von Enzymen in kontinuierlichen Verfahren erwiesen (Wandrey, 1977; Kula et al., 1987; Römpf, 1990; Schwarz, 1991). Das homogen gelöste Enzym wird von einer Ultrafiltrationsmembran im Reaktor zurückgehalten, die für die Substrat- und Produktmoleküle durchlässig ist.

Das Fließbild der verwendeten Anlage ist in Abbildung 3.5.3-1 dargestellt; die einzelnen Anlagenteile werden im folgenden kurz erläutert. Bis auf den eigentlichen Reaktor entsprechen die Teile der 70-mL-Anlage, deren Photo in Abb. 3.5.4-1 gezeigt ist.

- Die Kühlung des Substratgefäßes soll das Wachstum von Mikroorganismen verhindern bzw. verlangsamen. Beim Einsatz von ManNAc wurde ein Bewuchs der Substratlösung in keinem Fall beobachtet; bei Verwendung von GlcNAc für das gekoppelte System (vgl. Kap. 5) kam es vereinzelt zu Bewuchs. Das Sterilfilter vor der Pumpe soll etwaige Kontaminationen, die eine Verstopfung verursachen könnten, zurückhalten.
- Die Substratlösung wurde nach Einstellung des pH-Wertes durch fraktionierte Mikrofiltration von Trübstoffen gereinigt (kleinste Porengröße 0,1 μm) und dabei gleichzeitig sterilfiltriert.
- Als Substratpumpe wird eine konstant fördernde Wechselkolbenpumpe verwendet.
- Der Druckabfall über die Ultrafiltrationsmembran wird durch einen piezoresistiven Absolutdruckaufnehmer überwacht. Die vor dem Reaktor vorhandenen Sterilfilter bewirken keinen Druckabfall, solange sie nicht verstopft sind.
- Die durch ein Septum verschlossene Blasenfalle dient zur Dosierung des Enzyms in den Reaktor.
- Die beiden Sterilfilter (Mikrofilter, 0,1 μm Porengröße, Cellulosenitrat von Sartorius) begrenzen zusammen mit der Ultrafiltrationsmembran den sterilen Bereich. Durch die doppelte Auslegung kann die Membran im ersten Sterilfilter bei Verstopfung unter Erhaltung der Sterilgrenze ausgetauscht werden.

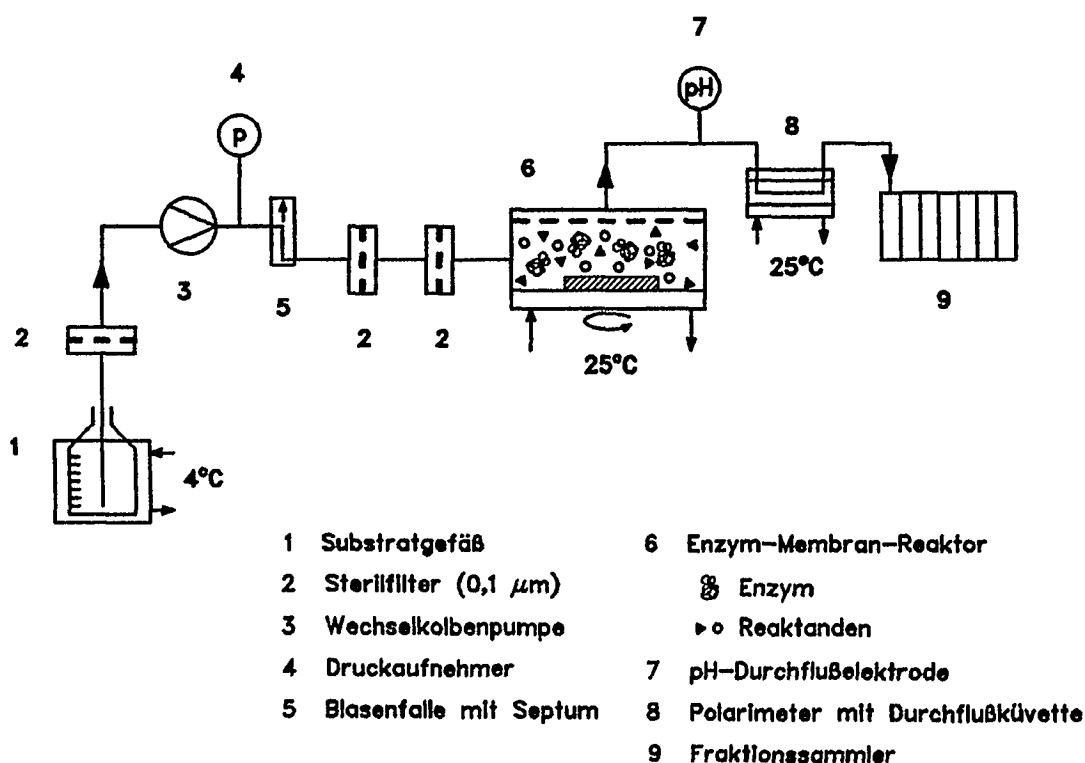


Abb. 3.5.3-1: Fließbild der verwendeten Anlage für kontinuierliche Experimente

- Der eigentliche Reaktor ist ein zylindrisches Gefäß aus Polypropylen (PP DWU der Firma Simova, Kirn), bestehend aus einem thermostatisierbaren Bodenteil mit einer Bohrung für die Zuführung der Substrate und einem Deckel mit einer Bohrung für den Produktauslauf. Abbildung 3.5.3-2 zeigt ein Photo des verwendeten EMRs. In der seitlichen Reaktorwand befindet sich eine mit einem Septum verschlossene Bohrung zur Probenahme aus dem Reaktor. Die Ultrafiltrationsmembran (Firma Filtron, Typ Omega, Ausschlußgrenze 5000 u) wird mit zwei Runddichtringen aus Silikongummi (Firma Seybold, Düren) zusammen mit einer Stützscheibe zwischen Deckel und Boden eingespannt, wobei zur Verschraubung zwei Edelstahlplatten verwendet werden. Zur Vermeidung einer Konzentrationspolarisation und zur gleichmäßigen Verteilung der Reaktanden ist ein Magnetrührkern vorhanden (Drehzahl 400 Upm). Die Umhüllung des Rührkerns sowie die Stützscheibe bestehen ebenfalls aus Polypropylen.
- Das Reaktorvolumen beträgt 14,3 mL.

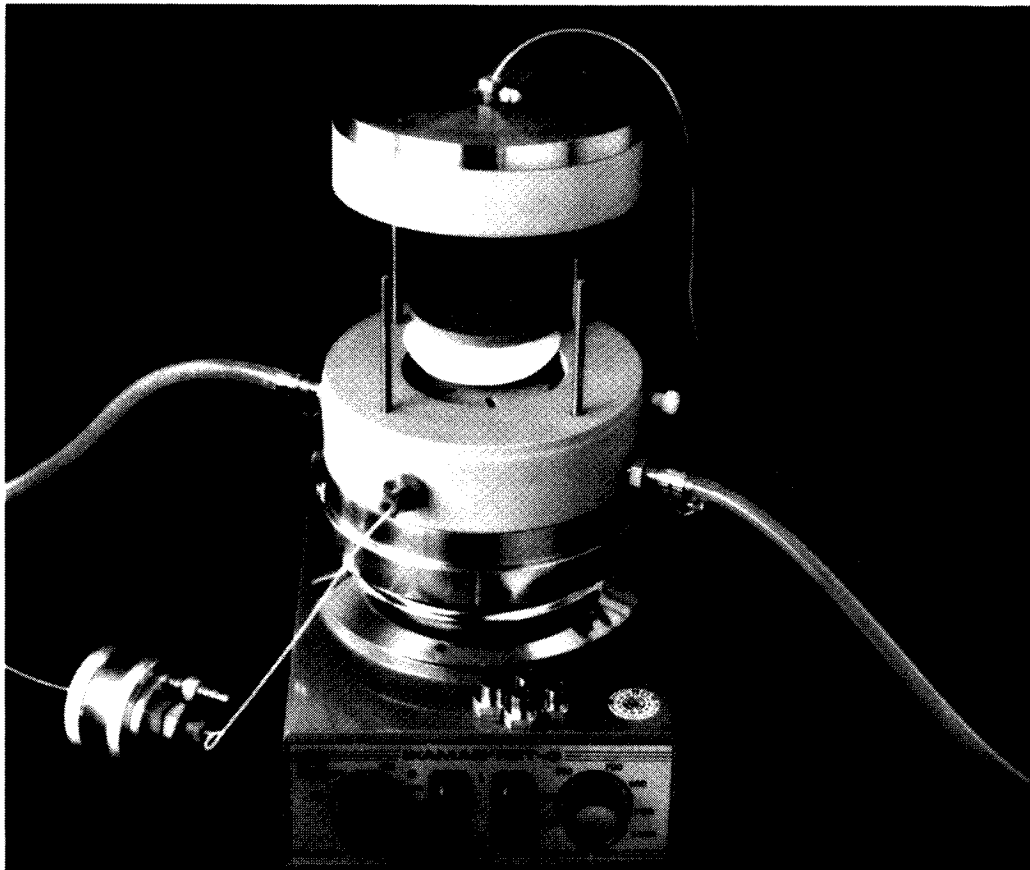


Abb. 3.5.3-2: Photographie des Enzym-Membran-Reaktors aus Polypropylen mit einem Sterilfilter

- Durch die pH-Elektrode wird der pH-Wert des Reaktorauslaufes, der identisch mit dem im Reaktorinnern ist, kontrolliert (ein CSTR arbeitet unter "Auslaufbedingungen"). Auf Puffersubstanzen wurde bei den kontinuierlichen Experimenten verzichtet. Durch geeignete Einstellung der Substratlösung (ca. pH 7,8) kann am Reaktorauslauf ein pH von 7,3–7,5 erzielt werden. Da keine größeren pH-Verschiebungen auftreten, kann auf eine Regelung dieses Wertes verzichtet werden.
- Das Polarimeter dient zur Prozeßkontrolle, da sich nach Erreichen des stationären Zustandes den konstanten Konzentrationen entsprechend ein konstanter Drehwert einstellt.
- Der Gehalt der verschiedenen Komponenten in der mit einem Fraktions-sammler gesammelten Produktlösung wird mittels HPLC bestimmt.

Durchführung der Experimente und Ergebnisse

Für ManNAc-Zulaufkonzentrationen von etwa 50 mM und 300 mM bei etwa zweifachem Pyr-Überschuß wurden für verschiedene Enzymkonzentrationen und Verweilzeiten experimentelle und berechnete Betriebspunkte miteinander verglichen.

Bei allen Experimenten galten folgende Bedingungen:

- Es wurden keine Puffersubstanzen eingesetzt.
- Vor Benutzung wird der Reaktor für 12 h mit Peressigsäure sterilisiert (0,1 Vol-%), die mit Wasser und 50 mM KH_2PO_4 -Puffer ausgespült wird.
- Die Ultrafiltrationsmembran wird mit 1 mg/mL Rinderserumalbumin vorbelegt.
- Nach Einspülen des Rinderserumalbumins wurde unter Verwendung von Puffer die Aldolase eingespült, danach wurde die Substratlösung in den Reaktor gepumpt.
- Am Ende jeder Versuchsreihe wurde die Substratlösung vollständig mit Puffer aus dem Reaktor gespült und anschließend eine Probe zur Bestimmung der aktuellen Enzymkonzentration aus dem Reaktor entnommen. Dabei zeigte sich, daß die insgesamt eingesetzte Enzymmenge homogen im Reaktor verteilt vorliegt.

Aus der Aktivitätsabnahme wurde die Desaktivierungskonstante nach einem Zeitgesetz erster Ordnung berechnet:

- bei $[\text{ManNAc}]_0 = 59 \text{ mM}$, $[\text{Pyr}]_0 = 108 \text{ mM}$ ergibt sich $k_{\text{des}} = 3,6 \text{ \%/d.}$
- bei $[\text{ManNAc}]_0 = 339 \text{ mM}$, $[\text{Pyr}]_0 = 629 \text{ mM}$ ergibt sich $k_{\text{des}} = 2,0 \text{ \%/d.}$

Damit liegen die für die kontinuierlichen Experimente gefundenen Desaktivierungsraten in der gleichen Größenordnung wie bei der Inkubation des Enzyms ohne Substrate (vgl. Abb. 3.3.4–1). Höhere Substratkonzentrationen scheinen eine Stabilitätserhöhung zu bewirken. Der Verlust der wahrscheinlich niedermolekularen Stabilisatoren, die in der Enzympräparation enthalten sind und beim Einsatz des Enzyms im EMR ausgespült werden (vgl. Kap. 3.3.3; Toyobo, 1989, 1991), wirkt sich nicht nachteilig auf die Stabilität aus.

Mit Hilfe der Desaktivierungskonstanten wurde die jeweils aktuelle Enzymkonzentration interpoliert. In Tabelle 3.5.3-1 sind die jeweiligen Enzymkonzentrationen und Verweilzeiten, das Produkt " $E \cdot \tau$ " sowie der experimentelle Umsatz angegeben. Abbildung 3.5.3-3 zeigt den Vergleich zwischen berechneten und experimentellen Betriebspunkten für die niedrigere Substratkonzentration, Abb. 3.5.3-4 für die höhere. Für jeden Betriebspunkt wurden ca. 20-25 Verweilzeiten abgewartet.

Versuch Nr.	[Aldolase] g/L	τ s	$E \cdot \tau$ g*s/L	U_{exp} -
59 mM ManNAc, 108 mM Pyr				
1	0,938	1080	1013	0,29
2	0,930	2700	2510	0,45
3	0,908	5418	4920	0,52
4	0,868	11016	9557	0,56
339 mM ManNAc, 629 mM Pyr				
5	1,57	1080	1696	0,23
6	1,59	2700	4293	0,46
7	1,56	5418	8452	0,61
8	3,53	2202	7773	0,56
9	3,50	10728	37548	0,78

Tab. 3.5.3-1: Daten zu den Betriebspunkten im kontinuierlichen Prozeß

Aus den dargestellten Ergebnissen lassen sich folgenden Aussagen ableiten:

- Für beide Konzentrationsniveaus findet man eine sehr gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Betriebspunkten, wenn man bei der Berechnung auch die Inhibierung des Enzyms durch die Viskosität der Lösung berücksichtigt (durchgezogene Linien). Es wird kein zusätzlicher Anpassungsparameter verwendet. Die errechneten Kurven unter Annahme von 100% Aktivität sind gestrichelt eingezeichnet. Erwartungsgemäß ist der Unterschied bei 59 mM ManNAc zwischen den beiden berechneten Kurven zu vernachlässigen, während bei 339 mM der Unterschied zwischen den berechneten Kurven deutlich größer ist. Durch die Einführung der effektiven Enzymaktivität, die anschaulich und experimentell durch die Viskosität des Reaktionsmediums begründet werden kann, gelingt über den gesamten Umsatzbereich sowohl für den Satzreaktor als auch für den kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor die exakte quantitative Vorhersage der Betriebspunkte.
- Zur Abschätzung der Restaktivität wird wie in Abb. 3.3.3–7 auch hier die Gesamtkonzentration der Substratlösung (Konzentration im Zulauf bzw. bei Reaktionsbeginn) verwendet. In erster Näherung wird die Abhängigkeit der Gesamtkonzentration im Reaktor vom jeweiligen Umsatz vernachlässigt. Bei einer Zunahme des Umsatzes von 0 auf 80% steigt die Restaktivität von 61% auf 69% an, da die Neu5Ac-Synthese unter Molzahlverminderung abläuft. Da andererseits bei hohem Umsatz dieser nur wenig von einer Änderung der Enzymkonzentration bzw. -aktivität beeinflusst wird, ist die Vereinfachung zur Ermittlung der Restaktivität statthaft.
- Die Versuche 7 und 8 wurden bei annähernd gleichen " $E \cdot \tau$ "-Werten, aber unterschiedlichen Enzymkonzentrationen und Verweilzeiten durchgeführt. In beiden Fällen stimmt der experimentelle Umsatz mit den erwarteten Werten überein. Damit ist bewiesen, daß das verwendete Modell zur Vorhersage aller relevanten Betriebszustände des Reaktors geeignet ist und keine vorgelagerte geschwindigkeitsbestimmende Reaktion wie z. B. die Mutarotation des ManNAc zusätzlich berücksichtigt werden muß. Andernfalls müßte der Umsatz bei der höheren Enzymkonzentration niedriger sein als berechnet.
- Aus der bekannten Desaktivierung der Aldolase und dem experimentell ermittelten Umsatz läßt sich der produktmengenspezifische Enzymverbrauch berechnen, wobei die ermittelte maximale massenspezifische Aktivität $A_{\max}^{\text{II}} = 13,8 \text{ U/mg}$ für die Synthesereaktion verwendet wurde. Für die Versuche Nr. 8 und 9 ergeben sich die in Tab. 3.5.3–2 angegebenen Werte.

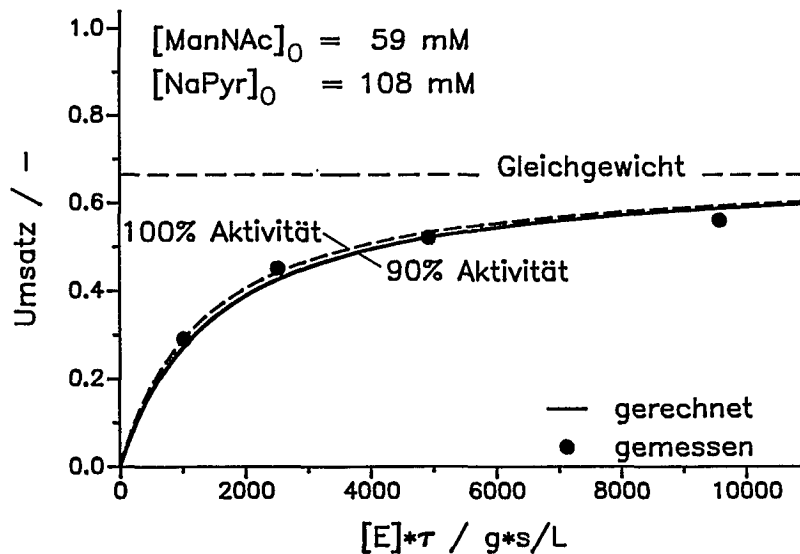


Abb. 3.5.3-3: Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Betriebspunkten bei $[\text{ManNAc}]_0 = 59 \text{ mM}$; die Restaktivität von 90% ergibt sich aus den Substratkonzentrationen nach Gl. 3.3.3-1

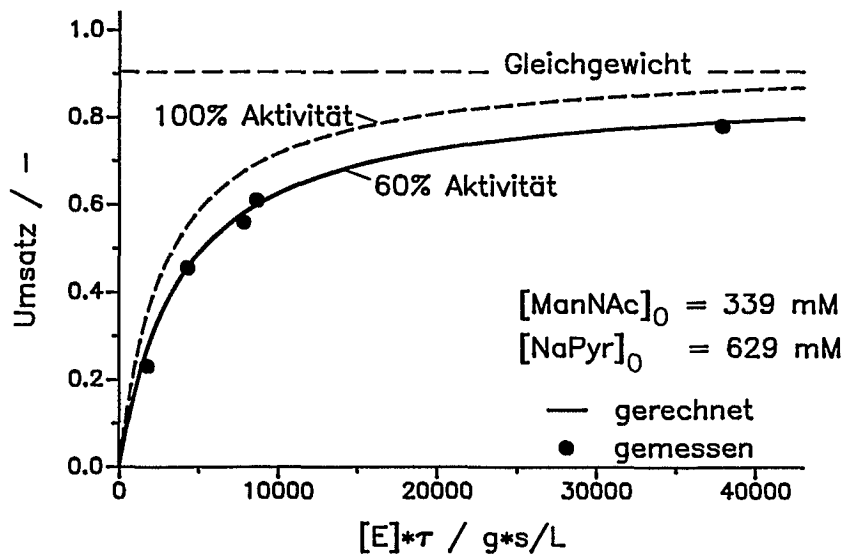


Abb. 3.5.3-4: Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Betriebspunkten bei $[\text{ManNAc}]_0 = 339 \text{ mM}$; die Restaktivität von 60% ergibt sich aus den Substratkonzentrationen nach Gl. 3.3.3-1

Versuch Nr.	[Aldolase] g/L	U _{exp} –	RZA g/(L*d)	Enzymverbrauch U/kg
339 mM ManNAc, 629 mM Pyr				
8	3,53	0,56	2300	420
9	3,50	0,78	657	1470

Tab. 3.5.3-2: Raum-Zeit-Ausbeute und produktmengenspezifischer Enzymverbrauch zur Aldolase-katalysierten Neu5Ac-Synthese

- Der produktmengenspezifische Enzymverbrauch ist auf Grund der höheren Raum-Zeit-Ausbeute, die durch die kürzere Verweilzeit verursacht wird, bei Versuch Nr. 8 geringer. Allerdings beträgt der Umsatz an ManNAc nur 56%. Bei Versuch Nr. 9 liegt der Enzymverbrauch bei 1470 U/kg Neu5Ac, was etwa 104,- DM/kg Enzymkosten entspricht; hier wird ein Umsatz von knapp 80% erreicht. Trotz der höheren Enzymkosten sind diese Bedingungen für die kontinuierliche Produktion von Neu5Ac auf Grund des höheren Umsatzes sowie einer besseren Prozeßstabilität bei kleineren Schwankungen der Enzymkonzentration zu empfehlen.

Zur Bestätigung, daß die durch Viskositätserhöhung verursachte Verringerung der Enzymaktivität reversibel ist, wurden nacheinander niedrige und hohe Substratkonzentrationen verwendet, wie in Abb. 3.5.3-5 dargestellt ist. Beim Wechsel von hoher zu niedriger Substratkonzentration wird wieder der ursprüngliche Umsatz erreicht, so daß die beobachtete Desaktivierung durch hohe Konzentrationen reversibel ist. Mit diesem Versuch sollte gleichzeitig geklärt werden, ob das bei der Produktisolierung zurückgewonnene ManNAc, das ca. 40 Gew.-% Natriumformiat enthält, ohne weitere Entsalzung eingesetzt werden kann. Eine Abschätzung zeigt, daß die Enzymaktivität bei der höheren ManNAc-Konzentration durch das Formiat um ca. 30% verringert wird. Damit ist eine Rückführung des ManNAc nur möglich, wenn in einem Reinigungsschritt das störende Natriumformiat weitgehend entfernt wird.

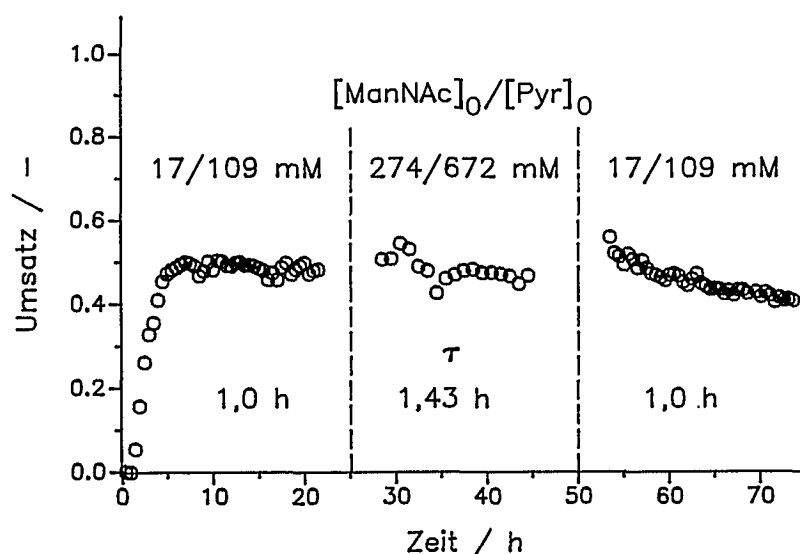


Abb. 3.5.3-5 Beweis der Reversibilität der Inhibierung durch hohe Substratkonzentration im kontinuierlichen Prozeß;
Bedingungen: 1,50 g/L Aldolase

Die hohen Konzentrationen, die auf Grund der guten Löslichkeit der Substrate möglich sind, können für die Produktion von Neu5Ac nicht eingesetzt werden. Die hohe Viskosität der Lösung verringert die Aktivität der Aldolase so stark, daß nur geringe Umsätze erzielt werden. In Tab. 3.5.3-3 sind die Daten eines entsprechenden Versuches aufgelistet. Durch Anpassung der Modellierung wurde eine Restaktivität von ca. 10% abgeschätzt. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Aldolaseaktivität würde sich eine Restaktivität von 38% errechnen. Anscheinend beeinflussen derartig hohe Konzentrationen das Enzym stärker, als nach den Ergebnissen zum Einfluß der Viskosität zu erwarten ist (vgl. auch Diskussion zu Abb. 3.5.2-4). Die erhaltene Produktlösung kann nur nach Verdünnung (!) auf den zur Isolierung der Neu5Ac verwendeten Anionenaustauscher aufgegeben werden, da es sonst zu sehr starken Volumenänderungen des Gels kommt.

[ManNAc] ₀	1,083	M
[Pyr] ₀	1,898	M
[Aldolase]	5,47	g/L
τ	14300	s
U_{exp}	0,41	-
Raum-Zeit-Ausbeute	832	g/(L*d)
$U_{Gleichgewicht}$	0,97	-

Tab. 3.5.3-3: Experimentelle Daten zur Neu5Ac-Produktion bei sehr hoher Substratkonzentration

Somit stellen die aus den Berechnungen abgeleiteten und experimentell bestätigten Konzentrationen von 300 mM ManNAc und 600 mM Pyr den besten Kompromiß in Hinblick auf Umsatz, Raum-Zeit-Ausbeute und Aufarbeitung dar. Entsprechende Bedingungen wurden auch bei der kontinuierlichen Produktion von Neu5Ac im größeren Maßstab benutzt, die im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Zusammenfassung

- Die Neu5Ac-Aldolase kann mit sehr guter Stabilität im Enzym-Membran-Reaktor eingesetzt werden, wenn desaktivierende Materialien vermieden werden. Die Desaktivierungsrate liegt zwischen 2 und 5 %/d.
- Berechnete und experimentelle Betriebspunkte stimmen sehr gut miteinander überein, wenn die durch die Viskosität verursachte Aktivitätsabnahme berücksichtigt wird.
- Die durch hohe Substratkonzentrationen verursachte Aktivitätsabnahme ist reversibel.
- Bei Substratkonzentrationen von 339 mM ManNAc und 629 mM Pyr bei einer Enzymkonzentration von 3,5 g/L und einer Verweilzeit von 3 Stunden wurde bei 78% Umsatz eine Raum-Zeit-Ausbeute von 657 g/(L*d) erreicht. Der Enzymverbrauch betrug 1470 U/kg Produkt.

3.5.4 Kontinuierliche Produktion von Neu5Ac im 300-g-Maßstab

In diesem Kapitel wird die Durchführung der kontinuierlichen Produktion von Neu5Ac im 300-g-Maßstab beschrieben. Diese Untersuchungen sowie die Aufarbeitung der Produktlösung wurden im Rahmen einer Fachhochschul-Diplomarbeit durchgeführt (Appel, 1990), so daß hier nur die wesentlichen Ergebnisse zusammengefaßt dargestellt werden. Für die Festlegung der Reaktionsbedingungen wird dabei auf die Erfahrungen der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Experimente zur Überprüfung der Modellrechnungen zurückgegriffen.

Apparativer Aufbau

- Der apparative Aufbau entspricht im wesentlichen der schon beschriebenen Anlage (Fließbild vgl. Abb. 3.5.3-1, Seite 68). An Stelle des Flachmembranreaktors wird jedoch ein Umlaufreaktor verwendet. Abbildung 3.5.4-1 zeigt eine Photographie der verwendeten Anlage.
- Der Umlaufreaktor besteht aus einer Kreislaufröhre (Schlauchpumpe Watson-Marlow Typ 501U), einem Wärmetauscher aus Glas mit verschiedenen Anschlußstutzen und einem Ultrafiltrationsmodul (Firma Filtron, Miniset) mit einem Flachmembranpaket (Typ Omega, Ausschlußgrenze 5000 u).

- Das Reaktorvolumen wurde mit Hilfe eines polymervergrößerten Farbstoffes (Dex70, Ciba F36A) zu 70 mL bestimmt. Aus der Extinktionsabnahme wird die Verdünnung berechnet, die eine Lösung bestimmter Konzentration beim Einspritzen in den mit Wasser gefüllten Reaktor erfährt.

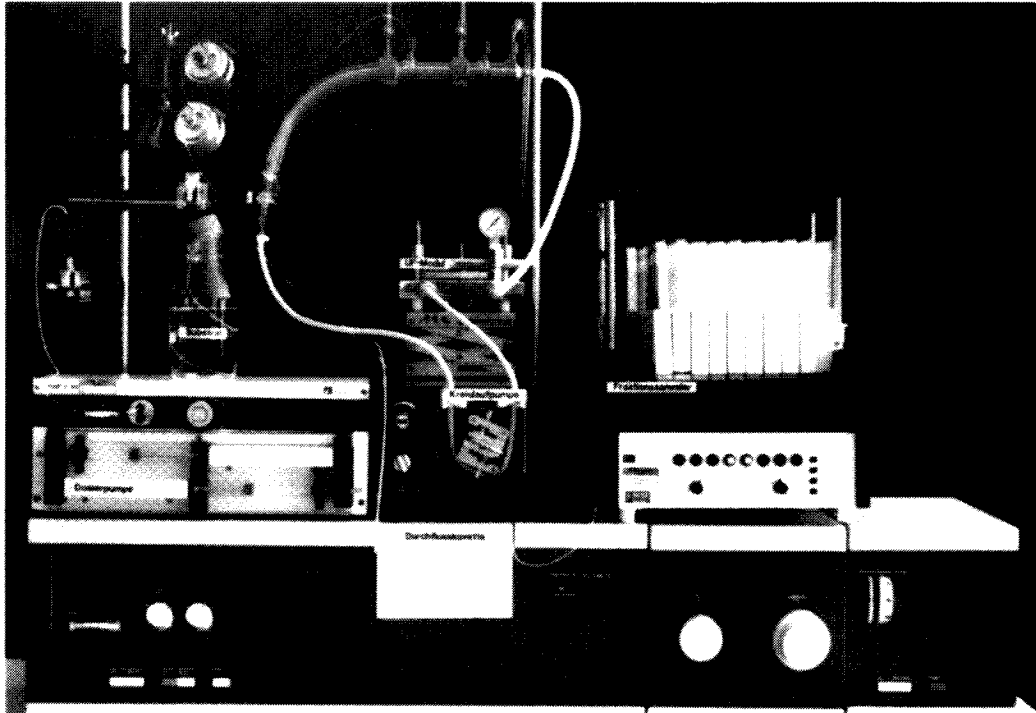


Abb. 3.5.4-1: Photographie des 70 mL Enzym-Membran-Reaktors

- Bei ausreichend hohem Volumenstrom im Umlauf (565 mL/h) im Vergleich zum Volumenstrom der Substratlösung (22,6 mL/h) verhält sich der Umlaufreaktor wie ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor.
- Die verwendeten Materialien wurden, sofern möglich, unter dem Aspekt einer möglichst geringen Enzymdesaktivierung ausgewählt (vgl. Kap. 3.3.4). Innerhalb des Umlaufreaktors bestanden alle Verbindungen aus Verderpren-Pumpenschlauch (Firma Verder, Düsseldorf).
- Bei Inkubation der Aldolase im Reaktor ohne Substrate wurde eine Desaktivierung von 11,3 %/d gefunden.

Durchführung des Versuchs und Ergebnisse

Im Sinne einer gleichbleibend hohen Raum-Zeit-Ausbeute und einer gleichbleibenden Zusammensetzung der Produktlösung, um das Verfahren zur Produktisolierung standardisieren und eventuell automatisieren zu können, sollte möglichst hoher Umsatz angestrebt werden. Änderungen der Enzymkonzentration wirken sich dann nur geringfügig auf den Umsatz aus (vgl. Abb. 3.5.2-5), so daß eine gute Prozeßstabilität gewährleistet ist. Die in Tabelle 3.5.4-1 aufgelisteten Bedingungen

wurden daher unter Berücksichtigung der im vorhergehenden Kapitel gefundenen Ergebnisse festgelegt. In der Tabelle sind ebenfalls die experimentell ermittelten Daten angegeben. Der zeitliche Verlauf des Umsatzes ist in Abb. 3.5.4-2 gezeigt.

[ManNAc] ₀	343	mM
[Pyr] ₀	651	mM
pH	7,5	- (keine Puffersubstanzen!)
Temperatur	25	°C
[Aldolase]	4,0	g/L
τ	11150	s
	185	min
Kreislaufpumpe	565	mL/h
Substratpumpe	22,6	mL/h
U _{exp}	0,78	-
Raum-Zeit-Ausbeute	655	g/(L*d)
Enzymverbrauch	5830	U/kg

Tab. 3.5.4-1: Experimentelle Daten zur Neu5Ac-Produktion im 300-g-Maßstab

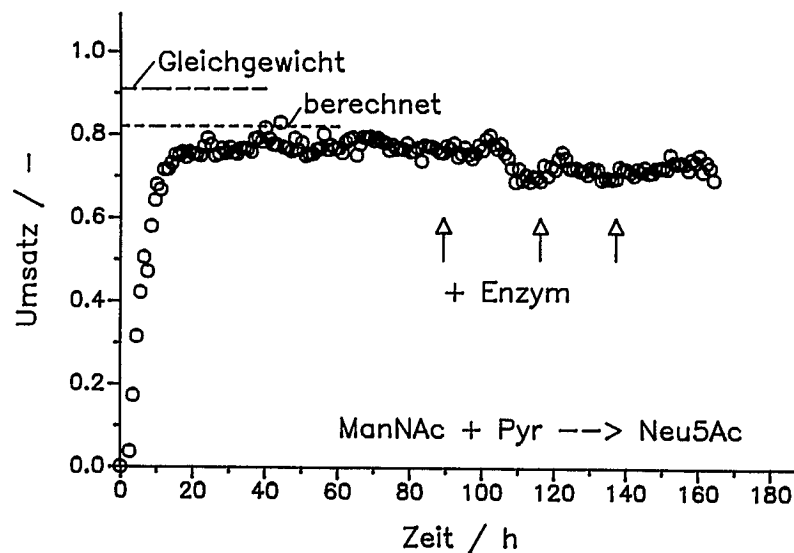


Abb. 3.5.4-2: Umsatz als Funktion der Zeit bei der Neu5Ac-Produktion im 300-g-Maßstab; die Pfeile kennzeichnen die Nachdosierung von je 30 mg Enzym

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu den Experimenten zur Überprüfung der Modellrechnungen.

- Innerhalb von 7 Tagen gelang die Produktion von 250 g Neu5Ac mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 655 g/(L*d) bei einem Umsatz von ca. 78 %.
- Da aus Gründen der Verfügbarkeit für diesen Versuch eine andere Enzymcharge als für die kinetischen Untersuchungen verwendet wurde, weichen der berechnete und der experimentelle Umsatz um ca. 5% voneinander ab.
- Die Dauer des Versuches war durch die zur Verfügung stehende Substratmenge begrenzt; aus diesem Grund war eine Wiederholung des Versuches ebenfalls nicht möglich. Um den kontinuierlichen Betrieb über mindestens 50 Verweilzeiten aufrechtzuerhalten, wurde das Reaktorvolumen auf 70 mL begrenzt.
- Die zum Ende hin zunehmende Nachdosierung des Enzyms (je 30 mg) war notwendig, da auf Grund einer Kontamination mit Mikroorganismen, die auch mikroskopisch nachweisbar waren, ein Umsatzrückgang beobachtet wurde. Für weitere Arbeiten mit dem verwendeten Reaktor ist eine Überarbeitung der technischen Ausführung notwendig, um einen sicheren Sterilbetrieb zu gewährleisten.
- Trotz der Kontamination war der Enzymverbrauch mit 5830 U/kg Produkt niedriger als auf Grund der in Vorversuchen gefundenen Desaktivierung von 11,3 %/d erwartet wurde. Dies könnte auf einen stabilisierenden Einfluß der Substrate hinweisen, der jedoch in anderen Versuchen nicht beobachtet wurde (vgl. Kap. 3.3.4).
- Schwankungen im pH-Wert traten nicht auf, so daß der Verzicht auf Puffersubstanzen auch im größeren Maßstab möglich ist.
- Die erhaltene Produktlösung wurde eingefroren und in kleineren Portionen mittels Anionenaustauschchromatographie aufgearbeitet (vgl. Kap. 6).

Mit den hier gezeigten Ergebnissen konnte bestätigt werden, daß das entwickelte Verfahren zur kontinuierlichen Synthese von Neu5Ac im Enzym-Membran-Reaktor auch für eine Maßstabsvergrößerung geeignet ist.

3.6 Zusammenfassung

- Für ein kontinuierliches Verfahren zur Neu5Ac-Synthese ausgehend von ManNAc wurden die optimalen Bedingungen ermittelt.
- Auf Grund der thermodynamischen Eigenschaften des Systems sind möglichst hohe Substratkonzentrationen günstig, wobei der Pyruvatüberschuß klein gehalten werden kann, um die Produktisolierung zu vereinfachen.
- Für die enzymatische Neu5Ac-Synthese wurde zum ersten Mal ein vollständiger Satz an kinetischen Parametern ermittelt, die den Einfluß aller Reaktanden beschreiben. Die Viskosität des Reaktionsmediums und die Mutarotation der Kohlenhydrate wurden als weitere Einflußgrößen untersucht.
- Das verwendete kinetische Modell beschreibt sowohl die Kinetik als auch die Gleichgewichtslage der Reaktion mit guter Genauigkeit.
- Die Stabilität der Aldolase wird stark durch verschiedene Materialien beeinflusst. Im kontinuierlichen Betrieb wurden Desaktivierungsraten zwischen 2 und 10 %/d gefunden, was einem produktmengenspezifischen Enzymverbrauch zwischen 1500 und 6000 U/kg entspricht.
- Modellrechnungen zur Ermittlung der optimalen Betriebsbedingungen konnten experimentell bestätigt werden.
- Als günstige Bedingungen für die Produktion von Neu5Ac wurden Substratkonzentrationen von 300 mM ManNAc und 600 mM Pyr ermittelt; bei Enzymkonzentrationen von 4 g/L und Verweilzeiten von 3 h lassen sich dabei Raum-Zeit-Ausbeuten von 650 g/(L*d) bei 80% Umsatz erreichen.
- In einem Enzym-Membran-Reaktor mit einem Volumen von 70 mL wurden innerhalb von 7 Tagen 250 g Neu5Ac produziert.

4 Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc

(GlcNAc $\rightleftharpoons$ ManNAc)

4.1 Einführung

N-Acetylmannosamin (ManNAc) ist durch basenkatalysierte Epimerisierung von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) zugänglich (Abb. 4.1-1). GlcNAc kommt in der Natur in großen Mengen als Hauptbestandteil des Chitins vor, das das Stützskelett der Insekten und Krustentiere sowie die Zellwände zahlreicher Pilzgruppen bildet. Im Chitin sind die GlcNAc-Einheiten β -1,4-glycosidisch miteinander verknüpft.

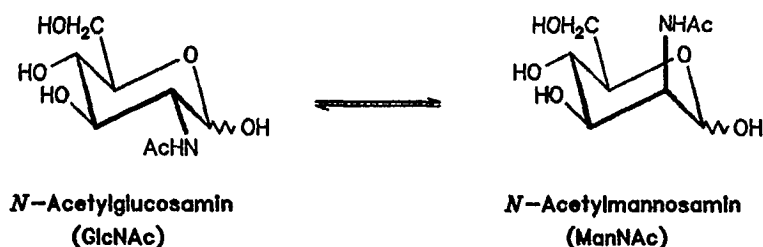


Abb. 4.1-1: Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc

Das Gleichgewicht der Epimerisierung liegt auf der Seite des GlcNAc (GlcNAc:ManNAc = 4:1). Durch Zusatz von Metallionen kann der Gleichgewichtsumsatz erhöht werden (Yoshimura et al., 1972), zur Gewinnung von reinem ManNAc sind aber weiterhin zahlreiche Reinigungsschritte erforderlich. Als Alternative bietet sich die Synthese von Derivaten an, die leichter voneinander getrennt werden können (Mack et al., 1988; Giannis et al., 1991). Diese aufwendige Trennung der beiden Epimere verursacht den hohen Preis von kommerziell erhältlichem ManNAc.

Für die enzymkatalysierte Synthese von Neu5Ac kann ein Gemisch aus ManNAc und GlcNAc eingesetzt werden, da GlcNAc für die Neu5Ac-Aldolase kein Substrat ist und diese nur geringfügig inhibiert (Comb et al., 1958; Augé et al., 1984; Kim et al., 1988; sowie weitere in Kap. 3.3 zitierte Literatur). Eigene Messungen zur exakten Quantifizierung der Inhibierung sind in Kap. 5.3.1 beschrieben. Das durch die basenkatalysierte Epimerisierung und fraktionierte Kristallisation gewonnene Gemisch der beiden Epimere enthält ca. 75% ManNAc und 25% GlcNAc. Es kann ohne weiteres als Substrat in Satzreaktorversuchen oder in dem in Kap. 3 beschriebenen kontinuierlichen Verfahren zur Synthese von Neu5Ac eingesetzt werden.

Besonders einfach und elegant gelingt die Epimerisierung mit Hilfe von Acylglucosamin 2-Epimerase. Durch Kopplung der beiden enzymatischen Reaktionen im Enzym-Membran-Reaktor wird das erzeugte ManNAc direkt zu Neu5Ac umgesetzt. Dieser bisher in der Literatur nur vorgeschlagene Weg zur Synthese von Neu5Ac wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal verwirklicht (Kim et al., 1988; Kragl et al., 1991a).

In diesem Kapitel wird die Ermittlung von Daten zur enzymatischen Epimerisierung beschrieben, die zur Optimierung des gekoppelten System benötigt werden (vgl. Kap. 5). Unter anderem werden folgende Punkte behandelt:

- Mechanismus der Epimerisierung
- Eigenschaften der Acylglucosamin 2-Epimerase und Bestimmung der kinetischen Parameter
- Einsatz der Epimerase im kontinuierlichen Prozeß und experimenteller Beweis der Modellrechnungen.

4.2 Mechanismus der Epimerisierung und Gleichgewichtslage

Spivak et al. beschrieben 1959 die basenkatalysierte Epimerisierung von GlcNAc für die Synthese von ManNAc. Durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Untersuchungen konnte der in Abbildung 4.2-1 dargestellte Mechanismus bestätigt werden (Salo et al., 1976; Hanchak et al., 1976). Es handelt sich dabei um die Lobry de Bruyn-van Ekenstein-Reaktion (Binkley, 1988), die die basenkatalysierte Epimerisierung und Isomerisierung von Kohlenhydraten beschreibt. Für die *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase wird ebenfalls ein Mechanismus unter Ausbildung eines Enols vorgeschlagen, der aber experimentell bisher nicht bewiesen wurde (Ghosh et al., 1965a).

- Nach der Ringöffnung kommt es zur Bildung eines Enols, wobei in einem ersten Schritt das Proton an C-2 abgespalten wird.
- Als Base kann entweder ein OH^- -Ion oder eine basische Gruppe im aktiven Zentrum der Epimerase die Abspaltung des Protons katalysieren. Häufig übernimmt der Imidazolring des Histidins diese Rolle (vgl. auch Abb. 3.3.2-1, Mechanismus der Neu5Ac-Aldolase; Noltmann, 1972)

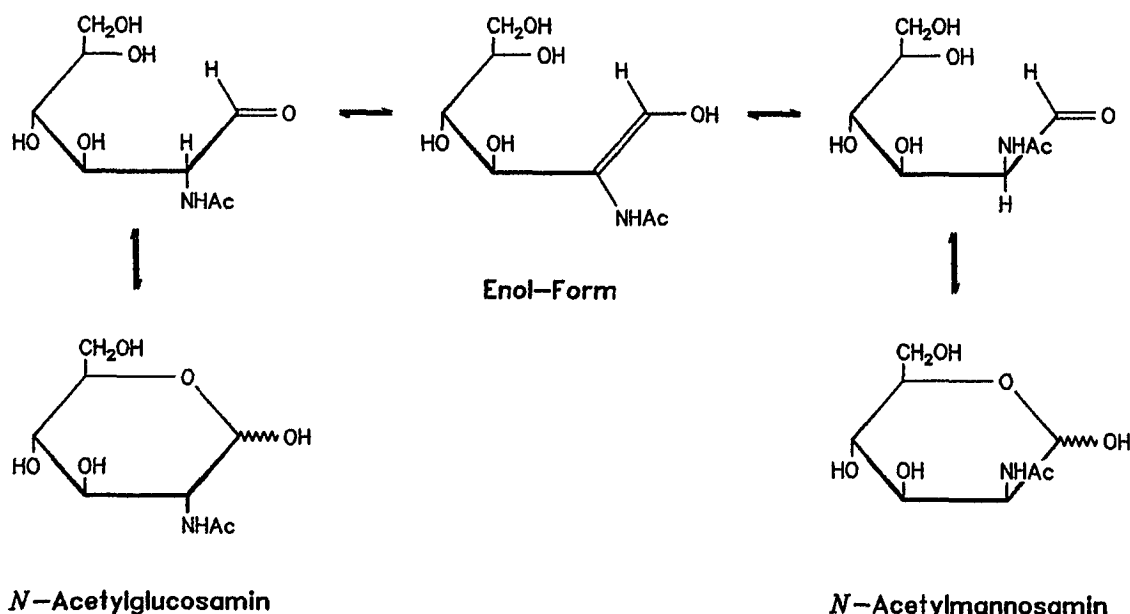


Abb. 4.2-1: Mechanismus der Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc (nach Salo et al., 1976)

- Durch die Acetamidogruppe mit einem negativen induktiven Effekt wird die Abspaltung des Protons beschleunigt.
- GlcNAc ist energetisch günstiger, da die Acetamidogruppe äquatorial steht (vgl. Abb. 4.1-1), so daß es im thermodynamisch kontrollierten Gleichgewicht überwiegt.

Gleichgewichtslage der Epimerisierung

Die Gleichgewichtskonstante der Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc ist durch Gleichung 4.2-1 definiert.

$$K_{eq}^B = \frac{[\text{ManNAc}]}{[\text{GlcNAc}]} \quad (4.2-1)$$

mit: K_{eq}^B – Gleichgewichtskonstante der Epimerisierung

Im Gleichgewicht liegen etwa 20% ManNAc und 80% GlcNAc vor; der Wert der Gleichgewichtskonstanten wird vom pH-Wert und von der Temperatur nur wenig beeinflusst, wie die folgenden Werte zeigen:

- $K_{eq}^B = 0,235$ bei Raumtemperatur und pH 11 (Hanchak et al., 1976)
- $K_{eq}^B = 0,256$ bei 37 °C und pH 7,6 (Ghosh et al., 1965b)
- $K_{eq}^B = 0,201 \pm 0,011$ bei 25 °C und pH 7,5 (diese Arbeit).

Die beobachteten Unterschiede im Zahlwert für K_{eq}^B werden bereits durch Schwankungen von $\pm 3\%$ in den experimentell bestimmten Gleichgewichtskonzentrationen verursacht.

Die Wahl der in dieser Arbeit benutzten Bedingungen ist in Kap. 4.3.3 beschrieben; die Gleichgewichtskonzentrationen der enzymatisch durchgeführten Epimerisierung wurden mit HPLC bestimmt.

4.3 Das Enzym *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase

In diesem Kapitel wird nach einer Beschreibung des Vorkommens und der Eigenschaften des Enzyms die Bestimmung der kinetischen Daten beschrieben. Im einzelnen werden die folgenden Punkte behandelt:

- Vorkommen und Eigenschaften.
- Kinetisches Modell.
- Bestimmung der kinetischen Parameter.
- Enzymstabilität.

4.3.1 Vorkommen und Eigenschaften

N-Acylglucosamin 2-Epimerase, E.C. 5.1.3.8, CAS-Nr. [37318-34-6] wurde zuerst aus Schweinenieren isoliert (Ghosh et al., 1965b). Ihre Rolle im tierischen Stoffwechsel ist noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spielt sie eine Rolle bei der Synthese von Neu5Ac, wenn der normale Weg über GlcNAc-6-Phosphat und UDP-GlcNAc zum ManNAc-6-Phosphat blockiert ist (Schauer, 1982a). In Bakterien und Hefen ist die Epimerase als katabolisches Enzym induzierbar, allerdings werden nur geringe Aktivitäten erzielt (Biswas et al., 1982).

ATP wirkt als allosterischer Aktivator der Epimerase, d. h. es vergrößert die Aktivität und die Substrataffinität des Enzyms (Datta, 1970, 1975).

Die *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase gehört zu den Isomerasen, die die Enzymklasse 5 bilden. Der Mechanismus läuft wahrscheinlich ebenso wie der der basenkatalysierten Epimerisierung über ein Enol als Zwischenstufe (vgl. Abb. 4.2-1) (Ghosh et al., 1965a; Glaser, 1972). Adenosintriphosphat (ATP) nimmt an der Reaktion nicht teil. Phosphorylierte Zucker als Zwischenstufen wurden nicht beobachtet (Ghosh et al., 1965b).

Das Molgewicht der Epimerase beträgt etwa 100000 u (Toyobo, 1989); in der Gelelektrophorese zeigen sich 2 Untereinheiten mit ca. 43000 u (eigene Messung).

Eine Zusammenstellung der Eigenschaften der Epimerase findet sich in folgenden Stellen: Ghosh et al., 1965b; Datta, 1970; Anhang A2 dieser Arbeit, Datenblatt von Toyobo zur verwendeten Epimerase, die ebenfalls aus Schweinenieren stammt.

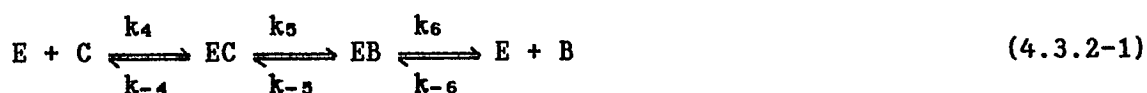
Zusammen mit Neu5Ac-Aldolase und *N*-Acetylhexosaminoxidase kann die Epimerase zur enzymatischen Bestimmung von Neu5Ac z. B. in klinischen Tests verwendet werden (Toyobo, 1985, 1989; Teshima et al., 1988).

4.3.2 Kinetisches Modell

Da der genaue Reaktionsmechanismus der Epimerase nicht bekannt ist, wird in einem rein formalkinetischen Ansatz ein Modell verwendet, das folgenden Anforderungen genügt:

- Beschreibung aller wesentlichen Einflußgrößen mit möglichst wenigen, signifikanten Parametern.
- Gültigkeit für einen möglichst großen Konzentrationsbereich der Reaktanden.
- Gültigkeit über den gesamten Umsatzbereich bei Konzentrationen, wie sie für die spätere Anwendung relevant sind.
- Korrekte Beschreibung der kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften des Reaktionssystems.

Wie im folgenden Kapitel gezeigt werden wird, erfüllt das hier vorgestellte Modell obige Forderungen, wobei lediglich 4 Parameter zur Beschreibung der Kinetik der Hin- und Rückreaktion des in Gleichung 4.3.2-1 angegebenen Reaktionssystems genügen.



Genau wie bei der Beschreibung des kinetischen Modells der Neu5Ac-Aldolase werden zur Vereinfachung der Schreibweise die Reaktanden mit den Buchstaben B und C bezeichnet, wobei folgende Zuordnung besteht:



Die gleichen Buchstaben werden auch zur Bezeichnung der zugehörigen K_m -Werte und der massen- bzw. volumenspezifischen Aktivität verwendet.

Das prinzipielle Verfahren zur Herleitung der Geschwindigkeitsgleichung nach dem "steady-state Ansatz" ist bereits bei der Beschreibung des kinetischen Modells der Neu5Ac-Aldolase erläutert worden (vgl. Kap. 3.3.2). Hier wird daher nur die erhaltene Geschwindigkeitsgleichung angegeben; für die Ableitung sei auf die entsprechende Literatur verwiesen (Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1981).

Die Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Bildung unter Berücksichtigung der Rückreaktion wird durch Gleichung 4.3.2-2 beschrieben:

- Der Einfluß der ATP-Konzentration wird im Modell nicht berücksichtigt. Bei allen kinetischen Messungen und kontinuierlichen Experimenten wurde ATP in genügend hohen Konzentrationen (2 bis 5 mM) zugegeben, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.
- Es wird nicht zwischen Furanose- und Pyranoseform sowie α -, β -Anomer und offenkettiger Form der Zucker unterschieden. Welche Form vom Enzym gebunden wird, ist nicht bekannt.
- Bei Betrachtung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, d. h. die Konzentration eines der Reaktanden ist gleich Null, geht Gleichung 4.3.2-2 in eine normale Michaelis-Menten-Gleichung über.

- Das Modell kommt ohne zusätzliche Konstanten zur Beschreibung der Produktinhibierung aus. Die Konkurrenz der beiden Reaktanden um das aktive Zentrum des Enzyms wird allein durch die beiden K_m -Werte beschrieben.

$$v_2 = \frac{d[B]}{dt} = \frac{[E]_{\text{Epi}} * \left(\frac{A_{\text{max}}^C * [C]}{K_m^C} - \frac{A_{\text{max}}^B * [B]}{K_m^{Bs}} \right)}{1 + \frac{[C]}{K_m^C} + \frac{[B]}{K_m^{Bs}}} \quad (4.3.2-2)$$

mit:	v_2	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Synthese
	A_{max}^C	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von GlcNAc
	A_{max}^B	kat/g	maximale massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von ManNAc
	K_m^C	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente C = GlcNAc
	K_m^{Bs}	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante der Komponente B = ManNAc; das "s"-Zeichen dient zur Unterscheidung von K_m^B aus der Kinetik der Aldolase
	$[B, C]$	mol/L	Konzentration der Komponente B, C
	$[E]_{\text{Epi}}$	g/L	Enzymkonzentration (Epimerase)

Die Haldane-Beziehung verknüpft die kinetischen Parameter mit der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}^B . Sie ergibt sich aus der Gleichgewichtsbedingung $d[B]/dt = 0$ und läßt sich aus Gleichung 4.3.2-2 herleiten:

$$K_{\text{eq}}^B = \frac{A_{\text{max}}^C * K_m^{Bs}}{A_{\text{max}}^B * K_m^C} \quad (4.3.2-3)$$

mit: K_{eq}^B - Gleichgewichtskonstante der Epimerisierung

Im folgenden Kapitel wird die Ermittlung der kinetischen Parameter der Epimerase beschrieben. Die daraus nach Gl. 4.3.2-3 berechnete Gleichgewichtskonstante wird mit der experimentell ermittelten verglichen.

4.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der Epimerase

In diesem Kapitel wird die Bestimmung der kinetischen Parameter der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase beschrieben. Dabei werden nach einer kurzen Einführung folgende Punkte behandelt:

- Beschreibung der verwendeten Methoden.
- Untersuchungen zur Festlegung der Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur, ATP- und Mg^{2+} -Konzentration).
- Bestimmung der kinetischen Parameter aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit.
- Experimentelle Überprüfung von Modellrechnungen für Satzreaktorversuche.

Einführung und Methoden

Nach Gl. 4.3.2-2 genügen die massenspezifischen Aktivitäten und K_m -Werte für eine vollständige Beschreibung der Kinetik der Epimerase. Die in der Literatur angegebenen Werte wurden jedoch unter anderen Bedingungen ermittelt als sie für den kontinuierlichen Prozeß günstig sind. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Kinetik der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase in Bezug auf die Reaktanden GlcNAc und ManNAc untersucht. Untersuchungen zum Einfluß von ATP und Mg^{2+} auf die Enzymaktivität wurden nur begrenzt durchgeführt, um sicherzustellen, daß die weiteren Experimente unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden. Für die kinetischen Messungen und die kontinuierlichen Versuche stand nur eine begrenzte Enzymmenge zur Verfügung, so daß die Untersuchungen nicht im gleichen Umfang wie bei der Neu5Ac-Aldolase durchgeführt werden konnten.

Die Quantifizierung von GlcNAc und ManNAc erfolgte wie bei den Messungen zur Kinetik der Aldolase durch HPLC, wobei für die beiden Epimeren Basislinientrennung erreicht wird (vgl. Kap. 9.1.1). Enthält die Probe nur wenig des einen Epimeren neben einer großen Menge des anderen, streuen die gefundenen Flächen sehr stark. Durch Mehrfachbestimmungen kann die Qualität der Daten verbessert werden, doch speziell bei den Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit kommt es zu einer etwas stärkeren Streuung der Meßwerte.

Die Experimente wurden in gleicher Weise wie die zur Untersuchung der Aldolase durchgeführt (vgl. Kap. 3.3.3); auf Unterschiede wird im folgenden eingegangen:

- Bei Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde das entstehende Reaktionsprodukt (ManNAc bzw. GlcNAc) quantifiziert. Die Produktinhibierung konnte mit diesen Messungen nicht untersucht werden, da die geringe Konzentrationszunahme bei zugesetzter größerer Produktmenge nicht exakt bestimmt werden kann. Zur Überprüfung der Produktinhibierung wurden daher Satzreaktorversuche durchgeführt und mit berechneten Konzentrations-Zeit-Verläufen verglichen.

- Wie auch bei der Neu5Ac-Aldolase wurde für die kinetischen Messungen verdünnter Phosphatpuffer (10 mM – 20 mM KH_2PO_4 , titriert auf pH 7,5) verwendet, der die Aktivität der Epimerase nicht beeinflusst.
- Enzymeinwaagen werden in g bzw. mg des verwendeten Lyophilisats angegeben, das laut Herstellerangaben etwa 50% Protein und 50% Stabilisatoren enthält (Toyobo, 1989). Eigene Messung ergaben einen Proteingehalt von 38%. Konzentrationen bis zu 100 mM des als Stabilisator verwendeten Kaliumgluconat beeinflussen die Aktivität der Epimerase nicht. Bei dieser Messung wie auch bei den unten beschriebenen Messungen zum Einfluß des ATP und Mg^{2+} wurde das Protein durch ein einfaches säulenchromatographisches Verfahren entsalzt (Säule PD 10 der Firma Pharmacia, Freiburg).

Untersuchungen zur Festlegung der Reaktionsbedingungen

Da die Epimerase zur *in situ*-Erzeugung von ManNAc zusammen mit der Neu5Ac-Aldolase eingesetzt werden soll, müssen die Enzyme unter ähnlichen Bedingungen einsetzbar sein. In erster Linie bedeutet das, daß sie ähnliche Temperatur- und pH-Optima für die Aktivität und Stabilität besitzen. Ebenso darf die Beeinflussung durch die Substrate und Produkte des anderen Enzyms nicht zu stark sein; die Ergebnisse hierzu finden sich in Kap. 5.3.

Im folgenden werden die Ermittlung der pH- und Temperaturabhängigkeit der Epimerase sowie Messungen zum Einfluß von ATP und Mg^{2+} auf die Aktivität beschrieben; Angaben zur Stabilität finden sich in Kap. 4.3.4.

Bis auf die Messungen zum Einsatz von polymervergrößertem ATP wurde die Aktivität der Epimerase bei unterschiedlichen Bedingungen durch Messungen von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmt.

pH-Abhängigkeit der Aktivität der N-Acylglucosamin 2-Epimerase

In Abbildung 4.3.3-1 ist die pH-Abhängigkeit der Epimerisierung ausgehend sowohl von GlcNAc als auch von ManNAc dargestellt. Für beiden Richtungen der Reaktion ist die Abhängigkeit vom pH-Wert nur schwach ausgeprägt. Auffällig sind die beiden höheren Aktivitätswerte bei pH 7,9. Für dieses reproduzierbare Verhalten, das sich auch bei Literaturangaben findet (Datta, 1970), konnte keine Erklärung gefunden werden.

Aldolase und Epimerase zeigen somit eine ähnliche pH-Abhängigkeit der Aktivität. Die weiteren Untersuchungen zur Epimerase wurden bei pH 7,5 durchgeführt.

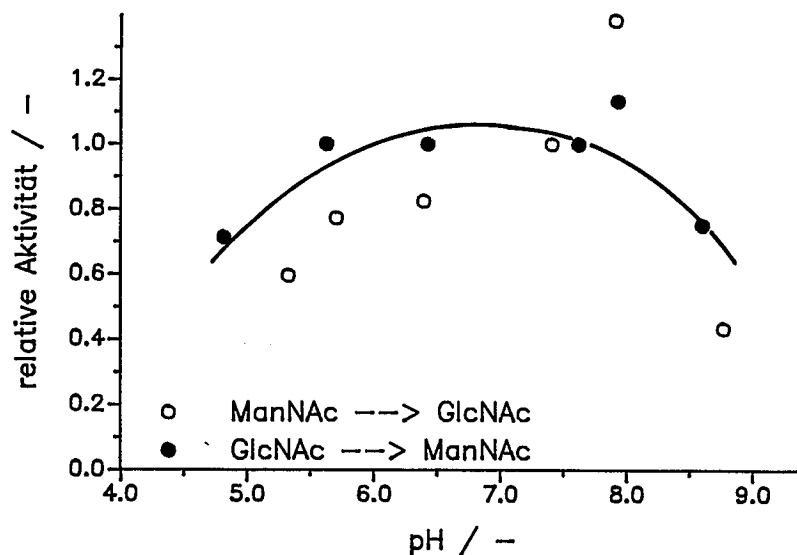


Abb. 4.3.3-1: pH-Abhängigkeit der enzymatischen Epimerisierung
Bedingungen: 44,7 mM ManNAc, 0,25 mg/mL Epimerase;
100 mM GlcNAc, 0,41 mg/mL Epimerase; 25 °C

Temperaturabhängigkeit der Aktivität der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase

Die Temperaturabhängigkeit der Epimerase, die in Abb. 4.3.3-2 dargestellt ist, wurde nur für die Umsetzung von GlcNAc untersucht.

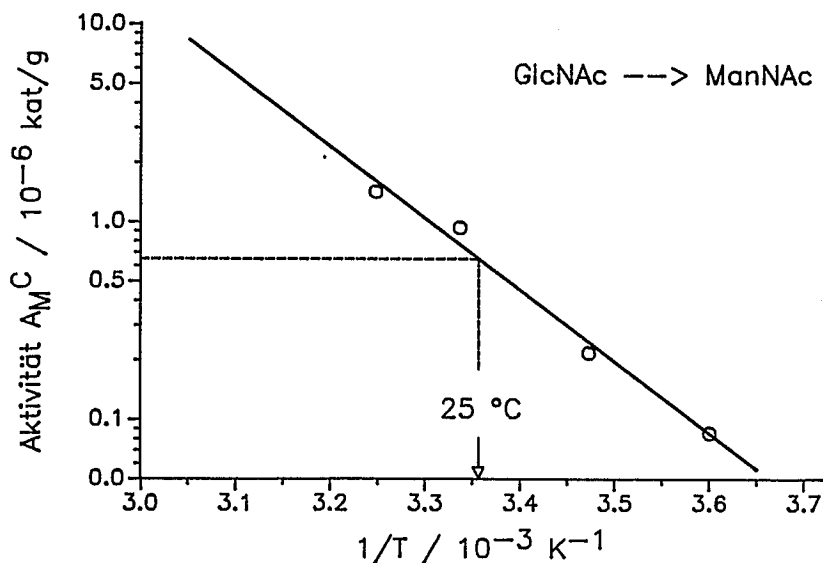


Abb. 4.3.3-2: Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Epimerisierung von GlcNAc
Bedingungen: 103 mM GlcNAc, 0,23 mg/mL Epimerase; pH 7,5

Die günstigste Temperatur für die Verwendung des gekoppelten Systems ist durch die Gleichgewichtslage der Neu5Ac-Synthese gegeben. Bei der Epimerase wurde daher vor allem der Temperatureinfluß auf die Stabilität untersucht (vgl. Kap. 4.3.4).

Aus den Daten läßt sich die Aktivierungsenergie der enzymatischen Epimerisierung des GlcNAc berechnen:

$$E_A^c = 69,5 \text{ kJ/mol}$$

Dieser Wert liegt in der Größenordnung, die für enzymkatalysierte Reaktionen im allgemeinen angegeben wird (20–60 kJ/mol, Segel, 1975).

Einfluß von ATP und Mg^{2+} auf die Aktivität der Epimerase

Die Epimerase benötigt ATP als allosterischen Effektor (Datta, 1970, 1975), der die Aktivität um den Faktor 20 erhöht sowie die Substrataffinität vergrößert. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird nach Literaturangaben bei etwa 5 mM ATP erreicht (Ghosh et al., 1965b; Datta, 1970, 1975). Reaktionen, an denen ATP beteiligt ist, erfordern in der Regel Mg^{2+} oder andere zweiwertige Kationen, die durch Komplexbildung die negative Ladungsdichte am ATP reduzieren (Page, 1984). Für die Epimerase ist die genaue Funktion der Mg^{2+} -Ionen bisher nicht geklärt.

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen dienen dazu, in begrenztem Umfang den Einfluß des ATP und des Mg^{2+} aufzuklären, um Limitierungen oder Inhibierungen durch zu geringe oder zu hohe Konzentrationen vermeiden zu können.

Zunächst wurde der Gehalt an ATP und Mg^{2+} in der Enzympräparation bestimmt, da beide Komponenten laut Herstellerangaben als Stabilisatoren zugesetzt werden (Toyobo, 1989). Die Bestimmung von Magnesium und Phosphor erfolgte durch Atom-Emissions-Spektrometrie (Zentralabteilung für Chemische Analysen, Forschungszentrum Jülich GmbH). Diese Methode erfaßt den Gesamtgehalt der beiden Elemente. Bei der Berechnung des ATP-Gehaltes wird in erster Näherung davon ausgegangen, daß dies die einzige vorhandene phosphorhaltige Verbindung ist. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3.3–1 zusammengestellt.

1,21 ± 0,10 % P	==>	0,130 ± 0,011 mmol ATP/g Lyophilisat
0,091 ± 0,005 % Mg	==>	0,037 ± 0,002 mmol Mg^{2+} /g Lyophilisat

Tab. 4.3.3–1: Gemessene Mg- und P-Gehalte der Epimerasepräparation und daraus berechnete Werte

Zur Messung des ATP- und Mg^{2+} -Einflusses wurde die kommerzielle Enzympräparation entsalzt (Vorschrift s. Kap. 9.2) und die Kinetik bezüglich ATP gemessen. Da aus Stabilitätsgründen immer nur kleine Enzymmengen entsalzt wurden, sind die Absolutwerte für die massenspezifischen Aktivitäten nur in ihrer

Größenordnung vergleichbar. Die Konzentrationsabhängigkeit der Aktivität sollte dadurch jedoch nicht beeinflußt werden. In Abb. 4.3.3-3 ist die massenspezifische Aktivität der Epimerase als Funktion der ATP-Konzentration dargestellt. Mg^{2+} wird in Form von $MgCl_2$ in äquimolarer Menge zugegeben. Die Aktivität wird hierbei auf die eingesetzte Menge Protein, nicht auf die Menge Lyophilisat bezogen! Daher ist die maximal erreichbare Aktivität gegenüber den unten beschriebenen Messungen zum Substrateinfluß etwa um den Faktor 3 größer. Die Aktivität steigt mit steigender ATP-Konzentration zunächst sehr stark an; ab ca. 0,5 mM ATP ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die beobachtete massenspezifische Aktivität von 0,5 $\mu\text{kat/g}$ ohne Zusatz von ATP kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

- die Epimerase besitzt eine ATP-unabhängige Aktivität (Datta, 1975)
- das in der Enzympräparation vorhandene ATP wird durch dieses einfache und leicht durchzuführende Reinigungsverfahren nicht vollständig entfernt. Möglicherweise ist das ATP sehr fest an die Epimerase gebunden.

Aus der dargestellten Kurve ergibt sich, daß ATP-Konzentrationen größer 0,5 mM ausreichen, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerase zu bewirken. Dieser Wert als minimal erforderliche ATP-Konzentration wurde auch im kontinuierlichen Versuch bestätigt (vgl. Kap. 4.4.2).

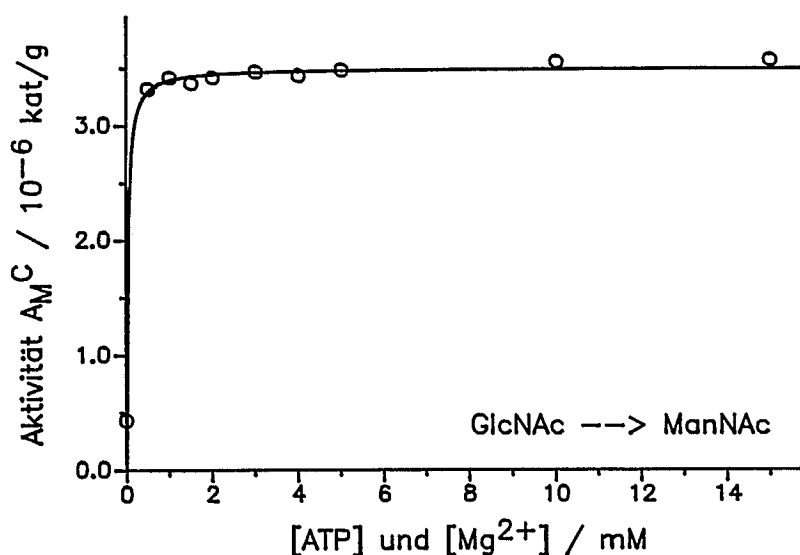


Abb. 4.3.3-3: Einfluß von ATP und Mg^{2+} auf die Aktivität der Epimerase; die Aktivität ist hier auf g Protein, nicht g Lyophilisat bezogen
Bedingungen: 86 mM GlcNAc, 0,104 mg/mL Epimerase (entsalzt); 25 °C, pH 7,5

Da ATP nur in katalytischen Mengen zur Aufrechterhaltung der Aktivität der Epimerase benötigt wird, wäre es vorteilhaft, wenn es zusammen mit dem Enzym im Enzym-Membran-Reaktor zurückgehalten werden kann. Dies gelingt, wenn der Cofaktor durch Kopplung an ein lösliches Polymer molekulargewichtsvergrößert wird. Dieses Konzept wurde für den Einsatz von Oxidoreduktasen in kontinuierlichen Prozessen entwickelt, wobei das erforderliche NADH an Polyethylenglycol

mit einem Molekulargewicht von 20000 u gekoppelt wird. Durch eine zweite enzymatische Reaktion kann der Cofaktor kontinuierlich regeneriert werden (Kula et al., 1987). Bei der Synthese von Glucose-6-phosphat mit Hexokinase im Enzym-Membran-Reaktor wurde polymervergrößertes ATP verwendet (Berke, 1984; Berke et al., 1988), das auch für den Einsatz mit der Epimerase getestet wurde. In Abb. 4.3.3-4 sind die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Epimerisierung von GlcNAc ohne Zusatz von ATP und beim Zusatz nativem und an Polyethylenglycol 20000 gebundenem ATP (PEG-ATP) dargestellt. Die Struktur des verwendeten PEG-ATP ist in Kap. 9.3 beschrieben. Die Epimerase ist auch mit PEG-ATP aktiv, die Aktivität ist aber deutlich geringer als bei Verwendung von nativem ATP. Weitergehende Untersuchungen konnte wegen der begrenzten Menge an verfügbarem PEG-ATP nicht durchgeführt werden. Dieser Ansatz ist insofern interessant, da durch die Rückhaltung im Reaktor das ATP nicht bei der Produktaufarbeitung abgetrennt werden müßte.

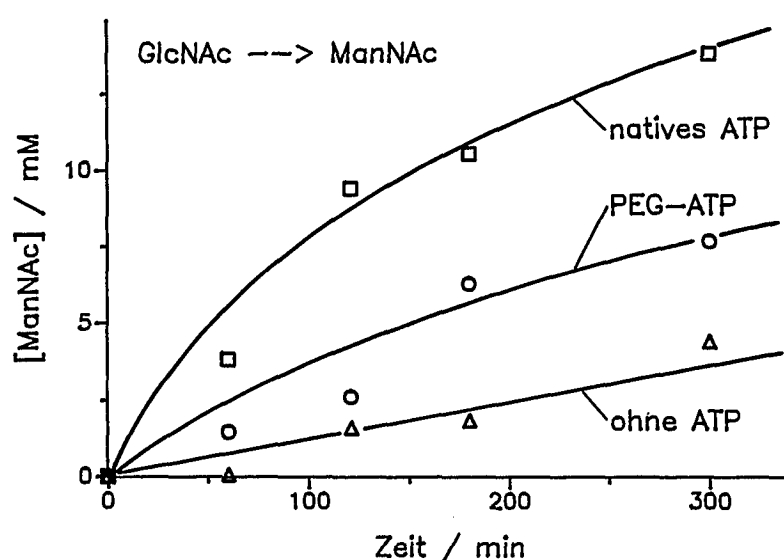


Abb. 4.3.3-4: Konzentrations-Zeit-Verlauf der Epimerisierung von GlcNAc bei Zusatz von PEG-ATP und nativem ATP
Bedingungen: 100 mM GlcNAc, 5 mM Mg^{2+} , 2 mM ATP bzw. PEG-ATP, 1,5 mg/mL Epimerase (entsalzt); 25 °C, pH 7,5

Der Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf die Aktivität der Epimerase bei zwei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen ist in Abb. 4.3.3-5 dargestellt. Aus diesen Messungen mit dem entsalzten Enzym ergibt sich, daß Mg^{2+} -Ionen für die Aktivität der Epimerase nicht unbedingt erforderlich sind, obwohl mit zunehmender Konzentration ein leichter Aktivitätsanstieg zu beobachten ist. Die gefundene massenspezifische Aktivität ist geringer als in die in Abb. 4.3.3-3, da hier die Konzentrationsbestimmung zur Aktivitätsberechnung bei höherem Umsatz erfolgte und dadurch keine echten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gemessen wurden. Mit zunehmender Produktkonzentration ($\approx$ ManNAc) sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit ab, da beide Substrate (GlcNAc und ManNAc) um die Bindung am aktiven Zentrum konkurrieren. Innerhalb der Meßreihe sind die Werte aller-

dings miteinander vergleichbar. Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß die Stabilität der Epimerase bei Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP um den Faktor 3 verbessert wird. Daher werden beide Substanzen insbesondere beim Einsatz der Epimerase im Enzym-Membran-Reaktor der Reaktionslösung zugegeben (Konzentration 5 mM).

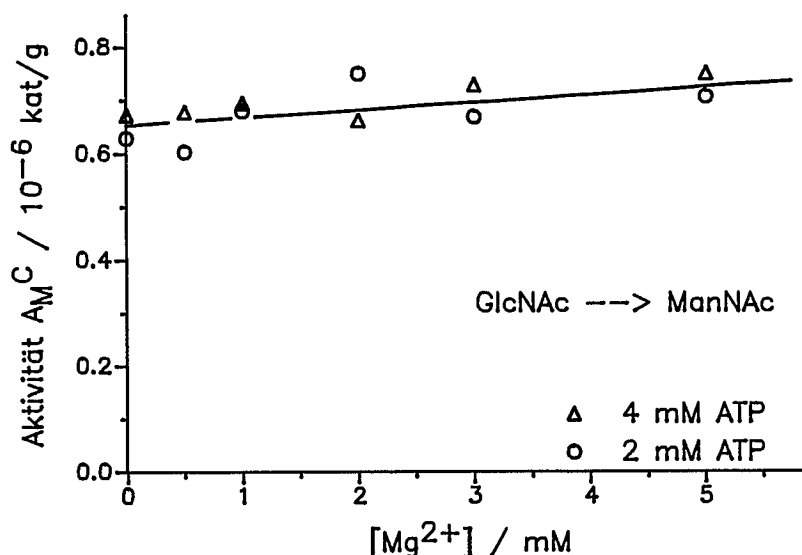


Abb. 4.3.3-5: Einfluß von Mg^{2+} auf die Aktivität der Epimerase; die Aktivität ist hier auf g Protein, nicht g Lyophilisat bezogen
Bedingungen: 100 mM GlcNAc, 2 mM ATP, 1,5 mg/mL Epimerase (entsalzt); 25 °C, pH 7,5

Aktivität der Epimerase als Funktion der Proteinkonzentration

Zwischen der Proteinkonzentration und der volumenspezifischen Aktivität (= Reaktionsgeschwindigkeit) der Epimerase bei gegebener Substratkonzentration besteht nach Gl. 4.3.2-2 ein linearer Zusammenhang, dessen experimentelle Überprüfung in Abb. 4.3.3-6 dargestellt ist.

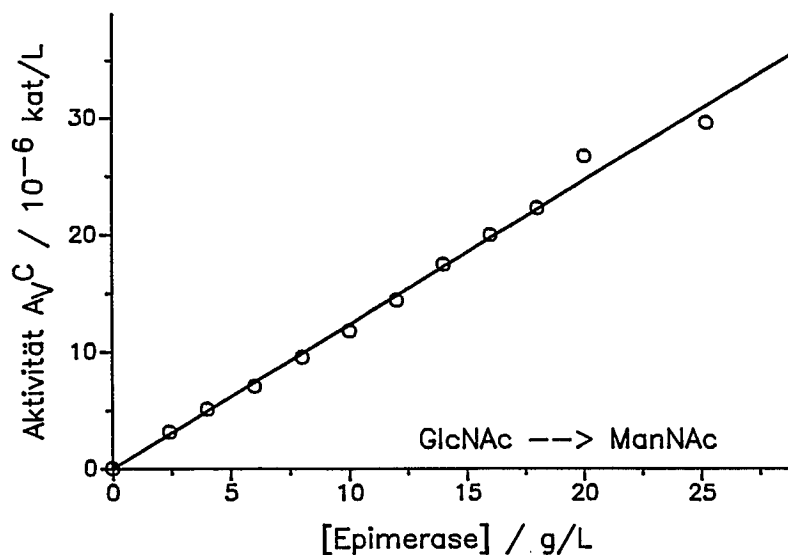


Abb. 4.3.3-6: Volumenspezifische Aktivität der Epimerase als Funktion der Enzymkonzentration
Bedingungen: 100 mM GlcNAc; 25 °C, pH 7,5

Standardbedingungen

Auf Grund der vorstehend beschriebenen Ergebnisse wurden die kinetischen Parameter der Epimerase bei folgenden Standardbedingungen bestimmt:

- pH 7,5.
- 25 °C.
- Puffer 10 mM – 20 mM KH_2PO_4 , titriert mit NaOH auf pH 7,5.
- ATP und Mg^{2+} sind in ausreichender Menge in der Enzympräparation enthalten, so daß eine Zugabe in der Regel nicht nötig ist. Im Zweifelsfall wurde die Messung unter Zusatz von 2 mM ATP und Mg^{2+} wiederholt.

Bestimmung der kinetischen Parameter aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit

Die vollständige Kinetik der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase wird nach Gl. 4.3.2-2 allein durch die massenspezifischen Aktivitäten und die K_m -Werte beschrieben, die sich aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmen lassen. Bei Abwesenheit des inhibierenden Produktes geht die Geschwindigkeitsgleichung in eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik über (vgl. Gl. 3.3.2-4).

Abbildung 4.3.3-7 zeigt die massenspezifische Aktivität der Epimerase als Funktion der GlcNAc-Konzentration, Abb. 4.3.3-8 als Funktion der ManNAc-Konzentration. Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe nicht-linearer Regression nach dem Algorithmus von Gauß-Newton ermittelt (Programm Opti, Giesecke 1987) und sind in Tabelle 4.3.3-2 zusammengefaßt. Zur Orientierung ist die zugehörige Geschwindigkeitsgleichung 4.3.3-2 ebenfalls angegeben. In der Tabelle ist neben der experimentell bestimmten Gleichgewichtskonstanten auch die mit Hilfe der Haldane-Beziehung (Gl. 4.3.2-3) aus den kinetischen Parametern berechnete angegeben, die eine gute Übereinstimmung zeigen. Bezogen auf die Zusammensetzung einer Lösung im Gleichgewicht entspricht $K_{eq}^B = 0,201$ 17% ManNAc und 83% GlcNAc, während $K_{eq}^B = 0,237$ 19% ManNAc und 81% GlcNAc entspricht.

A_{max}^C	1,301	$\mu\text{kat/g}$	
	0,0780	U/mg	
A_{max}^B	13,81	$\mu\text{kat/g}$	
	0,829	U/mg	
$K_m^C = K_m^{\text{GlcNAc}}$	14,01	mmol/L	
$K_m^{BS} = K_m^{\text{ManNAc}}$	35,19	mmol/L	
K_{eq}^B	0,201	-	(gemessen)
K_{eq}^B	0,237	-	(berechnet)

Tab. 4.3.3-2: Kinetische Parameter der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase

$$v_2 = \frac{d[B]}{dt} = \frac{[E]_{\text{Epi}} \cdot \left(\frac{A_{max}^C \cdot [C]}{K_m^C} - \frac{A_{max}^B \cdot [B]}{K_m^{BS}} \right)}{1 + \frac{[C]}{K_m^C} + \frac{[B]}{K_m^{BS}}} \quad (4.3.2-2)$$

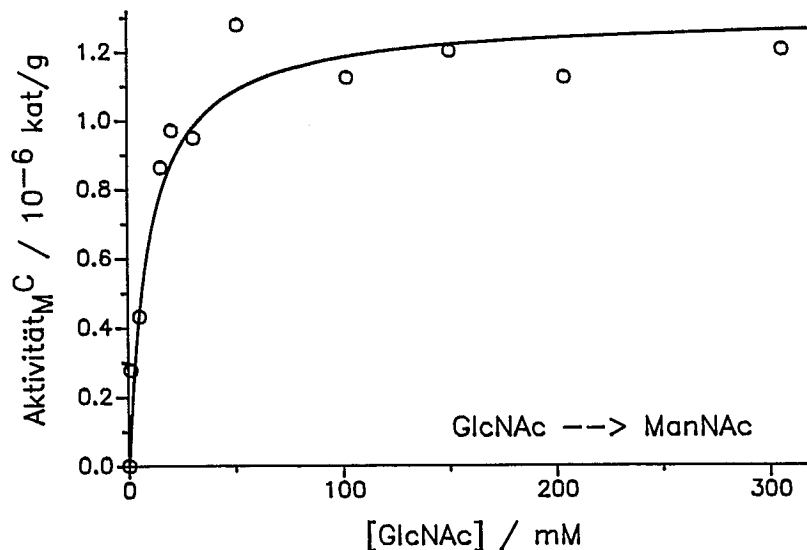


Abb. 4.3.3-7: Massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von GlcNAc
Bedingungen: 0,46 mg/mL Epimerase, 25 °C, pH 7,5

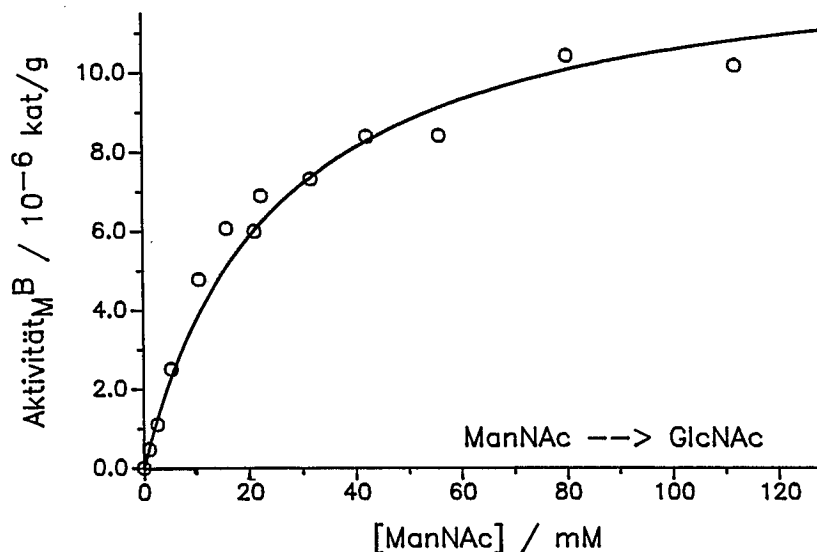


Abb. 4.3.3-8: Massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von ManNAc
Bedingungen: 0,26 mg/mL Epimerase, 25 °C, pH 7,5

Die massenspezifische Aktivität der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase ist insgesamt geringer als die der Neu5Ac-Aldolase. Beim Einsatz des gekoppelten Enzymsystems im kontinuierlichen Verfahren könnte somit die verfügbare Aktivität der Epimerase die limitierende Größe sein (vgl. Kap. 5.4.2). Wie auch bei der Neu5Ac-Aldolase wird für ManNAc und GlcNAc immer die Gesamtkonzentration verwendet; eine Unterscheidung zwischen Furanose- und Pyranoseform, α - und β -Anomer und offenkettiger Form erfolgt nicht.

Bei der Diskussion der Ergebnisse zum Einsatz des gekoppelten Systems wird die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Epimerisierung mit der der basenkatalysierten verglichen (vgl. Kap. 7.1).

Durchführung von Satzreaktorversuchen zur Überprüfung des kinetischen Modells

Die Produktinhibierung konnte durch Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nicht bestimmt werden, da bei Anwesenheit größerer Produktmengen die geringe Konzentrationszunahme nicht genau genug bestimmt werden kann. Statt dessen wurden Satzreaktorversuche durchgeführt und die gemessenen und berechneten Konzentrations-Zeit-Kurven miteinander verglichen. Die Berechnung erfolgt analog zum Verfahren, wie es bei der Neu5Ac-Aldolase beschrieben wurde (vgl. Kap. 3.5.2). Die Stoffbilanzen für den Satzreaktor können durch Nullsetzen des Konvektionsterms aus den Stoffbilanzen für den kontinuierlich betriebenen Reaktor, die sich für die Epimerase in Kap. 4.4.1 finden, abgeleitet werden.

Die Ergebnisse der Satzreaktorversuche sind in den Abbildungen 4.3.3-9 und 4.3.3-10 dargestellt. In Tabelle 4.3.3-3 sind die Ausgangskonzentrationen der Substrate sowie die eingesetzten Enzymkonzentrationen angegeben.

Versuch Nr.	[GlcNAc] ₀ mM	[ManNAc] ₀ mM	[Epimerase] mg/mL
1	45	0	3,0
2	91	0	5,0
3	200	0	7,0
4	300	0	10,0
5	0	47	2,96
6	0	93	4,94
7	0	186	7,05
8	0	280	7,05

Tab. 4.3.3-3: Substrat- und Enzymkonzentrationen der Satzreaktorversuche
Bedingungen: 25 °C; pH 7,5; 20 mM Phosphat-Puffer

Für beide Richtungen der Epimerisierung findet man eine sehr gute Übereinstimmung der experimentellen und berechneten Konzentrations-Zeit-Kurven über den gesamten Umsatzbereich bei allen relevanten Substratkonzentrationen. Die schlechtere Übereinstimmung der Konzentrations-Zeit-Verläufe bei der Epimerisierung von 297 mM GlcNAc wird durch die oben beschriebenen analytischen Schwierigkeiten verursacht. Eine Abnahme der Enzymaktivität mit zunehmender Substratkonzentration wie bei der Neu5Ac-Aldolase wurde nicht beobachtet.

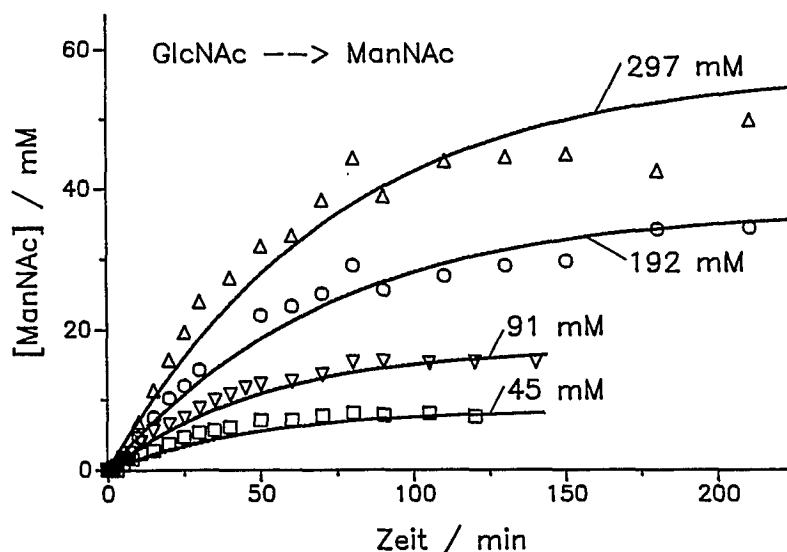


Abb. 4.3.3-9: Konzentrations-Zeit-Verläufe der Epimerisierung von GlcNAc mit Angabe der Ausgangskonzentrationen (Satzreaktorversuche)

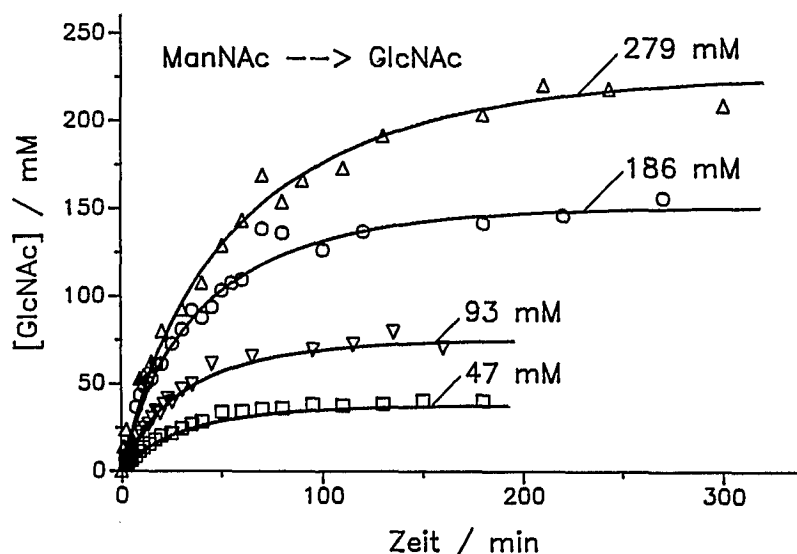


Abb. 4.3.3-10: Konzentrations-Zeit-Verläufe der Epimerisierung von ManNAc mit Angabe der Ausgangskonzentrationen (Satzreaktorversuche)

Das hier verwendete einfachste formalkinetische Modell zur Beschreibung einer reversiblen enzymkatalysierten Reaktion genügt somit, um die Kinetik der Epimerase vollständig über einen großen Konzentrationsbereich und den gesamten Umsatzbereich zu beschreiben. Der mögliche Gleichgewichtsumsatz wird ebenfalls richtig vorhergesagt. Zusätzliche Parameter zur Beschreibung der Produktinhibition sind nicht notwendig.

Einfluß der Mutarotation

Bereits bei der Neu5Ac-Aldolase spielte die Mutarotation des ManNAc nur bei sehr hohen Enzymkonzentrationen eine Rolle (vgl. Kap. 3.4). Die Mutarotation des GlcNAc ist um den Faktor 10 bis 20 langsamer als die des ManNAc (vgl. Tab. 3.4-1 und Abb. 3.4-3), die massenspezifische Aktivität der Epimerase ist jedoch um den Faktor 200 kleiner als die der Aldolase. Daher ist nicht zu erwarten, daß eine Limitierung der enzymatischen Reaktion durch die vorgelagerte Mutarotation erfolgt. Diese hätte sich auch in den oben beschriebenen Satzreaktorversuchen zeigen müssen.

Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes

Mit Hilfe der bestimmten kinetischen Parameter lassen sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion der Epimerisierung von GlcNAc als Funktion des Umsatzes berechnen. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in den folgenden Abbildungen dargestellt. In Abb. 4.3.3-11 sind die beiden Terme aus Gleichung 4.3.2-2 sowie die Differenz über den gesamten Umsatzbereich für eine Substratkonzentration von 100 mM aufgetragen; für die Rechnungen wurde eine Enzymkonzentration von 1 g/L verwendet. Die Abbildungen 4.3.3-12 und 4.3.3-13 zeigen ausgehend von GlcNAc die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit nur bis zum Gleichgewichtsumsatz. Rechnungen für Substratkonzentrationen größer 100 mM sind nicht dargestellt, da die Kurvenverläufe ab 100 mM nahezu deckungsgleich verlaufen.

An Hand von Abb. 4.3.3-11 läßt sich der Einfluß des jeweiligen Produktes auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerisierung erklären. Die Reaktionsgeschwindigkeit v_c der Umsetzung von GlcNAc sinkt bis zum Erreichen des Gleichgewichtsumsatzes nur geringfügig ab, da die Änderung der GlcNAc-Konzentration sehr klein ist und die Produktinhibierung nur schwach ausgeprägt ist (vgl. auch Abb. 4.3.3-12). Für die Umsetzung ausgehend vom ManNAc sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit v_B auf Grund einer starken Produktinhibierung schnell mit zunehmendem Umsatz ab.

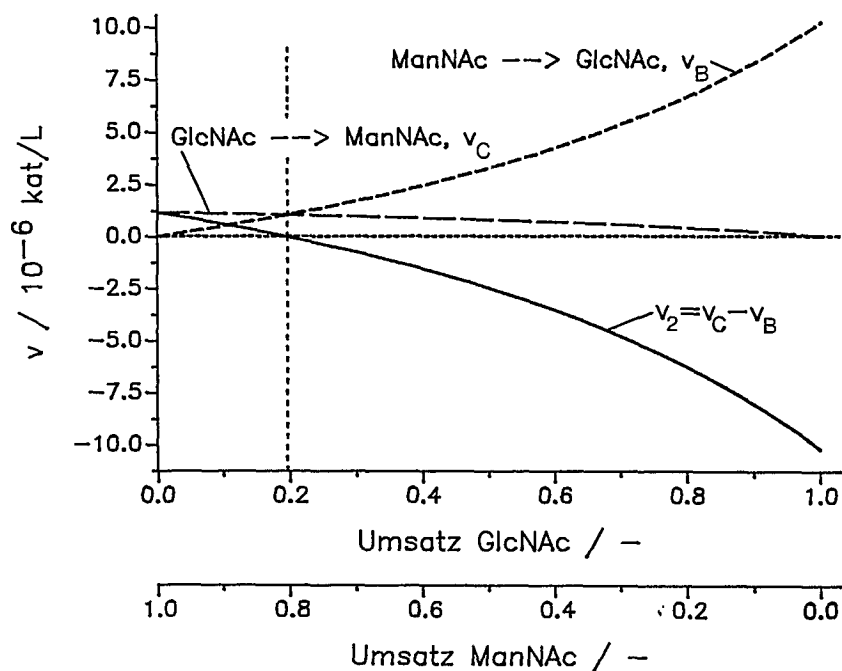


Abb. 4.3.3-11: Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Epimerisierung; 100 mM Substrat, 1 g/L Epimerase

Der Gleichgewichtsumsatz, der durch den Schnittpunkt der Kurven von Hin- und Rückreaktion bestimmt wird, ist für alle drei in Abb. 4.3.3-12 betrachteten Substratkonzentrationen gleich und entspricht dem mit Hilfe der Haldane-Beziehung berechneten Wert (vgl. Tab. 4.3.3-2). Bis zu Substratkonzentrationen von 50 mM steigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerisierung stark an. Bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 mM ist der Anstieg deutlich langsamer, da annähernd die maximale Aktivität der Epimerase erreicht ist (vgl. Abb. 4.3.3.7). Die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit (die Differenz der beiden Terme) nimmt jedoch mit zunehmendem Umsatz stark ab, wie in Abb. 4.3.3-13 dargestellt ist, da die Rückreaktion (ManNAc $\rightarrow$ GlcNAc) zunehmend schneller verläuft.

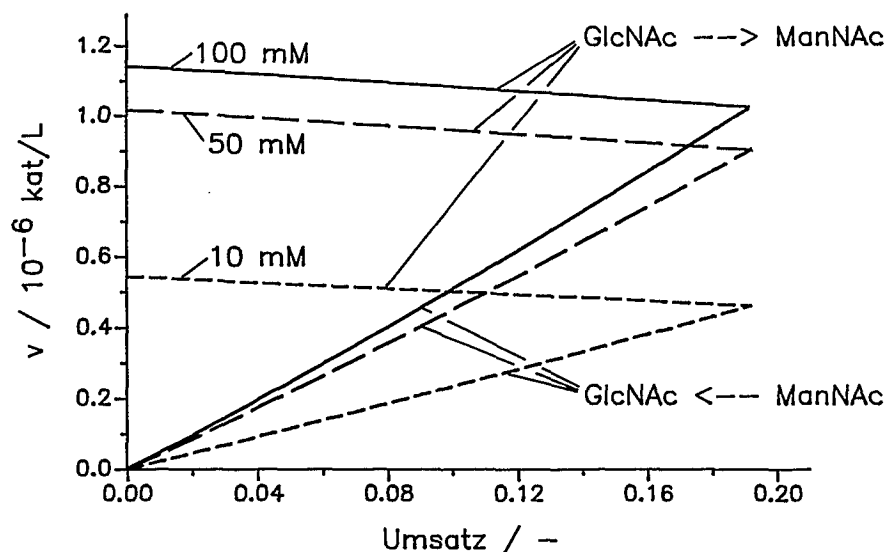


Abb. 4.3.3-12: Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Epimerisierung von GlcNAc; 1 g/L Epimerase

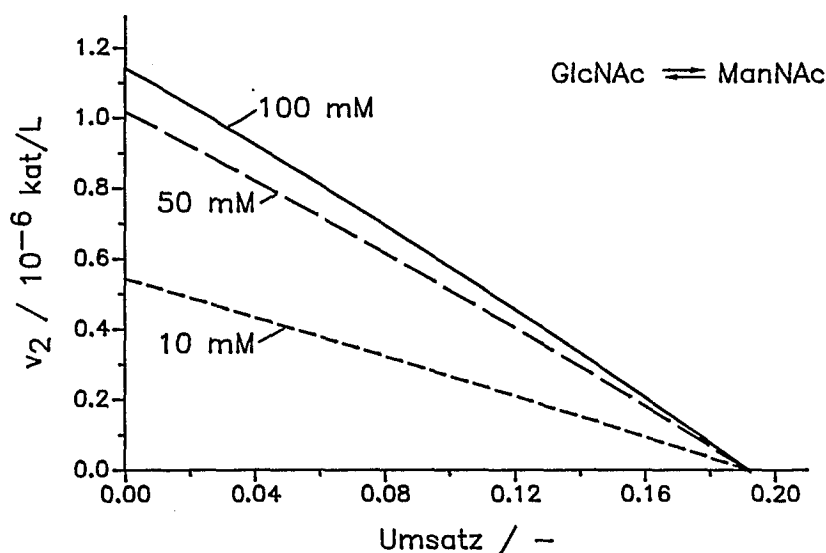


Abb. 4.3.3-13: Berechnete Gesamtreaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes für die Epimerisierung von GlcNAc; 1 g/L Epimerase

Durch die hier vorgestellten Rechnungen werden einige Eigenschaften des Reaktionssystems deutlich, die aus dem kinetischen Modell nicht direkt ersichtlich sind, wie z. B. der unterschiedliche Produkteinfluss für die beiden Reaktionsrichtungen. Auf die stark abfallende Reaktionsgeschwindigkeit bei Annäherung an den Gleichgewichtsumsatz (Abb. 4.3.3-13) wird bei der Berechnung von Betriebspunkten der kontinuierlichen Experimente noch einmal eingegangen (vgl. Kap. 4.4.2).

Zusammenfassung

"Alles sollte so einfach wie möglich gemacht werden, aber nicht einfacher."

<A. Einstein>

- Die Kinetik der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase bezüglich GlcNAc und ManNAc läßt sich mit dem einfachsten Modell für eine reversible enzymkatalysierte Reaktion vollständig über einen großen Konzentrationsbereich und den gesamten Umsatzbereich beschreiben.
- Die kinetischen Parameter wurden aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmt und mit Hilfe von Satzreaktorversuchen überprüft.
- Das verwendete kinetische Modell beschreibt die Kinetik und die Gleichgewichtslage der Reaktion korrekt.
- Der Einfluß von ATP und Mg^{2+} auf die Epimerase wurde untersucht; die erforderlichen Mindestkonzentrationen für die maximale Aktivität wurden bestimmt.
- Die pH- und Temperaturabhängigkeit der Epimerase ist ähnlich der der Neu5Ac-Aldolase und ermöglicht somit den Einsatz des gekoppelten Enzymsystems für die Synthese von Neu5Ac.

4.3.4 Stabilität der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase

Wie bereits bei der Neu5Ac-Aldolase ausgeführt wurde, ist eine gute Langzeitstabilität notwendig, um ein Enzym erfolgreich in kontinuierlichen Prozessen einsetzen zu können. Für die Epimerase wurden Stabilitätsmessungen nur in beschränktem Umfang durchgeführt, da bei Vorversuchen speziell im kontinuierlichen Prozeß im Rahmen der Meßgenauigkeit kein Umsatzrückgang zu beobachten war, der durch einen Abfall der Gesamtaktivität im Reaktor verursacht wird. Der Einfluß verschiedener Materialien auf die Stabilität der Epimerase wurde nicht untersucht. Für die kontinuierlichen Experimente wurde ebenfalls der aus Polypropylen gefertigte Enzym-Membran-Reaktor verwendet.

Abbildung 4.3.4-1 zeigt die Stabilität der Epimerase bei verschiedenen Temperaturen. Während die für 4, 15 und 25 °C gefundenen Desaktivierungskonstanten zuverlässig sind, liegt der für 37 °C gefundene Wert zu hoch. Bei dieser Temperatur trat immer wieder mikrobieller Bewuchs der Probe auf, der auch durch Zusatz antibakteriell wirksamer Mittel ($NaNO_3$) nicht verhindert werden konnte. Näherungsweise wurde aus der Temperaturabhängigkeit der Desaktivierungskonstanten ein Wert von etwa 25 %/d abgeschätzt (Auftragung von $\ln k_{des}$ gegen $1/T$).

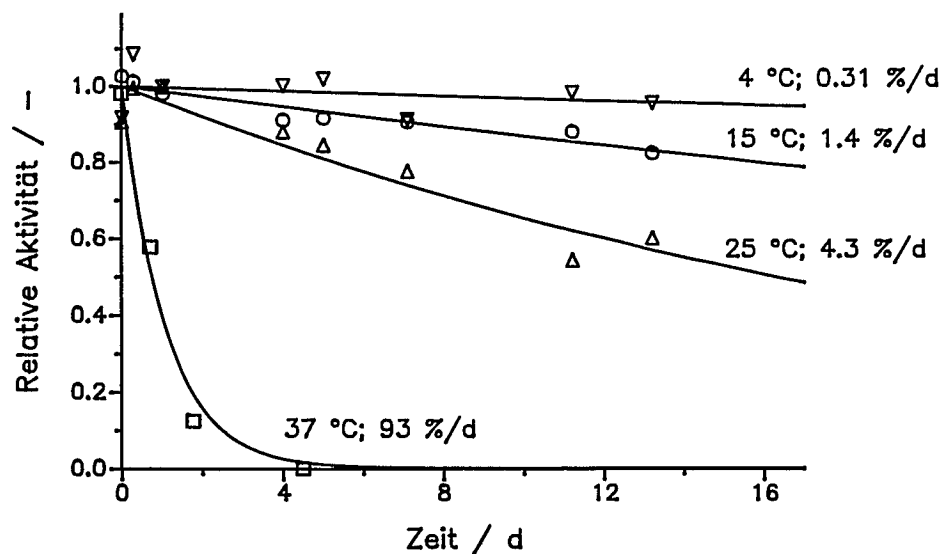


Abb. 4.3.4-1: Stabilität der Epimerase bei verschiedenen Temperaturen; inkubiert wurden jeweils 30 mg/mL Lyophilisat in Puffer, pH 7,5
 Testbedingungen: 100 mM GlcNAc, 5 mM ATP, 5 mM Mg^{2+} , 1,5 mg/mL Epimerase; 25 °C, pH 7,5

Die für die *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase gefundene Desaktivierung bei 25 °C liegt in der gleichen Größenordnung wie die der Neu5Ac-Aldolase, so daß ein Einsatz im Enzym-Membran-Reaktor möglich ist. Genau wie bei der Aldolase scheint auch die Stabilität der Epimerase bei Anwesenheit der Substrate im EMR besser zu sein als bei den Inkubationsversuchen, was allerdings nur für die Aldolase durch direkte Aktivitätsmessungen nachgewiesen wurde. Für die Epimerase ergibt sich diese Schlußfolgerung nur aus der Stabilität des gemessenen Umsatzes in kontinuierlichen Versuchen.

4.4 Einsatz der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase im Enzym-Membran-Reaktor

In diesem Kapitel wird der alleinige Einsatz der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase im Enzym-Membran-Reaktor beschrieben. Durch die Versuche sollte vor allem festgestellt werden, ob die Stabilität der Epimerase im kontinuierlichen Prozeß ausreichend ist, um zusammen mit der Aldolase eingesetzt werden zu können. Gleichzeitig wurde überprüft, ob das kinetische Modell auch für die Beschreibung des kontinuierlichen Prozesses geeignet ist.

4.4.1 Einführung und Stoffbilanzen

Die Beschreibung des Enzym-Membran-Reaktors und der verwendeten Anlage findet sich in Kap. 3.5, in dem die kontinuierliche Produktion von Neu5Ac ausgehend von ManNAc behandelt wird.

Für die Epimerase allein wurden keine Modellrechnungen zur Ermittlung der optimalen Prozeßbedingungen durchgeführt. Sie dienten lediglich zur Überprüfung, ob mit dem verwendeten kinetischen Modell auch kontinuierliche Prozesse beschreibbar sind oder ob zusätzliche Einflüsse auf die Enzymaktivität berücksichtigt werden müssen. Gleichung 4.4.1-1 und 4.4.1-2 geben die Stoffbilanzen für die Reaktanden ManNAc und GlcNAc an. Genau wie bei der Aldolase wird die im Reaktionsterm enthaltene Geschwindigkeitsgleichung (vgl. Gl. 4.3.2-2) so modifiziert, daß das Produkt aus der Enzymkonzentration und der massenspezifischen Aktivität verwendet wird. So kann für den stationären Zustand das Produkt $E \cdot \tau$ als Parameter verwendet werden. Zwischen α - und β -Anomeren wird nicht unterschieden.

$$\frac{d[\text{GlcNAc}]}{dt} = \frac{[\text{GlcNAc}]_0 - [\text{GlcNAc}]}{\tau} - [E]_{EP1} * A_2 \quad (4.4.1-1)$$

$$\frac{d[\text{ManNAc}]}{dt} = \frac{[\text{ManNAc}]_0 - [\text{ManNAc}]}{\tau} + [E]_{EP1} * A_2 \quad (4.4.1-2)$$

$$v_2 = [E]_{EP1} * A_2 \quad (4.4.1-3)$$

mit:	Index 0	Zulaufkonzentration der Komponente
	τ s	Verweilzeit
	$[E]_{EP1}$ g/L	Enzymkonzentration (Epimerase)
	A_2 kat/g	massenspezifische Aktivität der ManNAc-Synthese
	v_2 kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Synthese (vgl. Gl. 4.3.2-2)

Durch Nullsetzen des Konvektionsterms sind die Stoffbilanzen auch für den Satzreaktor verwendbar. Das Differentialgleichungssystem wurde sowohl für den Satzreaktor als auch für den kontinuierlich betriebenen Reaktor mit Hilfe des Runge-Kutta-Verfahrens gelöst (Zurmühl, 1965; Joks, 1987).

4.4.2 Durchführung und Ergebnisse der kontinuierlichen Versuche

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog den in Kap. 3.5.3 beschriebenen Versuchen zum Einsatz der Aldolase. Alle Experimente wurden im Polypropylen-EMR mit einem Volumen von 14,3 ml durchgeführt. Puffersubstanzen wurden auch hier nicht verwendet.

Zunächst wurde der Einfluß verschiedener ATP- und Mg^{2+} -Konzentrationen auf die Aktivität der Aldolase untersucht. In Abb. 4.4.2-1 ist der Umsatz-Zeit-Verlauf bei Verwendung verschiedener Substrat- und Effekorkonzentrationen dargestellt. Man erkennt, daß selbst bei 0,5 mM ATP und Mg^{2+} kein Umsatzrückgang zu verzeichnen ist, der auf eine Abnahme der Enzymaktivität hindeuten würde. Dieser Wert deckt sich mit dem Ergebnis aus den kinetischen Untersuchungen zur Epimerase. Trotzdem wird bei allen weiteren Experimenten eine Effekorkonzentration von 2 bzw. 5 mM verwendet. Die Ausspülung der in der Enzympräparation enthaltenen Stabilisatoren (Gluconat, EDTA; Toyobo 1989) im kontinuierlichen Prozeß wirkt sich nicht nachteilig aus. Die unten diskutierte geringere Enzymaktivität wird dadurch nicht verursacht, wie sich bei kinetischen Untersuchungen mit dem entsalzten Enzym zeigte.

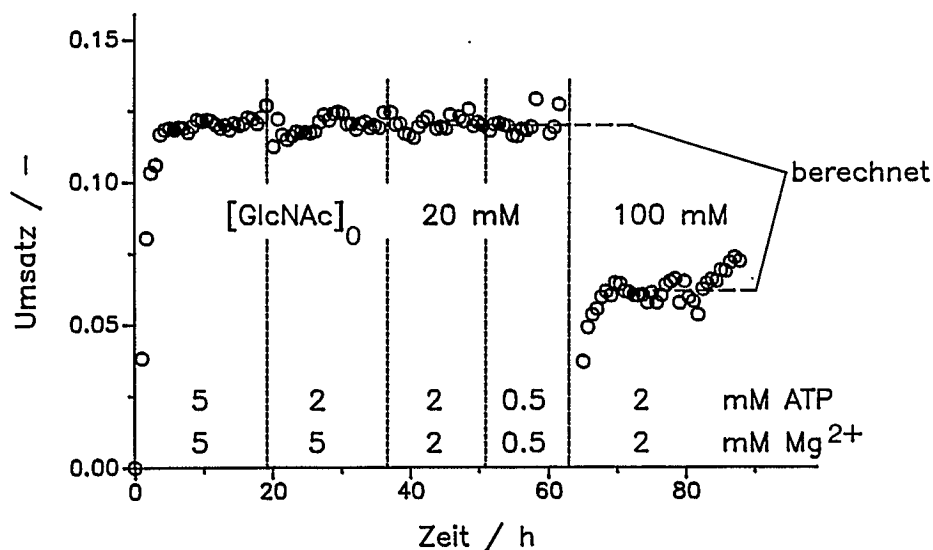


Abb. 4.4.2-1: Einfluß der ATP- und Mg^{2+} -Konzentration auf den Umsatz im kontinuierlichen Prozeß; Berechnungen nur für den stationären Zustand unter Annahme von 80% Restaktivität; der mögliche Gleichgewichtsumsatz beträgt 17%
Bedingungen: $\tau = 3600$ s (1 h), 2,69 g/L Epimerase;

Die Modellrechnungen stimmen sehr gut mit den experimentellen Werten überein, wenn man für die Rechnungen eine effektive Enzymkonzentration von 80% des eingewogenen Wertes annimmt (vgl. auch Abb. 4.4.2-2). Die beobachtete geringere Enzymaktivität im EMR kann z. B. durch Adsorption des Enzyms auf der verwendeten Ultrafiltrationsmembran verursacht werden. Ihr Ausmaß kann nur als empirisch abgeschätzter Faktor berücksichtigt werden. Ein solches Vorgehen er-

scheint statthaft, da die gute Beschreibung der Satzreaktorversuche bei gleichen Bedingungen die Güte des verwendeten Modells beweist.

Abbildung 4.4.2-2 zeigt den Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Betriebspunkten der Epimerisierung von GlcNAc für eine Substratkonzentration von 100 mM. Auch hier findet man unter Annahme einer effektiven Enzymkonzentration von 80% eine sehr gute Übereinstimmung von experimentellen und berechneten Betriebspunkten.

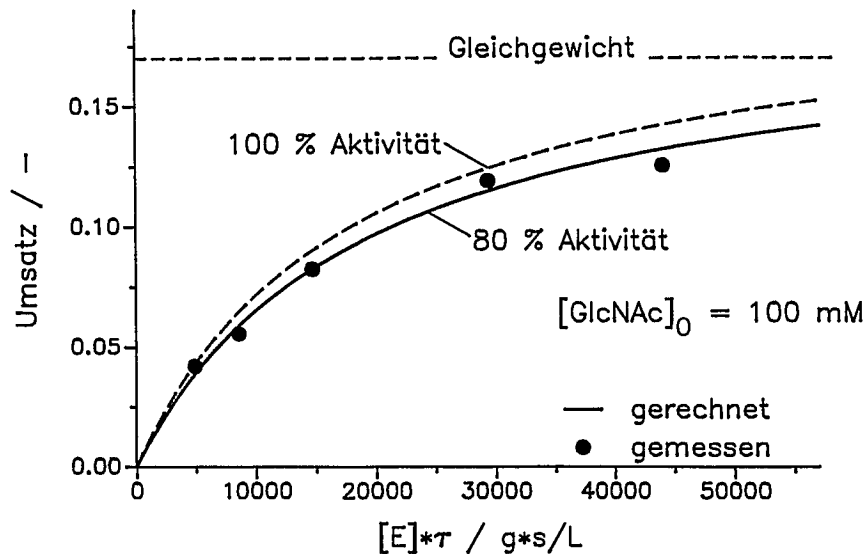


Abb. 4.4.2-2: Vergleich von experimentellen und berechneten Betriebspunkten der Epimerisierung von GlcNAc
Bedingungen: 4,07 g/L Epimerase, τ variabel; 2 mM ATP, 2 mM Mg^{2+}

Aus Abb. 4.4.2-2 ist ersichtlich, daß der Umsatz nur langsam mit steigenden $E \cdot \tau$ -Werten zunimmt. Dies ist auf die mit steigendem Umsatz stark abfallende Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen (vgl. Abb. 4.3.3-13). In Abb. 4.4.2-3 sind neben dem Reaktionsterm die Konvektionsterme für unterschiedliche $E \cdot \tau$ -Werte aufgetragen. Aus dem Schnittpunkt der beiden Kurven ergibt sich der Betriebspunkt des Reaktors. Erst bei $E \cdot \tau = 144400 \text{ g*s/L}$ wird ein Umsatz von 17,5% erreicht; dies entspricht z. B. 13 g/L Epimerase bei einer Verweilzeit von 3 h. Die mit dieser graphischen Methode und die aus der Lösung des Differentialgleichungssystem erhaltenen Betriebspunkte stimmen erwartungsgemäß überein.

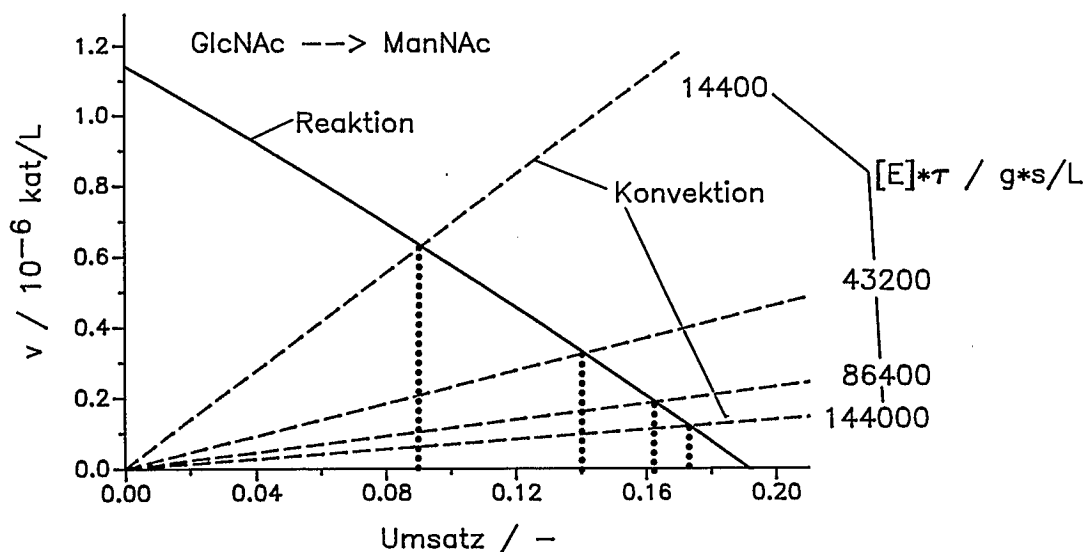


Abb. 4.4.2-3: Reaktions- und Konvektionsterm für die Epimerisierung von GlcNAc; $[\text{GlcNAc}]_0 = 100 \text{ mM}$

Zusammenfassung

- Die *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase kann mit guter Stabilität im Enzym-Membran-Reaktor eingesetzt werden.
- Berechnete und experimentelle Betriebspunkte stimmen sehr gut miteinander überein, wenn eine Restaktivität von 80% zugrunde gelegt wird. Eine derartige Verringerung der tatsächlich eingesetzten Enzymaktivität kann durch die Adsorption eines Teils der Enzymmenge an der Ultrafiltrationsmembran verursacht werden.
- Die aus kinetischen Untersuchungen abgeleiteten minimalen Effektorkonzentrationen konnten im kontinuierlichen Prozeß bestätigt werden.

4.5 Zusammenfassung

- Die Kinetik der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase wurde vollständig untersucht. Bezüglich der Reaktanden GlcNAc und ManNAc genügt das einfachste denkbare Modell zur Beschreibung einer reversiblen Reaktion, um die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften des Reaktionssystem korrekt zu beschreiben.
- Über den Reaktionsmechanismus läßt das Modell keine Aussage zu.
- Der ATP- und Mg^{2+} -Einfluß wurde soweit untersucht, daß Limitierungen oder Inhibierungen ausgeschlossen werden können. ATP ist als allosterischer Aktivator unbedingt erforderlich, während Mg^{2+} -Ionen nicht unbedingt notwendig sind.
- An Polyethylenglycol 20000 gebundenes ATP wirkt ebenfalls als Aktivator, allerdings schlechter als natives ATP.
- Die Epimerase zeigt ein ähnliches pH- und Temperaturprofil der Aktivität wie die Neu5Ac-Aldolase. Die Desaktivierungskonstante liegt ebenfalls in gleicher Größenordnung.
- Die *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase kann mit guter Stabilität im Enzym-Membran-Reaktor eingesetzt werden. Betriebszustände des EMRs lassen sich mit dem verwendeten Modell mit guter Genauigkeit beschreiben.

5 Einsatz des gekoppelten Enzymsystems zur Synthese von Neu5Ac aus GlcNAc und Brenztraubensäure

5.1 Einführung

Der Einsatz der Neu5Ac-Aldolase zusammen mit der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase ergibt einen besonders eleganten und zweckmäßigen Weg zur enzymkatalysierten Synthese von Neu5Ac. Das Reaktionsschema für dieses gekoppelte Enzymsystem ist in Abb. 5.1-1 dargestellt. Das durch die Epimerase gebildete ManNAc wird ohne Isolierung direkt weiter zu Neu5Ac umgesetzt.

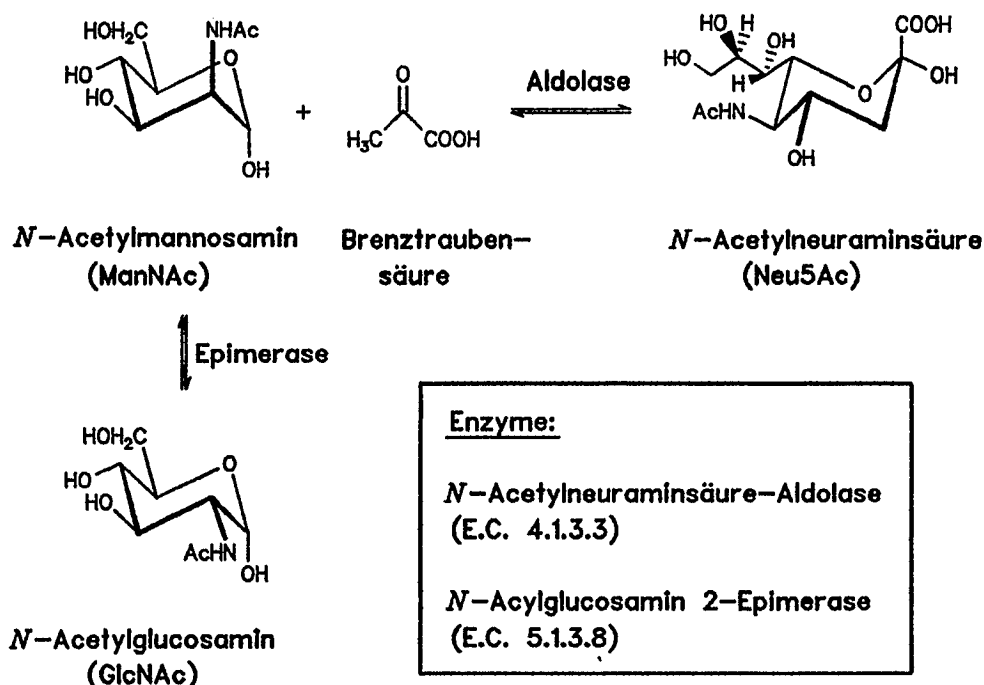


Abb. 5.1-1: Reaktionsschema zur enzymkatalysierten Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc

Gekoppelte Enzymsysteme können vorteilhaft im Enzym-Membran-Reaktor eingesetzt werden, da bei homogener Katalyse keine Stofftransportlimitierungen auftreten können. Bei unterschiedlichen Enzymstabilitäten kann durch Nachdosierung verschiedener Enzymmengen ein konstanter Umsatz aufrechterhalten werden. Dies ist bei auf Trägern koimmobilisierten Enzymen nicht möglich.

Um zwei oder mehrere Enzyme zusammen im Enzym-Membran-Reaktor einsetzen zu können, muß bezüglich der Reaktionsbedingungen ein möglichst günstiger Kompromiß gefunden werden. Dabei müssen neben dem pH- und Temperatureinfluß auch mögliche Querinhibierungen oder -aktivierungen durch die Substrate und Produkte berücksichtigt werden.

Die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften der beiden Einzelreaktionen (Neu5Ac-Synthese und Epimerisierung) sind in den Kapiteln 3 und 4 behandelt worden. Für den gemeinsamen Einsatz der beiden Enzyme ist dabei von Bedeutung:

- Beide Enzyme besitzen ein breites pH-Optimum zwischen pH 6 und 8 (vgl. Abb. 3.3.3-1 und 4.3.3-1).
- Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität ist für beide Enzyme ähnlich (vgl. Abb. 3.3.3-2 und 4.3.3-2).
- Der bei der Neu5Ac gefundene Temperatureinfluß auf den Gleichgewichtsumsatz gilt auch für das gekoppelte System. Die für den alleinigen Einsatz der Aldolase gewählten 25 °C wurden als günstiger Kompromiß für das gekoppelte System übernommen (vgl. Kap. 5.2). Bei dieser Temperatur zeigen beide Enzyme eine ausreichende Stabilität (vgl. Kap. 3.3.4 und 4.3.4).
- Weder die Epimerase noch die Aldolase setzen die Substrate des jeweils anderen Enzyms zu unerwünschten detektierbaren Nebenprodukten um (Comb et al., 1958; Augé et al., 1984; Kim et al., 1988; eigene Messungen).

Weitere Punkte, die für den Einsatz des gekoppelten Systems von Bedeutung sind, werden in diesem Kapitel beschrieben:

- Gleichgewichtslage der Gesamtreaktion.
- Kinetische Untersuchungen zum Einfluß von GlcNAc, ATP und Mg^{2+} auf die Aldolase sowie von Pyr und Neu5Ac auf die Epimerase.
- Modellrechnungen zur Ermittlung günstiger Prozeßbedingungen und experimentelle Überprüfung.

5.2 Gleichgewichtslage der Gesamtreaktion

Die Gleichgewichtskonstante K_{eq}^C für die Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc ist durch Gleichung 5.2-1 definiert. Durch einfaches Einsetzen von Gl. 4.2-1 in Gl. 3.2-1 läßt sich zeigen, daß sich die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion multiplikativ aus denen der Einzelreaktionen zusammensetzt.

$$K_{eq}^C = \frac{[Neu5Ac]}{[GlcNAc] * [Pyr]} = K_{eq}^A * K_{eq}^B \quad (5.2-1)$$

mit:	K_{eq}^C	L/mol	Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion
	K_{eq}^A	L/mol	Gleichgewichtskonstante der Neu5Ac-Synthese
	K_{eq}^B	-	Gleichgewichtskonstante der Epimerisierung

Aus den experimentell bestimmten Gleichgewichtskonstanten der Einzelreaktionen ergibt sich für die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion:

$$K_{eq}^C = 5,90 \text{ L/mol (25 °C; pH 7,5).}$$

Verwendet man für K_{eq}^B an Stelle des experimentell bestimmten Wertes den mit Hilfe der Haldane-Beziehung aus den kinetischen Konstanten berechneten, so erhält man für K_{eq}^C einen Wert von 6,96 L/mol. Dieser Wert ergibt sich auch

aus den Gleichgewichtskonzentrationen, die mit Hilfe der unten beschriebenen Modellrechnungen ermittelt werden. Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, daß das verwendete Gesamtmodell das System vollständig beschreibt.

Die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten der Neu5Ac-Synthese führt dazu, daß auch die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion von der Temperatur beeinflusst wird. Weitere Untersuchungen hierzu wurden nicht durchgeführt, da bereits bei der Festlegung der Reaktionsbedingungen der Neu5Ac-Synthese 25 °C als günstiger Kompromiß zwischen möglichem Gleichgewichtsumsatz und der Enzymaktivität ermittelt wurde. Für die Epimerase sind 25 °C aus Stabilitätsgründen günstig.

In Abbildung 5.2-1 ist der erzielbare Gleichgewichtsumsatz als Funktion der Konzentration des Zweitsubstrates, das im Überschuß eingesetzt wird (hier GlcNAc), angegeben, wobei als Parameter die Pyr-Konzentration variiert wird. Analog könnte auch Pyr im Überschuß eingesetzt werden, ohne daß sich der thermodynamisch mögliche Gleichgewichtsumsatz ändert. Mit steigendem Konzentrationsniveau steigt der mögliche Gleichgewichtsumsatz bei konstantem GlcNAc/Pyr-Verhältnis an. Bei einer Konzentration von 500 mM Pyr sind bei zweifachem GlcNAc-Überschuß etwa 80% Umsatz möglich. Aus den unten beschriebenen Modellrechnungen ergibt sich, daß für den kontinuierlichen Prozeß Pyr-Konzentrationen von 100 bis 200 mM bei einem GlcNAc/Pyr-Verhältnis von 1 bis 3 günstig sind.

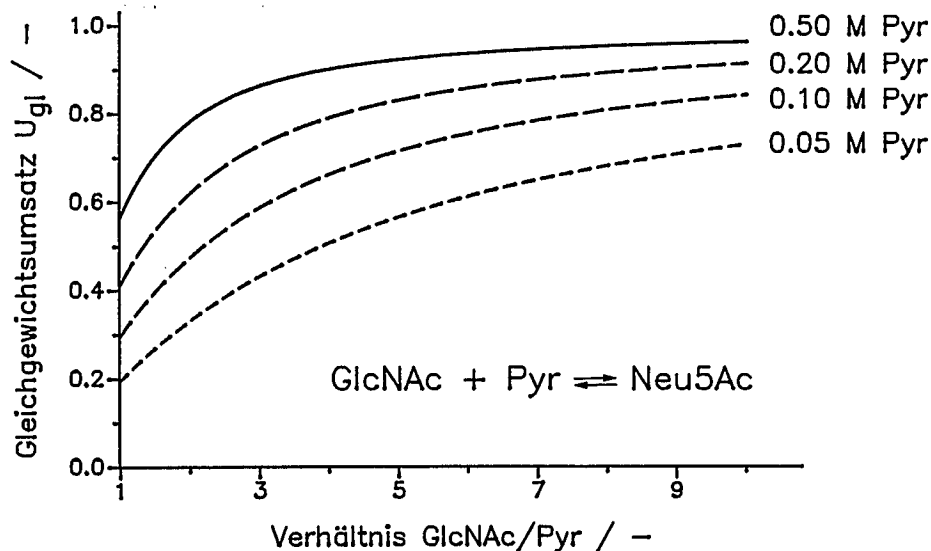


Abb. 5.2-1: Gleichgewichtsumsatz als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratkonzentration
Bedingungen: pH 7,5; 25 °C; $K_{eq}^c = 5,90 \text{ L/mol}$

5.3 Kinetische Untersuchungen

Durch Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde der Einfluß von Mg^{2+} , ATP und GlcNAc auf die Aldolase und der Einfluß von Pyr und Neu5Ac auf die Epimerase untersucht.

5.3.1 Inhibierung der Neu5Ac-Aldolase durch Mg^{2+} , ATP und GlcNAc

Stellvertretend ist in Abb. 5.3.1-1 der Einfluß der ATP-Konzentration auf die Aktivität der Spaltung von Neu5Ac dargestellt. Die Inhibierung der Aktivität der Neu5Ac-Aldolase durch Mg^{2+} und ATP bei Konzentrationen von 5 mM, wie sie maximal bei den kontinuierlichen Experimenten verwendet werden, kann vernachlässigt werden.

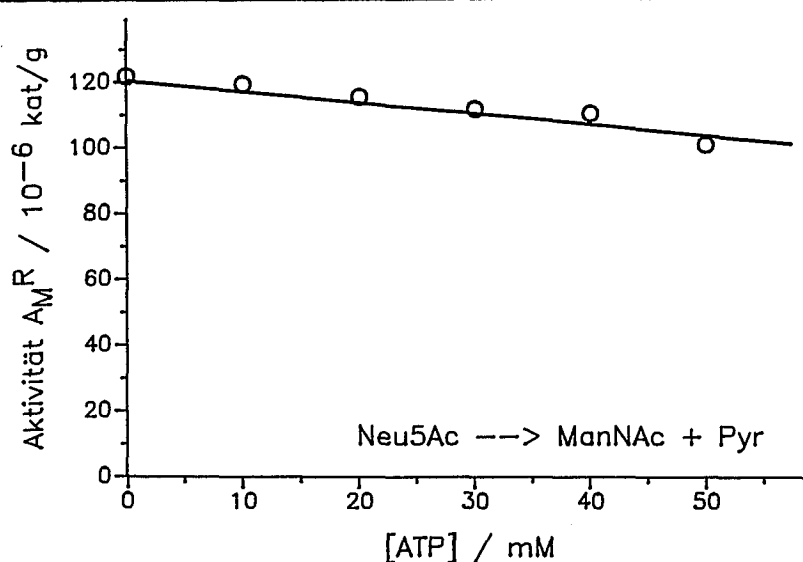


Abb. 5.3.1-1: Inhibierung der Spaltung von Neu5Ac durch ATP
Standardbedingungen; 56,7 mM Neu5Ac; 30 μ g/mL Aldolase

In Abbildung 5.3.1-2 ist der Einfluß des GlcNAc auf die Aktivität der Neu5Ac-Aldolase sowohl für die Synthese als auch für die Spaltung von Neu5Ac dargestellt. Der Aktivitätsrückgang läßt sich für beide Reaktionsrichtungen mit Hilfe von Gl. 5.3.1-1 beschreiben, die eine Erweiterung von Gleichung 3.3.3-1 zur Berücksichtigung der Aktivitätsabnahme mit steigender Substratkonzentration darstellt (Viskositätseinfluß). Die in Abb. 5.3.1-2 dargestellten Kurven wurde mit Hilfe der in Kap. 3.3.3 ermittelten Konstanten $K_v = 1556$ mM berechnet! Damit kann die Inhibierung der Spalt- und Synthesereaktion durch hohe Substrat- oder GlcNAc-Konzentrationen formal als eine nicht-kompetitive Inhibierung mit nur einer Konstanten beschrieben werden!

$$A_{\text{rest}} = 100 * \frac{1}{1 + ([\text{ManNAc}]_0 + [\text{Pyr}]_0 + [\text{Neu5Ac}]_0 + [\text{GlcNAc}]_0) / K_v} \quad (5.3.1-1)$$

mit: A_{rest} % Restaktivität
 K_v mol/L "Inhibierungskonstante" zur Beschreibung des
Konzentrationsinflusses

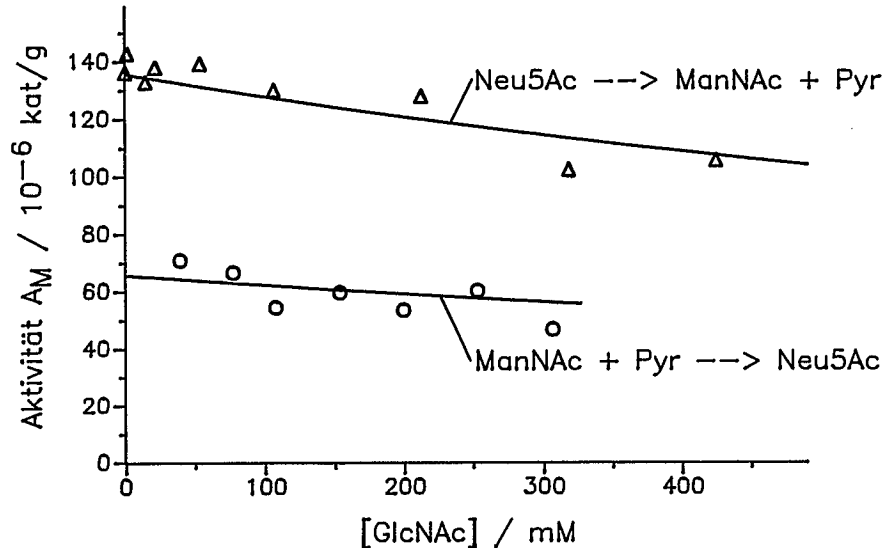


Abb. 5.3.1-2: Inhibierung der Neu5Ac-Aldolase durch GlcNAc; Standardbedingungen; Spaltung 71,7 mM Neu5Ac, 29 µg/mL Aldolase; Synthese 210 mM ManNAc, 25 mM Pyr, 27 µg/mL Aldolase

5.3.2 Inhibierung der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase durch Pyr und Neu5Ac

Die Inhibierung der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase durch Pyr und Neu5Ac läßt sich als kompetitive Inhibierung durch zusätzliche Terme $[I]/K_i^I$ im Nenner von Gl. 5.3.2-1 beschreiben, die aus Gl. 4.3.2-2 erhalten wird.

$$v_3 = \frac{d[B]}{dt} = \frac{[E]_{\text{Epi}} * \left(\frac{A_{\text{max}}^C * [C]}{K_m^C} - \frac{A_{\text{max}}^B * [B]}{K_m^B} \right)}{1 + \frac{[C]}{K_m^C} + \frac{[B]}{K_m^B} + \frac{[A]}{K_i^{AS}} + \frac{[P]}{K_i^{PS}}} \quad (5.3.2-1)$$

mit: v_3 kat/L Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Synthese unter Berücksichtigung der Pyr- und Neu5Ac-Inhibierung
 K_i^{AS} mol/L Inhibierungskonstante der Komponente A = Pyr;
 K_i^{PS} mol/L Inhibierungskonstante der Komponente P = Neu5Ac;
das "s"-Zeichen dient zur Unterscheidung von K_i^I aus der Kinetik der Aldolase

In den folgenden Abbildungen ist die Inhibierung der Epimerase durch Pyr und Neu5Ac bei Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit dargestellt:

- Abbildung 5.3.2-1 zeigt den Einfluß von Pyr und Neu5Ac allein bei der Epimerisierung von ManNAc. Bei der Verwendung von GlcNAc als Substrat ergeben sich entsprechende Kurvenverläufe, die hier nicht dargestellt sind.
- Abbildung 5.3.2-2 zeigt die Inhibierung der Epimerase mit GlcNAc als Substrat durch Pyr bei gleichzeitiger Anwesenheit von Neu5Ac. Es ergibt sich eindeutig ein additiver Effekt der beiden Inhibierungen.

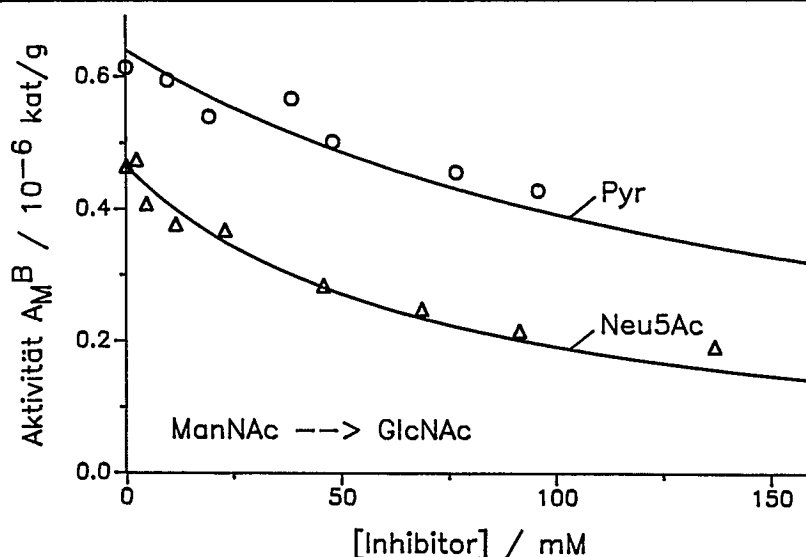


Abb. 5.3.2-1: Inhibierung der Epimerisierung von ManNAc durch Pyr und Neu5Ac; Standardbedingungen; Pyr-Einfluß 100 mM ManNAc; Neu5Ac-Einfluß 45 mM ManNAc; beide 0,24 mg/mL Epimerase

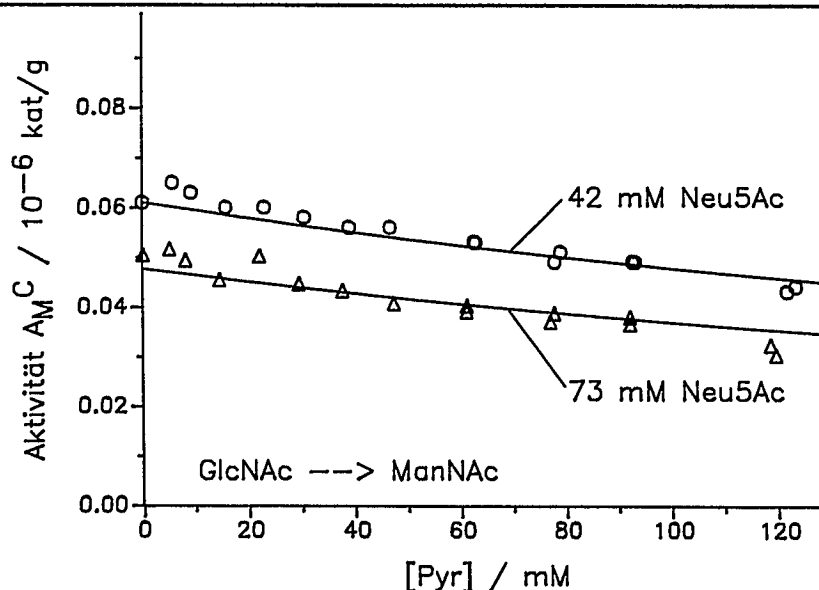


Abb. 5.3.2-2: Inhibierung der Epimerisierung von GlcNAc durch Pyr und Neu5Ac; Standardbedingungen; 90 mM GlcNAc, 0,53 mg/mL Epimerase

Die Werte für K_1^{AS} und K_1^{PS} werden durch Anpassung an alle Konzentrations-Aktivitäts-Kurven gleichzeitig mittels nicht-linearer Regression ermittelt (Programm Opti, Giesecke 1987):

$$K_1^{AS} = 41,5 \text{ mmol/L}$$

$$K_1^{PS} = 30,6 \text{ mmol/L}$$

Obwohl die Werte in der gleichen Größenordnung wie der K_m -Wert für ManNAc (35,2 mM) liegen, sind sie für die Modellrechnungen zum gekoppelten System nur von untergeordneter Bedeutung, wie in Kap. 5.4.3 gezeigt wird.

5.4 Kontinuierliche Produktion von Neu5Ac ausgehend von GlcNAc

In diesem Kapitel wird der Einsatz des gekoppelten Enzymsystems im Enzym-Membran-Reaktor behandelt. Bei den beschriebenen Experimenten und Modellrechnungen stehen folgende Aspekte im Mittelpunkt:

- Nachweis der Eignung des gekoppelten Enzymsystems zur kontinuierlichen Synthese von Neu5Ac im Enzym-Membran-Reaktor.
- Modellrechnungen zur Ermittlung günstiger Prozeßbedingungen und experimenteller Beweis.
- Diskussion des gekoppelten Enzymsystems unter reaktionstechnischen Aspekten.

5.4.1 Einführung und Stoffbilanzen

Die Beschreibung des Enzym-Membran-Reaktors und der verwendeten Anlage findet sich in Kap. 3.5, in dem die kontinuierliche Produktion von Neu5Ac ausgehend von ManNAc behandelt wird.

Die Stoffbilanzen für die vier Reaktanden GlcNAc, ManNAc, Pyr und Neu5Ac sind in den Gleichungen 5.4.1-1 bis 5.4.1-4 angegeben. Sie entsprechen im wesentlichen den Stoffbilanzen, die bei den Modellrechnungen zu den isolierten Enzymen eingeführt wurden. Folgende Veränderungen wurden vorgenommen:

- Für ManNAc muß die Konzentrationsänderung durch die Epimerisierung und die Neu5Ac-Synthese berücksichtigt werden.
- Die Inhibierung der Epimerase durch Pyr und Neu5Ac wird nicht berücksichtigt. Bei Rechnungen mit Berücksichtigung der Inhibierung lieferte das Modell deutlich niedrigere Umsätze als experimentell gefunden. Möglicherweise vermitteln die Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ein falsches Bild, da diese Inhibierungen bei gleichzeitig anwesenden Substraten und Produkten anscheinend nicht auftreten.
- Die Aktivitätsabnahme der Aldolase mit zunehmenden Substratkonzentrationen wird durch Gl. 5.4.1-5 im Modell berücksichtigt. In erster Näherung werden wie bei der Behandlung der Aldolase allein die Substratzulaufkonzentrationen verwendet. Die Änderung der Gesamtkonzentration durch die Reaktion wird vernachlässigt.

- Wie bei den einzelnen Enzymen, wird an Stelle der Reaktionsgeschwindigkeit v das Produkt aus Enzymkonzentration und massenspezifischer Aktivität angegeben, wobei gilt: $v = [E] \cdot A$.
- Die Geschwindigkeitsgleichungen mit Erklärung der Konstanten finden sich in den Kapiteln 3.3 und 4.3 unter den Nummern 3.3.2-16 und 4.3.2-2.

$$\frac{d[\text{GlcNAc}]}{dt} = \frac{[\text{GlcNAc}]_0 - [\text{GlcNAc}]}{\tau} - [E]_{EP1} \cdot A_2 \quad (5.4.1-1)$$

$$\frac{d[\text{ManNAc}]}{dt} = \frac{[\text{ManNAc}]_0 - [\text{ManNAc}]}{\tau} + [E]_{EP1} \cdot A_2 - [E]_{A1d} \cdot A_1 \cdot F \quad (5.4.1-2)$$

$$\frac{d[\text{Pyr}]}{dt} = \frac{[\text{Pyr}]_0 - [\text{Pyr}]}{\tau} - [E]_{A1d} \cdot A_1 \cdot F \quad (5.4.1-3)$$

$$\frac{d[\text{Neu5Ac}]}{dt} = \frac{[\text{Neu5Ac}]_0 - [\text{Neu5Ac}]}{\tau} + [E]_{A1d} \cdot A_1 \cdot F \quad (5.4.1-4)$$

$$F = \frac{1}{1 + ([\text{GlcNAc}]_0 + [\text{Pyr}]_0)/K_v} \quad (5.4.1-5)$$

mit:	Index 0	Zulaufkonzentration der Komponente
	τ	s Verweilzeit
	$[E]$	g/L Enzymkonzentration
	A	kat/g massenspezifische Aktivität
	F	- Faktor zur Beschreibung der Aktivitätsabnahme der Aldolase als Funktion der Substratkonzentration

Das Differentialgleichungssystem wurde mit Hilfe des Runge-Kutta-Verfahrens gelöst (Zurmühl, 1965; Joks, 1987).

Die Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc ist eine Folgereaktion, bei der nur ein Teil des gebildeten ManNAc zu Neu5Ac weiterreagiert. Neben dem Substratumsatz müssen daher die Selektivität und die Produktausbeute betrachtet werden, die durch Gl. 5.4.1-6 bis 5.4.1-9 definiert sind. Die Selektivität beschreibt den Anteil des GlcNAc, der zu Neu5Ac umgesetzt wird. Die Produktausbeute, die nur für Neu5Ac als dem eigentlichen Zielprodukt angegeben wird, ist für Pyr gleich dem Umsatz, da die Selektivität gleich eins ist. Umsatz bzw. Produktausbeute werden in der Regel für das im Unterschub eingesetzte Substrat angegeben.

$$U_{\text{Pyr}} = \frac{[\text{Neu5Ac}]}{[\text{Pyr}]_0} \quad U_{\text{GlcNAc}} = \frac{[\text{Neu5Ac}] + [\text{ManNAc}]}{[\text{GlcNAc}]_0} \quad (5.4.1-6)$$

$$S_{\text{Pyr}} = 1 \quad S_{\text{GlcNAc}} = \frac{[\text{Neu5Ac}]}{[\text{Neu5Ac}] + [\text{ManNAc}]} \quad (5.4.1-7)$$

$$Y_{\text{Pyr}} = \sigma_{\text{Pyr}} * U_{\text{Pyr}} = U_{\text{Pyr}} \quad (5.4.1-8)$$

$$Y_{\text{GlcNAc}} = \sigma_{\text{GlcNAc}} * U_{\text{GlcNAc}} = \frac{[\text{Neu5Ac}]}{[\text{GlcNAc}]_0} \quad (5.4.1-9)$$

mit:	$U_{\text{Pyr,GlcNAc}}$	-	Umsatz für Pyr, GlcNAc
	$\sigma_{\text{Pyr,GlcNAc}}$	-	Selektivität für Pyr, GlcNAc
	$Y_{\text{Pyr,GlcNAc}}$	-	Ausbeute für Pyr, GlcNAc

5.4.2 Modellrechnungen zur Ermittlung günstiger Prozeßbedingungen

Mit Hilfe von Modellrechnungen soll versucht werden, kinetische Eigenschaften des Gesamtsystems zu verdeutlichen. Damit kann eine günstige Kombination der fünf Parameter, die den Betriebszustand des Reaktors beeinflussen, ermittelt werden:

- Substratkonzentrationen GlcNAc und Pyr.
- Enzymkonzentrationen Epimerase und Aldolase.
- Verweilzeit τ .

Die Güte des verwendeten Modells wurde an Hand der in Kap. 5.4.3 beschriebenen Experimente überprüft. Auf Grund der dort gefundenen guten Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Werten und den Untersuchungsergebnissen zu den Einzelenzymen scheint das Modell geeignet, um Betriebszustände des Enzym-Membran-Reaktors vorauszuberechnen. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die experimentelle Überprüfung nur für einen begrenzten Konzentrationsbereich erfolgte. Extrapolationen über diesen Bereich hinaus erscheinen aber zulässig, da bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der beiden Enzyme ein größerer Konzentrationsbereich einbezogen wurde.

Im folgenden sind die Ergebnisse der Modellrechnungen für ausgewählte Parameterkombinationen (Enzym- und Substratkonzentrationen, Verweilzeit) dargestellt, wobei nacheinander der Einfluß der Substratkonzentrationen, der Enzymkonzentrationen und der Verweilzeit behandelt wird.

Einfluß der Substratkonzentrationen

In Abb. 5.4.2-1 ist die im kontinuierlichen Prozeß erreichbare Neu5Ac-Ausbeute als Funktion des Überschusses des zweiten Substrates aufgetragen. Als weiterer Parameter dient die Konzentration des Erstsubstrates. Die Ausbeute ist jeweils auf das im Unterschuß eingesetzte Substrat bezogen. Die Begründung für die gewählten Enzymkonzentrationen und die Verweilzeit ergibt sich aus den unten gezeigten Abbildungen 5.4.2-4 und 5.4.2-6.

Einige Aspekte von Abb. 5.4.2-1 sollen kurz diskutiert werden:

- Mit zunehmender Konzentration des Erstsubstrats und mit steigendem Überschuß des Zweitsubstrats steigt die erzielbare Neu5Ac-Ausbeute an. In der Praxis ist die Verwendung eines GlcNAc-Überschusses vorteilhaft, da dadurch der Pyr-Gehalt der Produktlösung gering gehalten werden kann.
- Der flache Verlauf der Kurve für $[\text{GlcNAc}]_0 = 200 \text{ mM}$ und $[\text{Aldolase}] = 4 \text{ g/L}$ liegt an der geringen stationären ManNAc-Konzentration (ca. 10 mM), die weit unter dem K_m -Wert der Aldolase liegt. Durch Erhöhung der Aldolase-Konzentration wird die Geschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese insgesamt erhöht, so daß eine höhere Ausbeute erzielt wird.
- Bei GlcNAc-Überschuß ist die verfügbare Aktivität der Epimerase limitierend, so daß eine höhere Aldolase-Konzentration nur zu einer geringen Steigerung der Ausbeute führt.

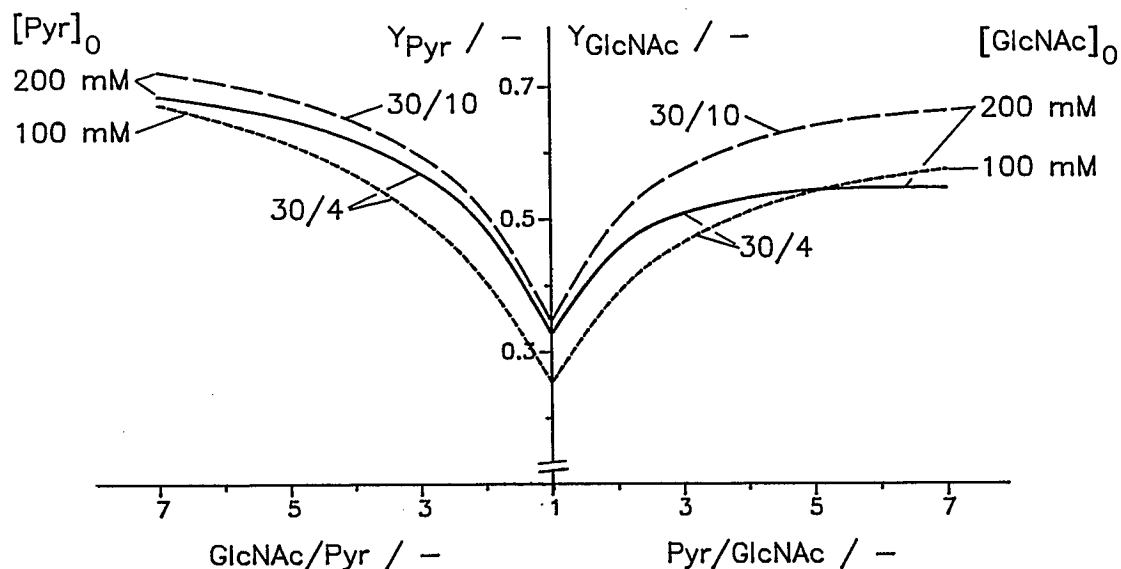


Abb. 5.4.2-1: Neu5Ac-Ausbeute als Funktion des Substratverhältnisses und der Substratzulaufkonzentration sowie der Enzymkonzentration im kontinuierlichen Prozeß ausgehend von GlcNAc;
linke Seite: GlcNAc-Überschuß, rechte Seite: Pyr-Überschuß;
Bedingungen: $[\text{Epimerase}] = 30 \text{ g/L}$; $[\text{Aldolase}] = 4 \text{ und } 10 \text{ g/L}$;
 $\tau = 10800 \text{ s}$

- Höhere Substratkonzentrationen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellt sind, führen bei den gewählten Enzymkonzentrationen zu geringeren Ausbeuten. Als limitierender Faktor erweist sich die geringe massenspezifische Aktivität der Epimerase, deren Konzentration nicht beliebig erhöht werden kann. Bei höheren Konzentrationen besteht die Gefahr, daß nur ein Teil des Proteins in katalytisch aktiver Form vorliegt. Außerdem führt die zunehmende Viskosität der Lösung zu einem Druckanstieg im EMR. Ein geringerer Umsatz bzw. eine geringere Ausbeute bedeutet auch, daß das Verhältnis von nicht umgesetztem Pyr zu gebildeter Neu5Ac größer wird, was sich ungünstig auf die Produktisolierung auswirkt (vgl. auch Diskussion zu Abb. 3.5.2-2).

Einfluß der Enzymkonzentrationen

Der Einfluß der Enzymkonzentrationen auf die erzielbare Produktausbeute wird nur für Substratkonzentrationen von 200 mM GlcNAc und 200 mM Pyr dargestellt. Für andere Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse ergeben sich ähnliche Kurven. Bei äquimolaren Substratkonzentrationen sind die Produktausbeuten Y_{Pyr} und Y_{GlcNAc} sowie der Umsatz U_{Pyr} identisch, was die Darstellung vereinfacht. Der erzielbare Gleichgewichtsumsatz bei diesen Konzentrationen liegt bei $Y_{\text{Pyr}} = Y_{\text{GlcNAc}} = U_{\text{Pyr}} = 0,41$.

In Abbildung 5.4.2-2 ist die Neu5Ac-Ausbeute als Funktion der Epimerase- und Aldolasekonzentration dargestellt. Erwartungsgemäß nimmt mit steigenden Enzymkonzentrationen die Menge an gebildeter Neu5Ac zu.

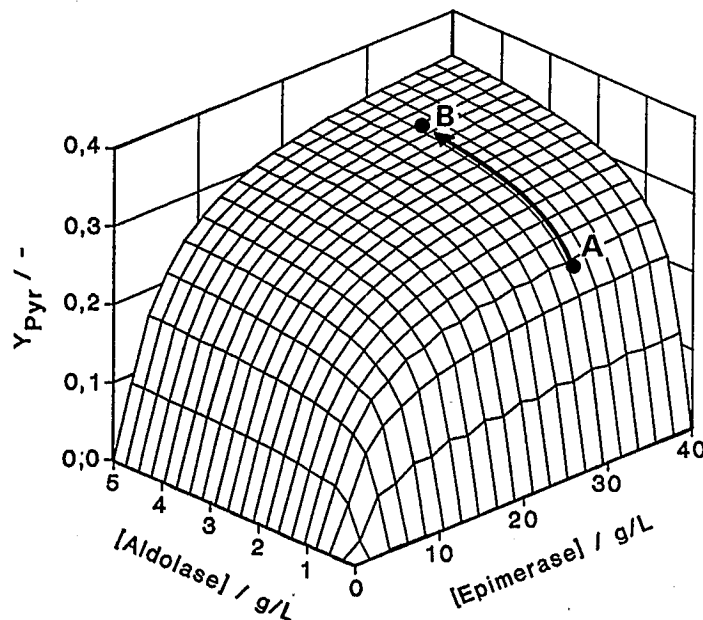


Abb. 5.4.2-2: Neu5Ac-Ausbeute (= Pyr-Umsatz) als Funktion der Epimerase- und Aldolasekonzentration; zur Bedeutung von A und B vgl. Abb. 5.4.2-4; Bedingungen: $[\text{GlcNAc}]_0 = [\text{Pyr}]_0 = 200 \text{ mM}$ Pyr, $\tau = 10800 \text{ s}$

Obwohl die Epimerase im Vergleich zur Aldolase eine geringere Aktivität aufweist, sind bei relativ geringen Konzentrationen dieses Enzyms hohe Produktausbeuten erzielbar. Deutlicher können diese Zusammenhänge dargestellt werden, wenn die Ausbeute bzw. der Umsatz als Funktion des Aktivitätsmolenbruchs aufgetragen wird. Der Aktivitätsmolenbruch X_E der Epimerase ist definiert als:

$$X_E = \frac{[E]_{Epi} \cdot A_{max}^C}{[E]_{Ald} \cdot A_{max}^H + [E]_{Epi} \cdot A_{max}^C} \quad (5.4.2-1)$$

mit: X_E – Aktivitätsmolenbruch der Epimerase
 A_{max}^C kat/g maximale massenspezifische Aktivität der Epimerisierung von GlcNAc
 A_{max}^H kat/g maximale massenspezifische Aktivität der Neu5Ac-Synthese

Der Aktivitätsmolenbruch als Abszisse entspricht den Geraden in der durch die Konzentrations-Achsen aufgespannten Ebene in Abb. 5.4.2-2. Abbildung 5.4.2-3 veranschaulicht die Lage dieser Geraden im Koordinatensystem. Mit steigender Gesamtenzymmenge entsprechend einer steigenden Gesamtaktivität wird ihr Abstand zum Ursprung größer. Ihre Steigung entspricht dem negativen Wert des Quotienten aus den maximalen massenspezifischen Aktivitäten $A_{max}^H/A_{max}^C = 177$. Die in Abb. 5.4.2-4 angegebene Abszissenwerte für X_E liegen für die angegebenen Gesamtaktivitäten auf den in Abb. 5.4.2-3 gezeigten Geraden.

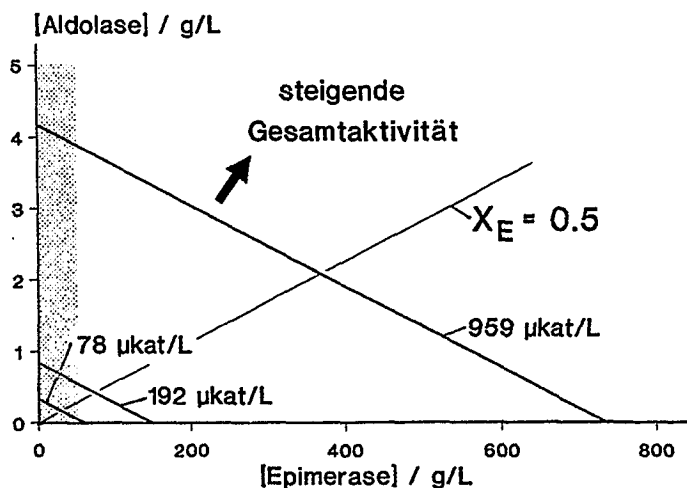


Abb. 5.4.2-3: Veranschaulichung des Aktivitätsmolenbruchs als Funktion der Epimerase- und Aldolasekonzentration; die Schraffierung kennzeichnet den in Abb. 5.4.2-2 dargestellten Bereich

In Abbildung 5.4.2-4 ist der Pyr-Umsatz als Funktion des Aktivitätsmolenbruchs bei verschiedenen Gesamtaktivitäten dargestellt. Der Umsatz zeigt über große Bereiche hinweg eine nur schwach ausgeprägte Abhängigkeit vom Aktivitätsmolenbruch und damit vom Enzymverhältnis. Mit steigender Gesamtenzymaktivität wird

der erzielbare Umsatz größer. Zur Erhöhung der Gesamtaktivität gibt es zwei Möglichkeiten:

- Das Enzymverhältnis und damit der Aktivitätsmolenbruch wird konstant gehalten (Übergang von Punkt A nach C in Abb. 5.4.2-4). Dies führt ausgehend von 30 g/L Epimerase und 0,67 g/L Aldolase zu Konzentrationen von 148 g/L bzw. 3,3 g/L. Derartig hohe Konzentrationen sind für den praktischen Einsatz nicht brauchbar.
- Die Gesamtaktivität im Reaktor wird durch Vergrößerung nur der Aldolasekonzentration erhöht. Dies führt zu einer Veränderung des Aktivitätsmolenbruches hin zu kleineren Werten (Übergang von Punkt A nach B in Abb. 5.4.2-4), bei denen trotzdem der gleiche Umsatz wie bei der Konzentrationserhöhung beider Enzyme erzielt wird. Dieser Übergang ist auch in Abb. 5.4.2-2 eingetragen.

Damit zeigt sich, daß nicht allein die geringe massenspezifische Aktivität der Epimerase für die Umsetzung des GlcNAc der limitierende Faktor ist, sondern je nach Bedingungen die geringe Aktivität der Aldolase bei den niedrigen stationären ManNAc-Konzentrationen. Diese liegen für X_E -Werte zwischen 0,01 und 0,8 bei etwa 20 mM und damit weit unter dem K_m -Wert von 402,2 mM. Da andererseits bei diesen Konzentrationen der Gleichgewichtsumsatz bezüglich der Neu5Ac-Synthese aus ManNAc und Pyr noch nicht erreicht ist, führt eine Erhöhung der Aldolasekonzentration zu einer verstärkt ablaufenden Neu5Ac-Synthese.

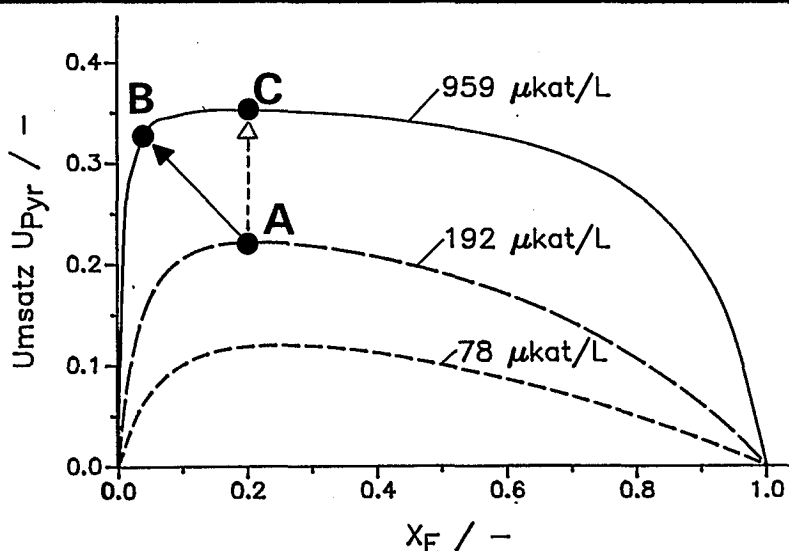


Abb. 5.4.2-4: Pyr-Umsatz als Funktion des Aktivitätsmolenbruches bei verschiedenen Gesamtaktivitäten; die Punkte entsprechen einer Epimerase-/Aldolasekonzentration von 30/0,67 g/L (A), 30/4 g/L (B) und 148/3,3 g/L (C)
Bedingungen: $[\text{GlcNAc}]_0 = [\text{Pyr}]_0 = 200 \text{ mM}$ Pyr, $\tau = 10800 \text{ s}$

Die Selektivität σ_{GlcNAc} als Funktion des Aktivitätsmolenbruchs ist in Abb. 5.4.2-5 dargestellt. Aus den bereits oben diskutierten Gründen steigt die Selektivität mit steigender Gesamtaktivität an, da auf Grund der größeren Geschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese ein größerer Anteil des gebildeten ManNAc umgesetzt wird. Bei zunehmenden X_E -Werten entsprechend abnehmender Aldolasekonzentration verbleibt ein steigender Anteil an nicht umgesetztem ManNAc in der Lösung, so daß die Selektivität abfällt.

Auf Grund der vorgestellten Zusammenhänge ergibt sich, daß eine Epimerasekonzentration von etwa 30 g/L und eine Aldolasekonzentration von etwa 4 g/L für die kontinuierliche Synthese von Neu5Ac ausgehend von GlcNAc günstig ist (entsprechend Punkt B in Abb. 5.4.2-4).

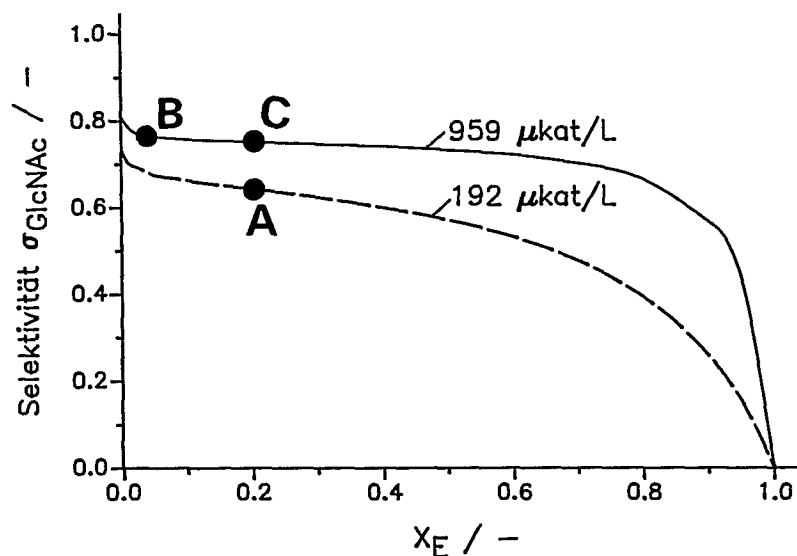


Abb. 5.4.2-5: Selektivität des GlcNAc-Umsatzes als Funktion des Aktivitätsmolenbruches bei verschiedenen Gesamtaktivitäten; zur Bedeutung von A, B und C vgl. Abb. 5.4.2-4
Bedingungen: $[\text{GlcNAc}]_0 = [\text{Pyr}]_0 = 200 \text{ mM}$ Pyr, $\tau = 10800 \text{ s}$

Einfluß der Verweilzeit

In den Abbildungen 5.4.2-6 und 5.4.2-7 ist der Einfluß der Verweilzeit auf den Umsatz U_{Pyr} und die Raum-Zeit-Ausbeute bei verschiedenen Substratkonzentrationen dargestellt. Mit steigender Verweilzeit nimmt der erreichbare Umsatz zu, ebenso mit steigender Substratkonzentration. Der Wendepunkt der Kurven wird durch die Überlagerung zweier Effekte verursacht. Mit zunehmender Verweilzeit wird von der Epimerase mehr ManNAc gebildet, was ebenfalls zur Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit der Neu5Ac-Synthese führt. Bei Annäherung an den Gleichgewichtsumsatz der Epimerisierung nimmt die Geschwindigkeit dieser Teilreaktion stark ab (vgl. auch Kap. 4.3.3). Aus dem gleichen Grund steigt die Raum-Zeit-Ausbeute mit zunehmender Verweilzeit zunächst an und weist ein ausgeprägtes Maximum zwischen 1200 s und 2400 s (20 bzw. 40 min) auf.

Ausschlaggebendes Kriterium für die Wahl der Verweilzeit ist jedoch ein möglichst hoher Umsatz, da er die Produktisolierung vereinfacht. Somit stellen Verweilzeiten von 10800 s (= 3 h) einen günstigen Kompromiß dar, da bei nahezu Gleichgewichtsumsatz noch Raum-Zeit-Ausbeuten zwischen 100 und 250 g/(L*d) erzielt werden können. Entsprechende Bereiche sind in Abb. 5.4.2-6 und 5.4.2-7 schraffiert.

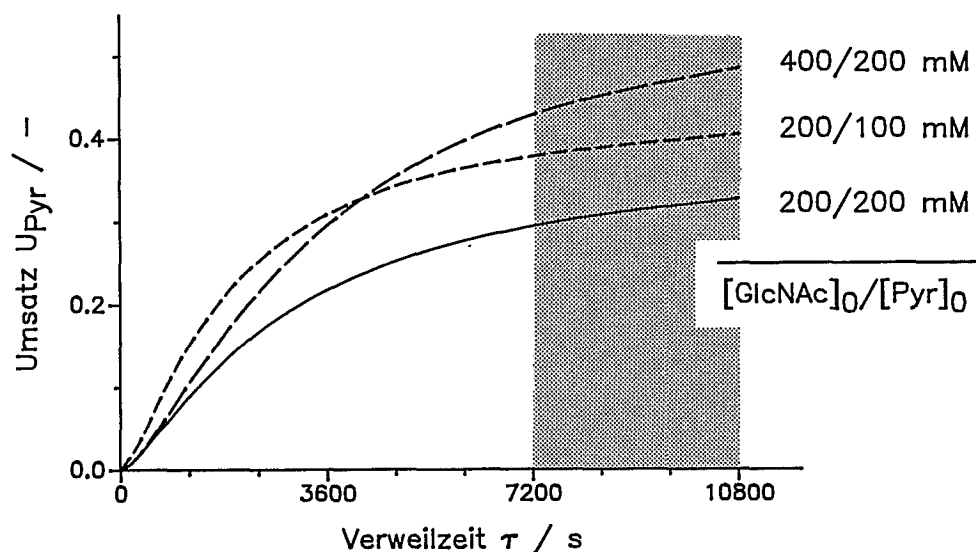


Abb. 5.4.2-6: Umsatz im gekoppelten System als Funktion der Verweilzeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen
Bedingungen: 30 g/L Epimerase, 4 g/L Aldolase

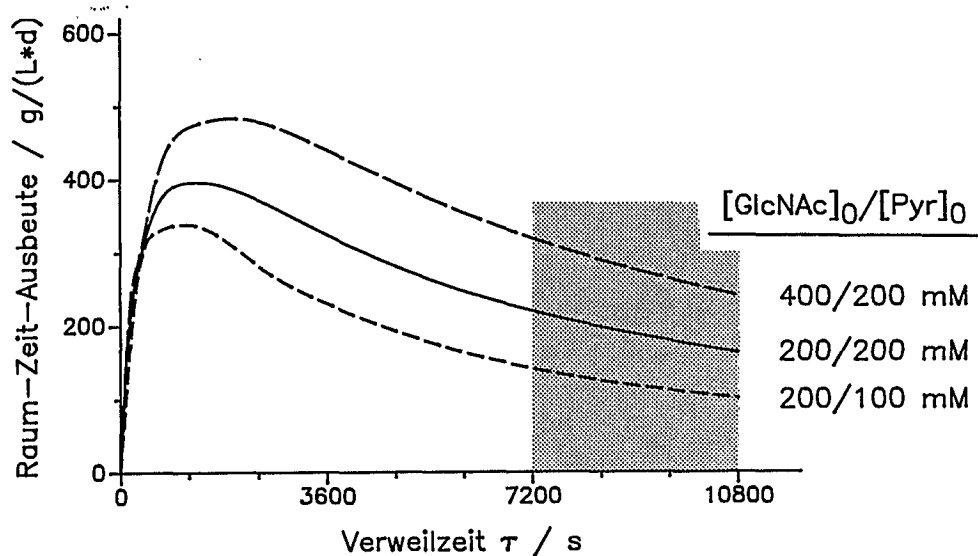


Abb. 5.4.2-7: Raum-Zeit-Ausbeute im gekoppelten System als Funktion der Verweilzeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen
Bedingungen: 30 g/L Epimerase, 4 g/L Aldolase

Zusammenfassung

- Mit Hilfe der dargestellten Modellrechnungen können kinetische Eigenschaften des gekoppelten Enzymsystems für die Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc unter Verwendung des gekoppelten Enzymsystems verdeutlicht werden.
- Für das gekoppelte Enzymsystem zur Neu5Ac-Synthese sind Pyr-Konzentrationen von 100 bis 200 mM bei GlcNAc-Konzentrationen von 200 bis 400 mM günstig.
- Mit Hilfe von Modellrechnungen unter Verwendung des Aktivitätsmolenbruchs läßt sich ein geeignetes Enzymverhältnis ermitteln, bei dem hohe Umsätze erzielt werden können. Für den erzielbaren Umsatz im kontinuierlichen Prozeß ist in vielen Fällen nicht die geringe massenspezifische Aktivität der Epimerase limitierend, sondern die Aktivität der Aldolase. Diese ist bei niedrigen stationären ManNAc-Konzentrationen, die weit unter dem K_m -Wert für dieses Substrat liegen, sehr klein.
- Um hohe Umsätze bei in der Praxis anwendbaren Enzymkonzentrationen zu erzielen, sind Verweilzeiten um 3 h notwendig. Die erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeuten liegen – abhängig von den Substratkonzentrationen – bei 100 bis 250 g/(L*d).
- Durch die Kopplung mit der nachfolgenden Neu5Ac-Synthese wird die Gleichgewichtslage der Epimerisierung auf die Produktseite verschoben. Der Gleichgewichtsumsatz wird etwa um den Faktor 2 bei Verwendung äquimolarer Substratmengen erhöht.

5.4.3 Kontinuierliche Experimente mit dem gekoppelten Enzymsystem

In diesem Kapitel wird der gemeinsame Einsatz der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase und der Neu5Ac-Aldolase im Enzym-Membran-Reaktor beschrieben. Die Experimente sollen die Eignung des gekoppelten Systems zur Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc sowie das aufgestellte kinetische Modell bestätigen.

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog den in Kap. 3.5.3 beschriebenen Experimenten zum Einsatz der Aldolase:

- Alle Versuche wurden im 14,3 mL EMR aus Polypropylen durchgeführt.
- Die ermittelten Konzentrationen im Reaktorein- und auslauf ergaben im Rahmen der Meßgenauigkeit eine geschlossene Bilanz.
- Puffersubstanzen wurden nicht eingesetzt.
- Bei allen Experimenten wurden der Substratlösung 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$ zugesetzt.
- In einigen Fällen (speziell bei niedrigeren Konzentrationen) kam es zu mikrobiellem Bewuchs der Substratlösung. Dies könnte durch eine verbesserte Steriltechnik, wie sie beispielsweise in der Fermentationstechnik verwendet wird, vermieden werden.
- Als Substratkonzentrationen wurden etwa 200 mM GlcNAc und 100 oder 200 mM Pyr verwendet. Im folgenden wird neben den erzielten Absolutkonzentrationen nur der Umsatz für Pyr angegeben. Es gilt: $U_{Pyr} = Y_{Pyr} = Y_{GlcNAc}$.

Tabelle 5.4.3-1 enthält die Bedingungen für alle mit dem gekoppelten Enzymsystem durchgeführten Experimente sowie den experimentell bestimmten Umsatz. In Tab. 5.4.3-2 sind neben den gemessenen Konzentrationen und der daraus berechneten Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) auch die Konzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten, die sich aus den Modellrechnungen ergeben, aufgeführt. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird mit Hilfe der modifizierten Gl. 3.5.2-6 berechnet.

Versuch Nr.	[Epi] g/L	[Ald] g/L	τ s	[GlcNAc] ₀ mM	[Pyr] ₀ mM	U _{Pyr} -
1	21,0	3,90	1800	223	96	0,15
2	21,0	3,90	3600	223	96	0,27
3	21,0	3,90	1800	202	201	0,10
4	21,0	3,90	3600	202	201	0,20
5	21,0	3,90	10800	221	202	0,33
6	11,9	4,00	10260	200	100	0,41

Tab. 5.4.3-1: Bedingungen der kontinuierlichen Experimente mit dem gekoppelten Enzymsystem

Versuch Nr.	[Neu5Ac] mM	[ManNAc] mM	[Pyr] mM	[GlcNAc] mM	RZA g/(L*d)
1	14,7	10,9	82,1	170,6	218
	<i>17,8</i>	<i>13,5</i>	<i>78,2</i>	<i>191,7</i>	<i>264</i>
2	26,3	15,0	69,8	154,0	195
	<i>28,3</i>	<i>19,1</i>	<i>67,7</i>	<i>175,6</i>	<i>210</i>
3	19,8	5,3	179,0	178,9	294
	<i>21,3</i>	<i>11,0</i>	<i>179,8</i>	<i>169,8</i>	<i>316</i>
4	41,2	14,2	164,0	130,0	306
	<i>37,8</i>	<i>14,2</i>	<i>163,2</i>	<i>150,0</i>	<i>281</i>
5	66,6	15,5	131,7	125,2	165
	<i>66,5</i>	<i>20,7</i>	<i>135,5</i>	<i>133,8</i>	<i>165</i>
6	41,1	20,0	65,0	145,2	107
	<i>35,0</i>	<i>20,4</i>	<i>65,0</i>	<i>144,6</i>	<i>91</i>

Tab. 5.4.3-2: Vergleich der experimentellen und berechneten Konzentrationen (jeweils zweite Zeile, kursiv) und Angabe der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) für kontinuierliche Experimente mit dem gekoppelten Enzymsystem

Wie bereits bei der Vorstellung der Modellrechnungen zur Diskussion der kinetischen Eigenschaften des Gesamtsystems ausgeführt, findet man eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Daten. Lediglich bei Versuch Nr. 3 weicht die berechnete ManNAc-Konzentration deutlich von der experimentell gefundenen ab. Insgesamt gesehen gelingt es jedoch mit ausreichender Genauigkeit, die erzielbaren Neu5Ac-Ausbeuten vorherzusagen.

Die gemessenen Raum-Zeit-Ausbeuten zeigen das nach Abb. 5.4.2-7 erwartete Verhalten. Speziell die Versuche 3 und 4 zeigen, daß die Raum-Zeit-Ausbeute bei Verweilzeiten zwischen 1200 s und 3600 s ein Maximum durchläuft.

In Abb. 5.4.3-1 ist der Umsatz U_{Pyr} als Funktion der Zeit für die Experimente 1 bis 5 dargestellt. Die zeitliche Abfolge der verschiedenen Betriebszustände des Reaktors entspricht dabei nicht der Reihenfolge der Numerierung. Neben dem experimentellen Umsatz ist auch der mögliche Gleichgewichtsumsatz angegeben.

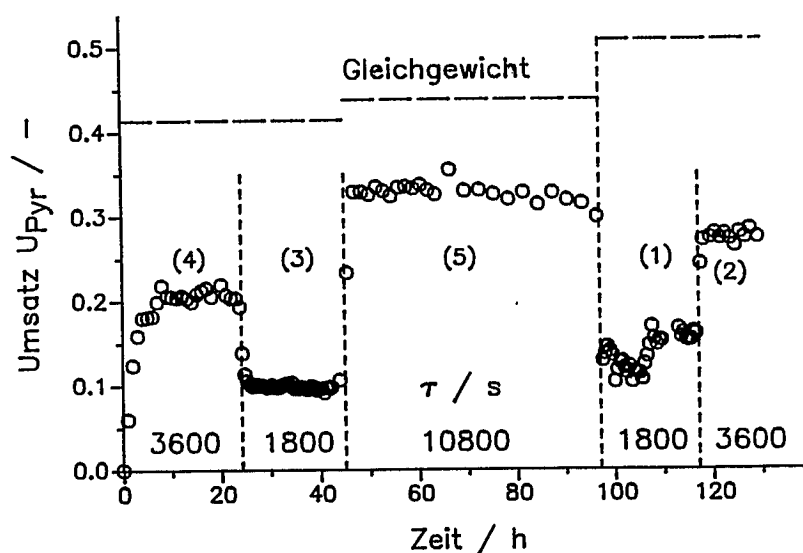


Abb. 5.4.3-1: Umsatz U_{Pyr} als Funktion der Zeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Verweilzeiten; Bedingungen vgl. Tab. 5.4.3-1; (3)-(5) 200 mM GlcNAc, 200 mM Pyr; (1)-(2) 200 mM GlcNAc, 100 mM Pyr; 21,0 g/L Epimerase, 3,90 g/L Aldolase

In Abb. 5.4.3-2 ist der Konzentrations-Zeit-Verlauf aller Substrate und Produkte für Versuch Nr. 6 dargestellt. Dieser Versuch sollte aufzeigen, daß die Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc auch über längere Zeiträume hinweg möglich ist. Daten zur Enzymdesaktivierung der Aldolase wurden bereits bei der Neu5Ac-Synthese ausgehend von ManNAc bestimmt. Um die Stabilität der Epimerase beim Einsatz des gekoppelten Enzyms überprüfen zu können, wurden die Enzymkonzentrationen so gewählt, daß ein kleiner Wert für den Aktivitätsmolenbruch X_E erhalten wird. Bei den gewählten Bedingungen ergibt sich für X_E ein Wert von 0,019 bei einer Gesamtaktivität von 935 $\mu\text{kat/L}$. Dies entspricht einer Lage auf der Umsatz- X_E -Kurve ähnlich wie Punkt B in Abb. 5.4.2-4. Die nicht dargestellte Kurve für $[\text{GlcNAc}]_0 = 200 \text{ mM}$ und $[\text{Pyr}]_0 = 100 \text{ mM}$ zeigt einen

sehr ähnlichen Verlauf. Eine Desaktivierung der Epimerase würde den Aktivitätsmolenbruch zu kleineren Werten hin verschieben, was sich durch einen starken Umsatzrückgang bemerkbar machen würde. Da über den Versuchszeitraum hinweg nur ein geringfügiger Rückgang des Umsatzes beobachtet wird, besitzt die Epimerase eine gute Stabilität beim Einsatz des gekoppelten Enzymsystems im Enzym-Membran-Reaktor. Aus dem Umsatzrückgang kann mit Hilfe der Modellrechnungen eine Desaktivierung von $\leq 1\%/d$ abgeschätzt werden. Damit wird die Epimerase genau wie die Aldolase auch durch die Anwesenheit von Substraten und Produkten stabilisiert (vgl. auch Abb. 4.3.4-1).

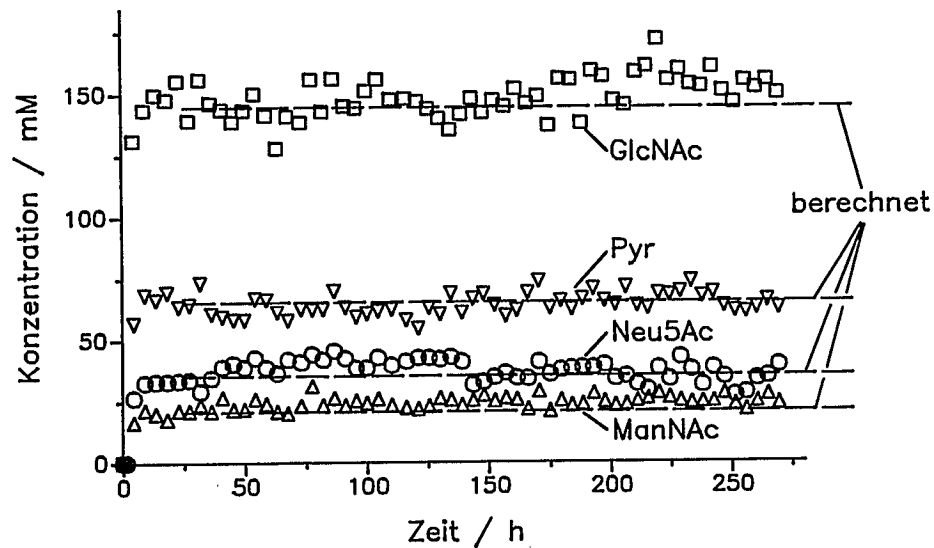


Abb. 5.4.3-2: Konzentrationen als Funktion der Zeit für das gekoppelte Enzymsystem im kontinuierlichen Prozeß; der mögliche Gleichgewichtsumsatz liegt bei 47%.
Bedingungen: $[GlcNAc]_0 = 200 \text{ mM}$, $[Pyr]_0 = 100 \text{ mM}$; $[Epl.] = 11,9 \text{ g/L}$, $[Ald.] = 4 \text{ g/L}$; $\tau = 10260 \text{ s}$

Wie bereits bei der Neu5Ac-Synthese ausgehend von ManNAc diskutiert wurde, muß bei der Wahl geeigneter Betriebspunkte auch die Produktisolierung berücksichtigt werden. In Abb. 5.4.3-3 sind zusammenfassend die erreichten Konzentrationen der durchgeführten Versuche dargestellt.

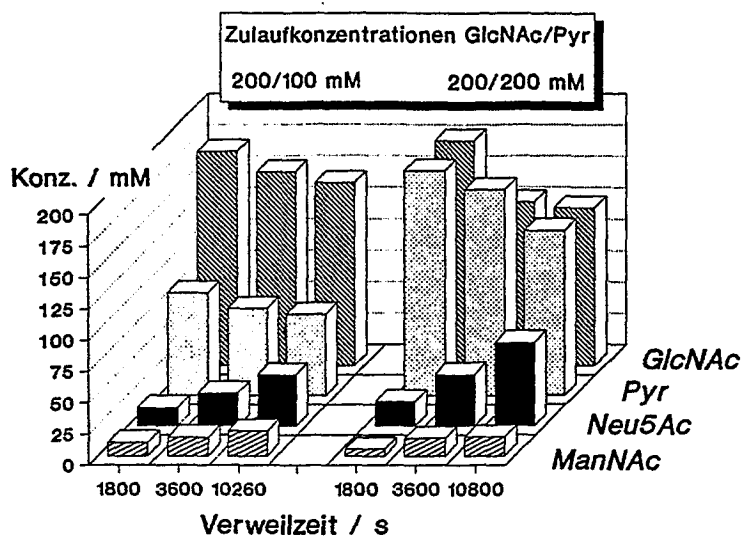


Abb. 5.4.3-3: Vergleichende Darstellung der erzielten Konzentrationen bei Verwendung des gekoppelten Enzymsystems im kontinuierlichen Prozeß

Für die Produktisolierung entscheidend ist vor allem das Verhältnis von Neu5Ac zu nicht umgesetztem Pyr, das möglichst groß sein sollte. Wie aus Abb. 5.4.3-3 ersichtlich, sind zur Erzielung eines möglichst hohen Umsatzes lange Verweilzeiten erforderlich. Mit steigendem GlcNAc-Überschuß steigt das Verhältnis Neu5Ac zu Pyr an (vgl. Abb. 5.4.2-1). Da gleichzeitig der Anteil an nicht umgesetztem GlcNAc in der Produktlösung steigt, ist unter ökonomischen Gesichtspunkten eine Rückgewinnung dieses Substrates sinnvoll. Höhere Substratkonzentrationen führen zu entsprechend höheren Produktkonzentrationen und damit zu höheren Raum-Zeit-Ausbeuten schon bei äquimolaren Substratkonzentrationen.

5.5 Zusammenfassung

- Erstmalig wurde Neu5Ac ausgehend von GlcNAc mit Hilfe des gekoppelten Enzymsystems aus *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase und Neu5Ac-Aldolase im kontinuierlichen Prozeß hergestellt.
- Bei Pyr-Umsätzen von 41 und 33% wurden bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen Raum-Zeit-Ausbeuten von 107 und 165 g/(L*d) erzielt.
- Querinhibierungen durch die Substrate und Produkte der jeweils anderen Reaktion wurden mit Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit untersucht. Die Inhibierung der Aldolase durch GlcNAc läßt sich ebenfalls durch den schon früher verwendeten Einfluß hoher Substratkonzentrationen auf die Enzymaktivität beschreiben.
- Durch Kombination der Modelle für die beiden Einzelreaktionen wurde ein Modell für die Gesamtreaktion aufgestellt und experimentell bestätigt.
- An Hand von Modellrechnungen wurde der Einfluß der Substrat- und Enzymkonzentrationen sowie der Verweilzeit auf erzielbare Umsätze und Raum-Zeit-Ausbeuten diskutiert.
- Zur Erzielung hoher Umsätze sind relativ hohe Gesamtaktivitäten im Reaktor notwendig. An Stelle hoher Epimerasekonzentrationen – verursacht durch die geringe massenspezifische Aktivität – kann eine entsprechend höhere Aldolasekonzentration eingesetzt werden. Die geringe massenspezifische Aktivität der Epimerase, die z. Z. noch nicht in den Mengen wie die Aldolase verfügbar ist, kann anschaulich "durch Verwendung einer größeren Menge der billigeren Aldolase kompensiert werden".

6 Methoden zur Isolierung der gebildeten Neu5Ac

Bei einer Prozeßentwicklung muß zusätzlich die Produktisolierung berücksichtigt werden, wie bereits in Abb. 2.1-1 gezeigt wurde. Bei den in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen zur Festlegung der Reaktionsbedingungen für die kontinuierlichen Prozesse wurde dieser Aspekt bereits an den entsprechenden Stellen diskutiert. In diesem Kapitel werden nach einer Einführung die verwendeten Methoden zur Isolierung der synthetisierten Neu5Ac beschrieben.

6.1 Einführung

Zur Isolierung und Reinigung von Sialinsäuren ist die Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung stark basischer Anionenaustauscher eine etablierte Methode (Schauer, 1982a). Sie wurde auch im Rahmen dieser Arbeit benutzt, da Neu5Ac als anionogene Verbindung von ungeladenen Substanzen (ManNAc, GlcNAc) und Brenztraubensäure als weiterer anionogener Komponente abgetrennt werden muß. Dieses Verfahren wurde aus folgenden Gründen gewählt:

- Die benötigten Ionenaustauscherharze werden bei industriellen Prozessen verwendet und sind somit preiswert verfügbar.
- Bei der Verwendung von im Vakuum flüchtigen Elutionsmitteln (z. B. Ameisensäure) ist die Gewinnung des reinen Produktes einfach durch Gefriertrocknung ohne zusätzliche Schritte möglich.
- Die Adsorption organischer Säuren nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Aus diesem Grund sind schwach basische Ionenaustauscher, deren Kapazität bei pH-Werten über 5 stark abfällt, für diese Trennung nicht geeignet.
- Mit Metallionen beladene Kationenaustauscher (Barker et al., 1969) können auf Grund der hohen Konzentration an Na^+ , das aus Na-Pyr stammt, nicht verwendet werden.
- Lectine, die als Proteine selektiv bestimmte Kohlenhydrate binden können, sind bisher nur in kleinen Mengen zu analytischen Zwecken verfügbar (Fluka, 1991).
- Die häufig zur Trennung von Kohlenhydraten benutzten Borat-Komplexe erfordern zusätzliche Schritte zur Reindarstellung des Produkts (Jandera et al., 1974).
- Elektrodialyse ist zur selektiven Produktabtrennung nicht geeignet, wie bereits in Kap. 3.1 diskutiert wurde.

Eine umfassende Übersicht zur Theorie und Anwendung der Ionenaustauschchromatographie ist in der folgenden Literatur zu finden: Helfferich, 1962; Helfferich et al., 1974; De Dardel, 1990; Jandera et al., 1973, 1974; Cooper, 1981; Bio-Rad, 1982. Bei der folgenden Beschreibung der Methodenentwicklung wird, wo notwendig, auf Grundlagen eingegangen.

6.2 Trennung von ManNAc, Neu5Ac und Pyruvat

Die bei der Neu5Ac-Synthese ausgehend von ManNAc anfallende Produktlösung enthält die Komponenten in etwa folgenden Konzentrationen (vgl. Produktion im 300-g-Maßstab, Kap. 3.5.4):

- Neu5Ac 270 mM
- ManNAc 70 mM
- Pyr 380 mM.

Die Aufarbeitung dieser Lösung erfolgte gemäß der in Tab. 6.2-1 angegebenen Bedingungen (Appel, 1990). Das Anlagenfließbild mit weiteren Einzelheiten findet sich in Kap. 9.4.

Austauscher	Dowex 1X2, Formiat-Form	
Korngröße	200 - 400 mesh, entspricht 37 - 74 µm	
Kapazität	900	mval/L Gel
Säulenvolumen	981	mL
Säulenabmessungen	Länge 50 cm, ø 5 cm	
Probenvolumen	ca. 400	mL
Flußrate Probenaufgabe	75	mL/h
Flußrate H ₂ O	75	mL/h
Flußrate HCOOH	250	mL/h
[HCOOH]	1	mol/L (isokratisch)

Tab. 6.2-1: Bedingungen zur Trennung von Neu5Ac, ManNAc und Pyr mittels Anionenaustauschchromatographie

Die einzelnen Verfahrensschritte werden im folgenden beschrieben. Abbildung 6.2-1 zeigt das Chromatogramm eines typischen Säulenlaufes.

- Als Eluenten werden nur H₂O und Ameisensäure (HCOOH) verwendet.
- Der Anionenaustauscher wird mit 1 M Ameisensäure in die Formiatform überführt.
- Mit H₂O wird die Ameisensäure ausgespült (Prüfung des pH-Wertes am Auslauf).
- Die Probe wird langsam aufgepumpt. Neu5Ac und Pyr liegen bei pH 7,5 auf Grund ihrer pK_a-Werte (vgl. Tab. 6.3-1) als Anionen vor und werden an den quarternären Ammoniumgruppen des Austauschers gebunden. ManNAc als ungeladene Verbindung wird nicht gebunden und zusammen mit Na⁺- und freigesetzten Formiaten eluiert.
- Die Konzentration an Anionen in dem aufgegebenen Probenvolumen entspricht ca. 30% der Austauscherkapazität; die Nutzkapazität des Ionenaustauschers liegt bei 40 - 50% (Dow, 1989).

- Die Säule wird mit H₂O gespült, bis das Eluat ManNAc-frei ist.
- Durch Elution mit 1 M Ameisensäure wird zunächst Neu5Ac, etwas später Pyr eluiert. Gleichzeitig erfolgt die Regenerierung der Säule für den nächsten Lauf.
- Pro Säulenlauf können ca. 25 – 30 g Neu5Ac isoliert werden (981 mL Gelvolumen).
- Beim Aufpumpen der Probe kommt es zu reversiblen Volumenveränderungen des Gelbetts auf Grund osmotischer Effekte durch die konzentrierte Produktlösung. Das Trennverhalten der Säule wird dadurch nicht nachteilig beeinflusst.
- Die Konzentrationsbestimmung in den gesammelten Fraktionen erfolgt mittels HPLC. Neu5Ac- und ManNAc-haltige Fraktionen werden jeweils vereinigt und gefriergetrocknet.
- Die vollständige Entfernung der Ameisensäure, die selbst in Spuren am Geruch feststellbar ist, erfolgt durch Trocknung im Ölpumpenvakuum bei 10⁻³ mbar.
- Ausbeuteverluste treten nur auf, wenn Neu5Ac beim Aufpumpen der Probe nicht vollständig gebunden wird.

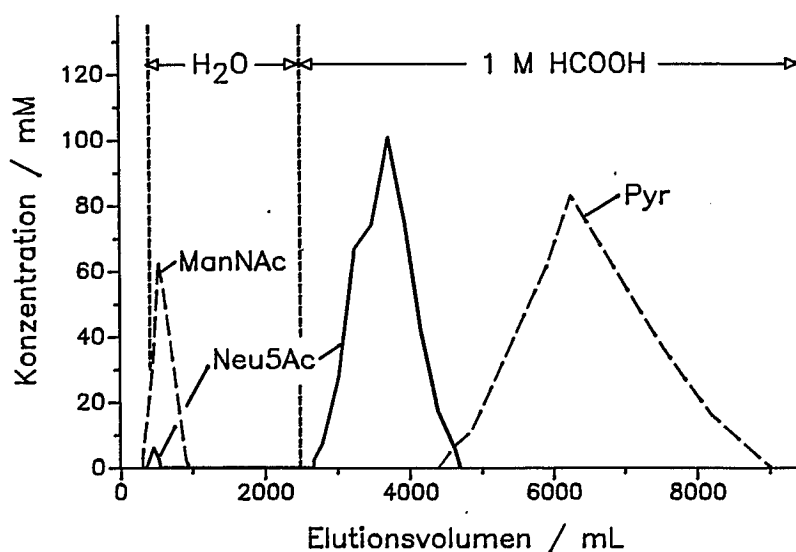


Abb. 6.2-1: Chromatogramm zur Trennung von Neu5Ac, ManNAc und Pyr mittels Anionenaustauschchromatographie; Säulenvolumen 981 mL

Die Ermittlung geeigneter Trennbedingungen erfolgte unter Verwendung von Produktlösung aus den kontinuierlichen Versuchen zur Neu5Ac-Synthese in thermostatisierten Glassäulen mit einem Gelvolumen von etwa 14 mL. Die dabei gefundenen Parameter können linear auf die verwendeten größeren Säulen (110 mL, 981 mL Gelvolumen) übertragen werden. Lediglich die Flußrate der Elution mit HCOOH mußte beim Übergang von 110 mL auf 981 mL um den Faktor 2 reduziert werden (Appel, 1990).

Einige wesentliche Aspekte bei der Ermittlung günstiger Trennbedingungen sollen im folgenden diskutiert werden:

- Mit zunehmendem Vernetzungsgrad der Ionenaustauschermatrix nimmt die Porengröße ab, die den Zugang größerer Ionen in das Korninnere bestimmt. Für den niedriger vernetzten Typ Dowex 1X2 wird eine Ausschlußgrenze von 2700 u angegeben, für den höher vernetzten Typ Dowex 1X8 von 1000 u. Die Kapazität des Ionenaustauschers steigt mit zunehmender Vernetzung von 900 mval/L Gel auf 1400 mval/L an, ebenso die Selektivität (Bio-Rad, 1982; Ullmann, 1974). Bei Trennversuchen mit dem Typ 1X8 wurden trotz ausreichender Kapazität und kleinen Flußraten bis zu 20% der aufgegebenen Neu5Ac-Menge nicht gebunden, während im Überschuß vorliegendes Pyr vollständig absorbiert wurde. Bei Verwendung des Typs 1X2 wurde bei identischen Bedingungen die Neu5Ac ebenfalls vollständig gebunden.
- Die Ionen werden langsamer am Austauscher adsorbiert als desorbiert (Cooper, 1981). Zur Erzielung vollständiger Adsorption der Neu5Ac mußte die Flußrate unter den vom Hersteller empfohlenen Wert von etwa 20 bis 50% des Bettvolumens pro Stunde gesenkt werden (Dow, 1989).
- Neu5Ac kann vollständig und selektiv durch Verwendung niedriger Ameisensäurekonzentrationen eluiert werden, bei denen Pyr nur sehr langsam freigesetzt wird. Vermutlich wird Neu5Ac auf Grund des oben diskutierten Siebefektes nur in den Randbereichen des Korns gebunden, während die kleineren Pyruvat-Ionen vornehmlich im Korninnern gebunden werden. Bei niedrigen Elektrolytkonzentrationen ist dessen Konzentration auf Grund des "Donnan-Ausschlusses" im Korninnern noch weiter herabgesetzt (Ullmann, 1974). Die positive Ladung der quaternären Ammoniumgruppen wird aufgrund ihrer Hydrathülle erst in einem gewissen Abstand durch die Gegenionen kompensiert. Dadurch entsteht eine partiell positiv geladene Membran, die für Elektrolyte aufgrund der positiven Ladung eines der beiden Ionen undurchlässig ist. Bei höheren Elektrolytkonzentrationen verliert der "Donnan-Ausschluß" an Wirksamkeit, so daß Formiat-Ionen in das Korninnere eindringen können und Pyruvat ebenfalls freigesetzt wird. Die gewählte Ameisensäurekonzentration von 1 M stellt einen geeigneten Kompromiß dar, um das Verfahren möglichst einfach und effektiv zu gestalten.
- Im Bereich zwischen 15 °C und 40 °C wurde kein Temperatureinfluß auf die Trennung gefunden.
- Der Einfluß der Korngröße und des pH-Wertes der aufgegebenen Probe und des Eluenten wurden nicht näher untersucht. Prinzipiell wird die Trennung bei chromatographischen Verfahren mit abnehmender Korngröße besser.

Etwa 100 g der nach dem in Kap. 3.5.3 beschriebenen Verfahren enzymatisch hergestellten und nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgereinigten Neu5Ac sind auf dem Photo in Abb. 6.2-2 abgebildet.

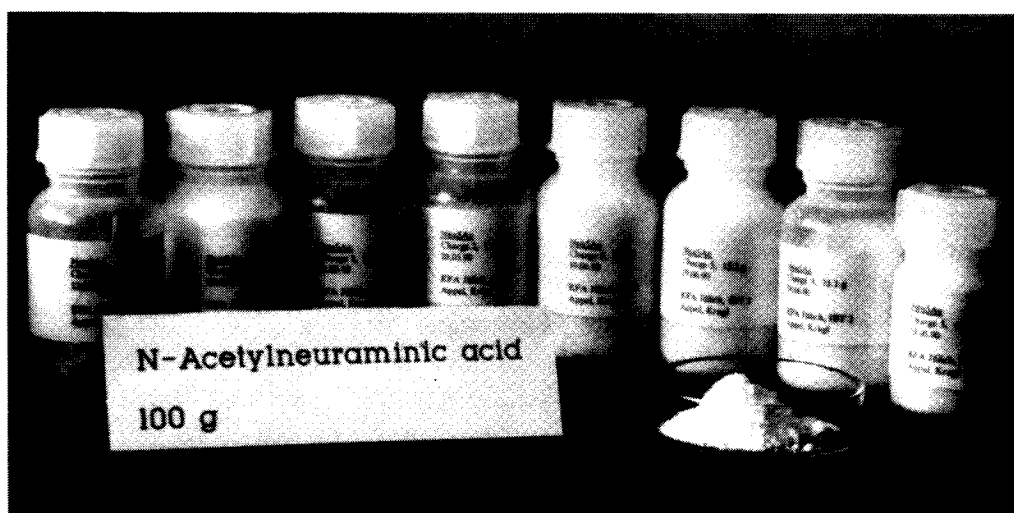


Abb. 6.2-2: Enzymatisch hergestellte und durch Anionenaustauschchromatographie isolierte Neu5Ac

Das Produkt wurde folgendermaßen charakterisiert:

- Die Reinheit gemäß HPLC liegt bei > 99%.
- ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren stimmen mit Literaturangaben und den Spektren einer Referenzprobe überein (Behr et al., 1973; Brown et al., 1975; Bhattacharjee et al., 1975; Friebolin, 1988; Prytulla et al., 1990). Zusätzliche Signale treten nicht auf.
- Die Elementaranalyse liefert:

C	H	N	O	
11	19	1	9	(berechnet)
11,0	19,4	1,0	9,1	(gefunden)

- Für die spezifischen bzw. molaren Drehwerte wurde bei den angegebenen Bedingungen gefunden (25 °C, 589 nm, 10 g/L in H_2O):

Referenz (Fluka)	-28,8 grd*mL/(g*dm)
	-89,0 grd*L/(mol*m)
Neu5Ac-Chargen	-29,0 bis -31,3 grd*mL/(g*dm)
	-89,6 bis -96,7 grd*L/(mol*m)

Prinzipiell könnte mit Hilfe des hier vorgestellten Verfahrens eine quasi-kontinuierliche Chromatographie an den Enzym-Membran-Reaktor angekoppelt werden. Die hier verwendete 981 mL-Säule ist von der Kapazität her in der Lage, den Reaktorauslauf von einem Tag aufzunehmen, wie er bei der Synthese im 300-g-Maßstab erhalten wurde (vgl. Kap. 3.5.3). Durch die Parallelschaltung mehrerer Säulen könnte zyklisch die Beladung, Elution und Regenerierung erfolgen. Derartige quasi-kontinuierliche chromatographische Verfahren wurden erfolgreich bei kontinuierlichen enzymatischen Synthesen zur Produktisolierung eingesetzt (Schwarz, 1991; Biselli, 1991).

6.3 Trennung von GlcNAc, ManNAc, Neu5Ac, Pyruvat, Mg^{2+} und ATP

Die Produktisolierung bei der Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc ist aufwendiger, da die anfallende Produktlösung noch ATP und Mg^{2+} enthält. Während die Mg^{2+} -Ionen genau wie die Na^+ -Ionen auf Anionenaustauschern nicht gebunden und zusammen mit den ungeladenen Substanzen direkt wieder eluiert werden, erfordert die Abtrennung des ATP eine Modifizierung des oben beschriebenen Verfahrens. ATP ist eine vierbasige Säure, wobei die pK_a -Werte für drei Protonen zwischen 2 und 3 liegen und für das vierte bei 6,5. In Tabelle 6.3-1 sind die pK_a -Werte der zu trennenden Verbindungen aufgelistet.

Neu5Ac	ca. 2	Schauer, 1985
Brenztraubensäure	2,39	Beilstein, 1979
ATP 3 Protonen	2 bis 3	Jaworek et al., 1985
4. Proton	6,5	
Ameisensäure	3,75	

Tab. 6.3-1: pK_a -Werte von Neu5Ac, Pyr, ATP und Ameisensäure

Das in Kap. 6.2 beschriebene Verfahren kann bei Anwesenheit von ATP in der aufzureinigenden Lösung nicht verwendet werden, da unter diesen Bedingungen ATP und Neu5Ac nicht getrennt werden. Eine Trennung von ATP und Neu5Ac läßt sich auf zwei Wegen erreichen:

- Verwendung eines nicht-linearen Ameisensäuregradienten.
- Verwendung von Na^+ - oder NH_4^+ -Formiat als Eluent.

Beide Methoden besitzen Vor- und Nachteile. So wird bei Verwendung des Ameisensäuregradienten zwar keine vollständige Basislinientrennung für ATP und Neu5Ac erreicht, dafür läßt sich aber das verwendete Elutionsmittel leicht im Vakuum entfernen. Bei der Elution mit Ameisensäuresalzen wird eine sehr gute Basislinientrennung der beiden Verbindungen erreicht. Nachteilig ist, daß die Neu5Ac in einem weiteren Schritt in die freie Säure überführt werden muß.

Im folgenden werden die beiden Methoden vorgestellt. Zusätzlich zu den bereits in Kap. 6.2 aufgezählten Punkten gilt:

- ATP wird durch Aufnahme des UV-Spektrums photometrisch nachgewiesen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Messung der Extinktion bei 258 nm und Vergleich mit einer Eichkurve.
- Mg^{2+} wird nach Umsetzung mit Eriochromschwarz T photometrisch bei 530 nm bestimmt. Bei Anwesenheit von Mg^{2+} tritt ein Farbwechsel von blau nach lila auf. (Vorschrift vgl. Kap. 9.1.3).
- Die gesamte Magnesiummenge wird zusammen mit den ungeladenen Verbindungen (GlcNAc, ManNAc) eluiert. Aus Darstellungsgründen wird bei den folgenden Chromatogrammen auf die Angabe von Mg^{2+} verzichtet.

- Ein Teil des ATP wird ebenfalls zusammen mit den ungeladenen Verbindungen und den Kationen eluiert. Möglicherweise bildet es mit Mg^{2+} einen Komplex, der trotz seiner negativen Ladung nicht gebunden wird.

Elution mit einem nicht-linearen Ameisensäuregradienten

Die Trennung von ATP und Neu5Ac mit Ameisensäure als Eluent gelingt nur, wenn ein nicht-linearer Gradient verwendet wird. In Abb. 6.3-1 ist der entsprechende Teil eines Chromatogramms mit Angabe des Gradienten dargestellt. Da das Säulenvolumen nur 110 mL beträgt, wurden gegenüber den Bedingungen in Tab. 6.2-1 die Flußraten um den Faktor 10 verringert. Die aufgegebene Probe, die aus Versuch 6 zum Einsatz des gekoppelten Enzymsystems im kontinuierlichen Prozeß stammt, enthielt insgesamt 12,5 mmol Anionen (Neu5Ac und Pyr) sowie 0,63 mmol ATP. Neu5Ac wurde unter diesen Bedingungen vollständig gebunden.

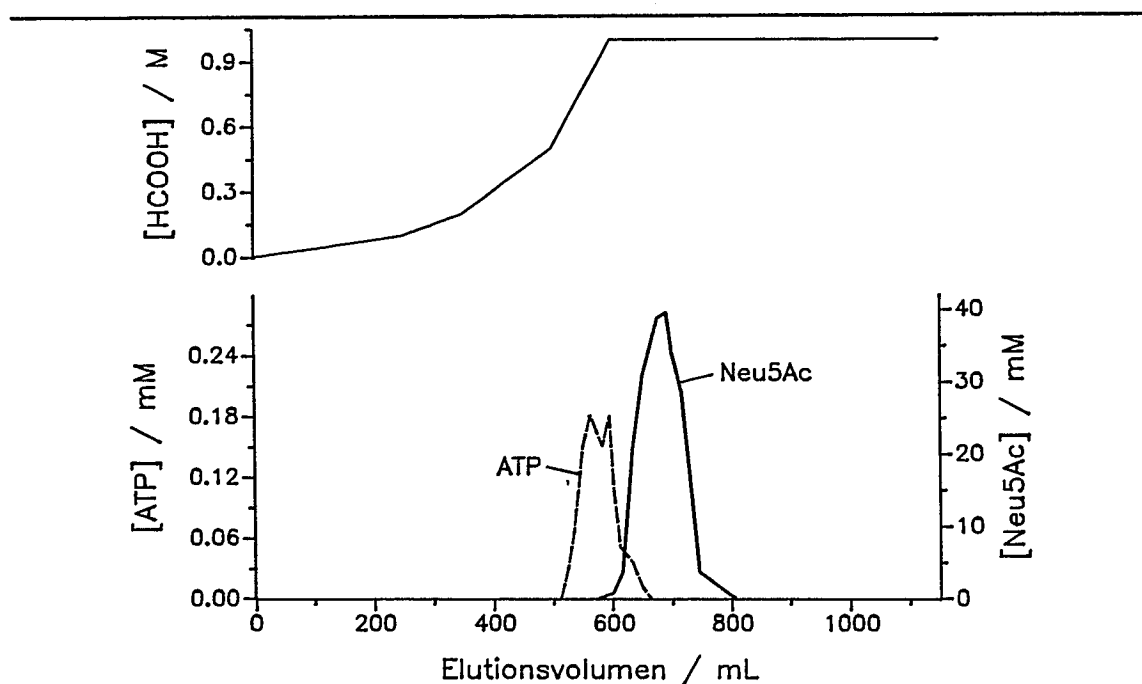


Abb. 6.3-1: Chromatogramm zur Trennung von Neu5Ac und ATP mit einem Ameisensäuregradienten; Bedingungen: Dowex 1X2, Säulenvolumen 110 mL; Flußrate Probenaufgabe und H_2O -Elution: 7,5 mL/h, Flußrate Ameisensäure 50 mL/h

Für die beobachtete Reihenfolge der Elution ist wahrscheinlich der bereits im vorhergehenden Kapitel diskutierte Siebeffekt verantwortlich. ATP ist mit einem Molekulargewicht von 507 g/mol deutlich größer als Neu5Ac und wird nur in den Randbereichen des Korns gebunden.

Die Trennung läßt sich nur durch eine größere Säulenlänge verbessern. Ein flacherer Gradient führt nur zu einer Verbreiterung der Peaks, die Trennung wird nicht verbessert.

In den Fraktionen mit dem höchsten Neu5Ac-Gehalt ist nach der Gefriertrocknung selbst bei hochkonzentrierten Lösungen kein ATP mehr nachweisbar. Die isolierte Neu5Ac stimmt in ihren Eigenschaften mit der aus der Synthese im 300-g-Maßstab erhaltenen und mit kommerziellen Proben überein (vgl. oben). Aus der Produktlösung der Versuche zum kombinierten Einsatz der beiden Enzyme wurden mit Hilfe dieses Verfahrens 15 g Neu5Ac isoliert.

Auf Grund des niedrigen Vernetzungsgrades des Harzes kommt es bei der Verwendung eines Gradienten zu starken Volumenänderungen des Gelbettes. Diese wirken sich nachteilig auf die Stabilität der Säule und die Reproduzierbarkeit der Trennungen aus, so daß die Säule nach 2 bis 3 Läufen neu gepackt werden muß. Bei Verwendung des für Gradientenelution besser geeigneten Typs Dowex 1X8 (Scott, 1971) gelingt die Trennung nur mit sehr geringen Ameisensäurekonzentrationen, so daß die Neu5Ac in einem sehr großen Volumen anfällt. ATP und Neu5Ac werden auch hierbei sehr dicht nacheinander eluiert.

Eine Basislinientrennung der beiden Verbindungen wird erreicht, wenn an Stelle von Ameisensäure ihre Salze zur Elution verwendet werden, wie im folgenden beschrieben wird.

Elution mit Na^+ - oder NH_4^+ -Formiat

Am besten gelingt die Trennung von ATP und Neu5Ac, wenn mit Na^+ - oder NH_4^+ -Formiat eluiert wird. In Tab. 6.3-2 sind die Trennbedingungen aufgelistet; Abbildung 6.3-2 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm.

Austauscher	Dowex 1X8, Formiat-Form		
Korngröße	200 - 400 mesh, entspricht 37 - 74 μm		
Kapazität	1400	mval/L	Gel
Säulenvolumen	17,8	mL	
Säulenabmessungen	Länge 28 cm, $\varnothing$ 0,9 cm		
Probenvolumen	15,5	mL	
Flußrate Probenaufgabe	3,24	mL/h	
Flußrate H_2O	12	mL/h	
Flußrate NH_4HCOO	12	mL/h	
$[\text{NH}_4\text{HCOO}]$	1,5	M	(pH 6,0)

Tab. 6.3-2: Bedingungen zur Trennung von GlcNAc, ManNAc, Neu5Ac, Pyr und ATP mittels Anionenaustauschchromatographie

Wie auch bei der oben beschriebenen Trennung wird ein Teil des ATP zusammen mit den ungeladenen Verbindungen bzw. beim Spülen mit H_2O eluiert. Zur eindeutigen Identifizierung des ATP wurden neben der kontinuierlich gemessenen Extinktion bei 258 nm UV-Spektren der Fraktionen angefertigt. ATP wird nur beim Spülen mit Wasser sowie bei der Elution mit 1,5 M NH_4^+ -Formiat freigesetzt; die anderen Peaks in der Extinktionskurve werden durch die hohen Konzentrationen der gelösten Substanzen verursacht.

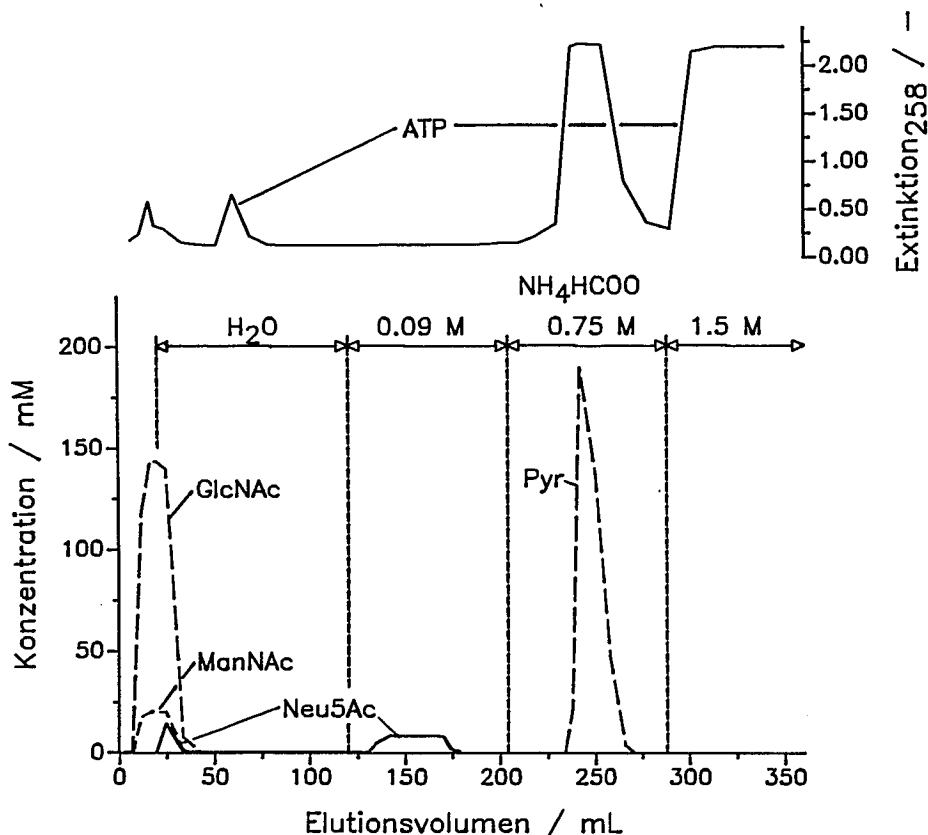


Abb. 6.3-2: Chromatogramm zur Produktisolierung mit einem stufenförmigen Ammoniumformiatgradienten; Säulenvolumen 17,8 mL

Zu diesem Verfahren ist folgendes anzumerken:

- Zur Elution kann entweder Na^+ - oder NH_4^+ -Formiat eingesetzt werden. Die Trennung ist in beiden Fällen gleich. NH_4^+ -Formiat hat den Vorteil, daß es im Vakuum flüchtig ist und so leicht entfernt werden kann.
- Das erhaltene Ammoniumsalz der Neu5Ac kann, sofern notwendig, durch Behandlung mit einem Kationenaustauscher in der H^+ -Form und anschließende Gefriertrocknung in die freie Säure überführt werden.
- Aufgrund der guten Stabilität der Säulenfüllung des höher vernetzten Anionenaustauschers Dowex 1X8 und der guten Trennung der Substanzen ist eine Übertragung der Trennung in den größeren Maßstab (Gelvolumina z.B. 100 mL oder 1 L) problemlos möglich.

6.4 Zusammenfassung

- Für die mit Hilfe der beschriebenen enzymatischen Verfahren hergestellte Neu5Ac (Einsatz der Neu5Ac-Aldolase allein und zusammen mit der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase) wurden leistungsfähige Methoden zur Produktisolierung mittels Anionenaustauschchromatographie entwickelt.
- Die aus ManNAc produzierten 250 g Neu5Ac wurden mit diesen Verfahren isoliert.
- Das isolierte Produkt stimmt in seinen Eigenschaften mit Literaturdaten und Referenzproben überein.
- Durch die Verwendung von flüchtigen Elutionsmitteln (Lösungen von Ameisensäure oder NH_4^+ -Formiat) fällt die Neu5Ac nach Gefriertrocknung in Reinform an.
- Durch die Verwendung von handelsüblichen, preiswerten Anionenaustauscherharzen sind die Verfahren auch im größeren Maßstab durchführbar.
- Da die Produktlösung aus dem Reaktor ohne weitere Vorbehandlung direkt auf die Säulen aufgegeben wird, ist eine quasi-kontinuierliche Produktaufreinigung möglich. Durch die Parallelschaltung mehrerer Säulen könnte zyklisch die Beladung, Elution und Regenerierung erfolgen. Als Regelkriterium für die Schaltung kann die Extinktion im UV-Bereich zusammen mit dem pH-Wert am Säulenauslauf verwendet werden.

7 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein enzymatisches Verfahren zur Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure entwickelt. Das erforderliche Substrat ManNAc kann entweder in vorgelagerten Arbeitsschritten hergestellt und isoliert werden (basenkatalysierte Epimerisierung) oder vorteilhaft *in situ* durch enzymatische Synthese erzeugt werden. Die durchgeführten reaktionstechnischen Untersuchungen und ihre Ergebnisse haben zur Entwicklung kontinuierlicher Verfahren geführt, mit denen die Verfügbarkeit von *N*-Acetylneuraminsäure verbessert werden kann (Kragl et al., 1989). Durch Modellrechnungen können günstige Prozeßbedingungen ermittelt werden, die aufgrund der komplexen Zusammenhänge auf rein experimentellem Wege nur in aufwendigen Versuchsreihen zu ermitteln wären.

Die Ergebnisse wurden im einzelnen bereits bei ihrer Darstellung diskutiert. In diesem Kapitel soll eine abschließende Bewertung unter folgenden Aspekten erfolgen:

- Vergleich der enzymatischen und basenkatalysierten Epimerisierung.
- Kostenbetrachtung.
- Anwendbarkeit der Ergebnisse auf weiterführende Arbeiten.

7.1 Vergleich der enzymatischen und basenkatalysierten Epimerisierung

Der Einsatz der Neu5Ac-Aldolase zusammen mit der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase ergibt einen besonders eleganten und zweckmäßigen Weg zur enzymkatalysierten Synthese von Neu5Ac. Das durch die Epimerase gebildete ManNAc wird ohne Isolierung direkt weiter zu Neu5Ac umgesetzt. Alternativ kann zur Gewinnung eines Gemisches der beiden Epimeren die basenkatalysierte Epimerisierung von GlcNAc verwendet werden (Spivak et al., 1959; Simon et al., 1988). Eine entsprechende Arbeitsvorschrift ist in Kap. 9.5 angegeben. Mit Hilfe der bekannten kinetischen Parameter der beiden Reaktionen soll versucht werden, ihre Leistungsfähigkeit zu bewerten. Für die Geschwindigkeit der ManNAc-Bildung durch die basenkatalysierte Epimerisierung (Gl. 7.1-1) wird ein Zeitgesetz erster Ordnung angenommen (Gl. 7.1-2).



$$v_4 = \frac{d[\text{ManNAc}]}{dt} = k_C * [\text{GlcNAc}] - k_B * [\text{ManNAc}] \quad (7.1-2)$$

mit:	v_4	kat/L	Reaktionsgeschwindigkeit der ManNAc-Bildung durch basenkatalysierte Epimerisierung
	k_C	1/s	Geschwindigkeitskonstante der GlcNAc-Epimerisierung
	k_B	1/s	Geschwindigkeitskonstante der ManNAc-Epimerisierung

Die Geschwindigkeit der Epimerisierung wächst mit steigendem pH (Lee, 1990).

Bei pH-Werten über 11 entstehen jedoch in zunehmendem Maß braungefärbte Zersetzungsprodukte. Für pH 12,3 (Lee, 1990) und pH 11 (eigene Messungen) wurden aus Konzentrations-Zeit-Kurven folgende Werte für k_c und k_B bestimmt:

- pH 11; 25 °C
 - $k_c = 4,27 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
 - $k_B = 21,2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
- pH 12,3; 25 °C
 - $k_c = 56,8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
 - $k_B = 165 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

Mit Hilfe dieser Werte wird für GlcNAc-Konzentrationen von 100 mM, 200 mM und 1 M nach Gl. 7.1-2 die Anfangsreaktionssgeschwindigkeit der Epimerisierung berechnet. Nach Gl. 4.3.2-2 werden die entsprechenden Werte für die enzymatische Epimerisierung berechnet. Abb. 7.1-1 stellt die erhaltenen Werte gegenüber:

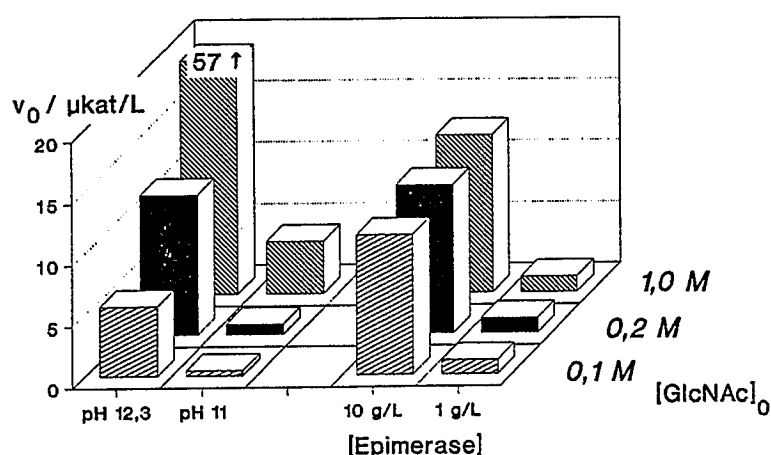


Abb. 7.1-1: Vergleich von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der basen- und enzymkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc bei verschiedenen Substrat- und Enzymkonzentrationen bzw. pH-Werten

- Für die basenkatalysierte Epimerisierung steigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit steigender GlcNAc-Konzentration an, während für die enzymkatalysierte Reaktion bereits bei 100 mM die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist.
- Durch Erhöhung der Enzymkonzentration kann die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion weiter vergrößert werden. Aus Darstellungsgründen wurde nur eine Epimerasekonzentration von 10 g/L verwendet. Bereits bei diesen Bedingungen ist die enzymatische Epimerisierung deutlich schneller als die basenkatalysierte bei pH 11.

Der Geschwindigkeitsvorteil der enzymatischen Reaktion besteht über den gesamten Umsatzbereich hinweg, wie aus Abb. 7.1-2 ersichtlich ist.

- Für die enzymatische Epimerisierung ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei 100 mM GlcNAc und 1 g/L sowie 10 g/L Epimerase gezeigt. Kurven für höhere Substratkonzentrationen verlaufen nahezu deckungsgleich mit den dargestellten.
- Für die basenkatalysierte Epimerisierung ist der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit für 100 mM und 1 M GlcNAc bei pH 11 dargestellt.
- Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Epimerisierung ist bei 10 g/L Enzym um den Faktor 3 größer als die der basenkatalysierten Reaktion.

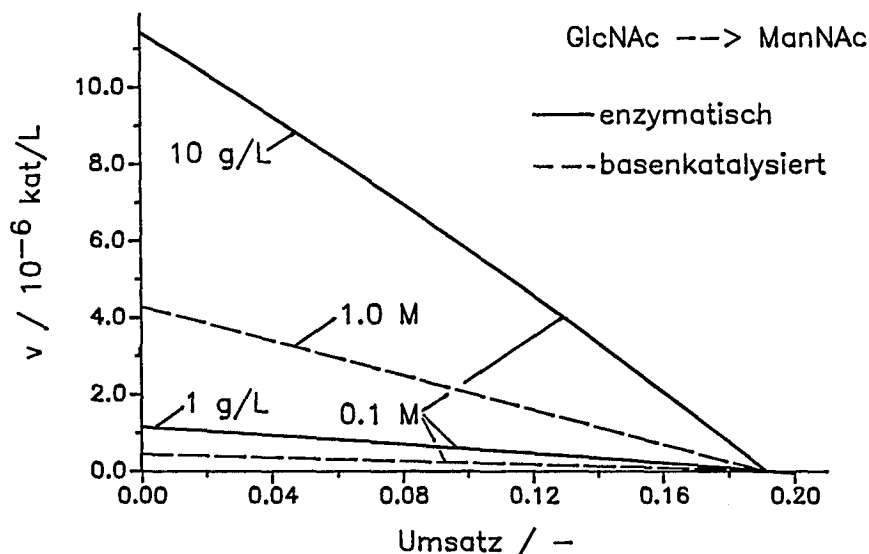


Abb. 7.1-2: Reaktionsgeschwindigkeiten der basen- und enzymkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc bei verschiedenen Substrat- und Enzymkonzentrationen

Eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit bedeutet, daß pro Zeiteinheit mehr Produkt gebildet wird. Dies soll an Hand von einigen Zahlen gezeigt werden. Würde man beide Reaktionen in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor durchführen, so ergäbe sich bei 12% Umsatz für 10 g/L Epimerase und 1 M GlcNAc bei $\tau = 4 \text{ h}$ eine Raum-Zeit-Ausbeute von 172 g/(L*d). Für die basenkatalysierte Reaktion ergäbe sich bei gleichen Bedingungen eine Raum-Zeit-Ausbeute von 6,4 g/(L*d), da zur Erzielung des gleichen Umsatzes eine sehr viel längere Verweilzeit notwendig ist.

Bei beiden Reaktionen läßt sich der GlcNAc-Umsatz über den thermodynamischen Gleichgewichtsumsatz hinaus steigern, indem das gebildete ManNAc entfernt wird. Im Fall der enzymatischen Epimerisierung erfolgt dies durch Umsetzung zu Neu5Ac unter Verwendung des gekoppelten Systems. Bei der basenkatalysierten Epimerisierung wird das ManNAc mit EtOH extrahiert und zurückgewonnenes GlcNAc erneut eingesetzt. Vergleicht man unter Berücksichtigung dieser beiden Aspekte experimentell gefundene Raum-Zeit-Ausbeuten, so ergibt sich:

- Bei Einsatz des gekoppelten Enzymsystems im Enzym-Membran-Reaktor wurde bei Substratkonzentrationen von 200 mM bei einer Verweilzeit von 3 h eine Raum-Zeit-Ausbeute 145,2 g/(L*d) ManNAc erhalten (vgl. Versuch Nr. 4 in Tab. 5.4.3-1 und 5.4.3-2). Berücksichtigt man nur das ManNAc, das weiter zu Neu5Ac reagiert ist, so liegt die Raum-Zeit-Ausbeute bei 118 g/(L*d).
- Für die basenkatalysierte Reaktion beträgt die Raum-Zeit-Ausbeute auf Grund der zahlreichen Aufarbeitungsschritte (vgl. Kap. 9.5) etwa 6 g/(L*d) (Simon et al., 1988; eigene Messungen).
- In beiden Fällen liegt der erreichbare Umsatz bezüglich des gebildeten ManNAc bei etwa 40%.
- Die Raum-Zeit-Ausbeute der basenkatalysierten Epimerisierung läßt sich leicht um den Faktor zwei bis drei steigern, wenn die Reaktion bei ca. 95% des erreichbaren Gleichgewichtsumsatzes abgebrochen wird. In Abb. 7.1-3 ist eine mit Hilfe der oben angegebenen kinetischen Daten berechnete Konzentrations-Zeit-Kurve für die basenkatalysierte Epimerisierung dargestellt. 95% des möglichen Gleichgewichtsumsatzes sind bereits nach 33 Stunden erreicht, was ungefähr der Hälfte der in der Literatur angegebenen Reaktionsdauer von drei Tagen entspricht (vgl. Kap. 9.5).

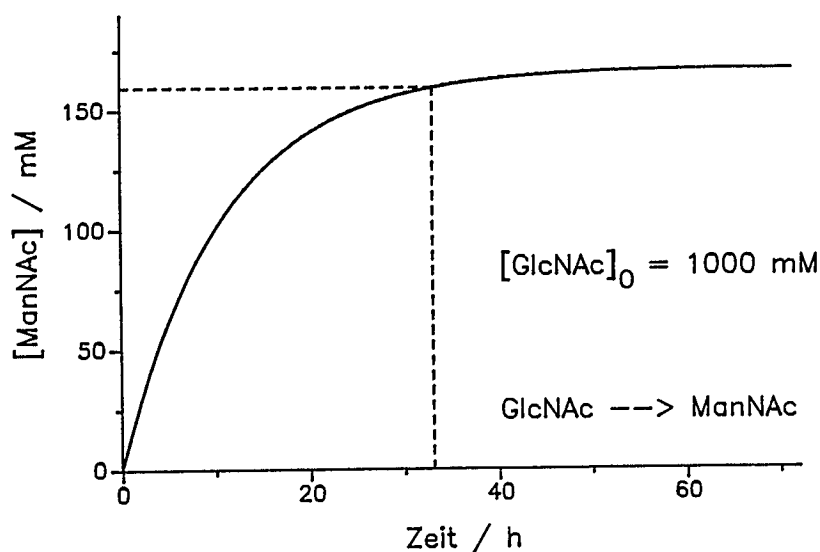


Abb. 7.1-3: Berechneter Konzentrations-Zeit-Verlauf der basenkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc; die gestrichelte Linie kennzeichnet 95% des möglichen Gleichgewichtsumsatzes
Bedingungen: $[GlcNAc]_0 = 1000 \text{ mM}$, pH 11, 25 °C

Damit erweist sich die enzymatische Epimerisierung als die leistungsfähigere Methode. Ihr Hauptvorteil liegt in der möglichen Kopplung der Epimerisierung mit der Neu5Ac-Synthese, so daß das gebildete ManNAc ohne Isolierung direkt umgesetzt wird. Einige zusätzliche Aspekte sollen abschließend behandelt werden:

- Entscheidend für die Anwendbarkeit des Verfahrens ist die Verfügbarkeit ausreichender Mengen *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase, die bisher aus Schweinen isoliert wird (Toyobo, 1989). Durch ein gezieltes Screeningprogramm müßten alternative (mikrobielle) Enzymquellen gefunden werden, aus denen ausreichende Mengen Epimerase isoliert werden können. Günstig wäre eine höhere massenspezifische Aktivität sowie der Verzicht auf Cofaktoren.
- Die Produktisolierung könnte durch die Verwendung von polymervergrößertem ATP vereinfacht werden, da es zusammen mit den Enzymen im Reaktor zurückgehalten werden kann.

Obwohl die enzymatische Epimerisierung günstiger ist, wurden in einem weiteren Produktionsversuch auf Grund der limitierten Enzymverfügbarkeit mit Hilfe der basenkatalysierten Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc etwa 680 g Neu5Ac hergestellt. Da dieser Versuch nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erfolgte, wird darauf nicht weiter eingegangen, zumal die hier beschriebenen Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt wurden. Einschließlich der Substratvorbereitung (ca. 2 Wochen; vgl. auch Kap 7.1) wurden für die Synthese der angegebenen Menge 4 Wochen benötigt (Reaktorvolumen 300 mL). Bei der Gewinnung der gleichen Menge aus natürlichen Quellen hätten dazu 10 kg chinesische Schwalbennester mit 300 L Säure hydrolysiert werden müssen (Czarniecki et al., 1977b) oder 1600 kg Hühnereiabfälle aufgearbeitet werden müssen (Juneja et al., 1991). Bei dem hier verwendeten Verfahren erfolgte die Epimerisierung im 10-L-Maßstab. Aus dem Enzym-Membran-Reaktor wurden 10 L Produktlösung mit einem Gehalt von etwa 0,2 M Neu5Ac erhalten. Auf Grund der kleineren Volumina sind die experimentellen Arbeiten wesentlich einfacher durchzuführen.

7.2 Kostenbetrachtung

An Hand von Katalog- und Bezugspreisen soll in Tab. 7.2-1 eine grobe Übersicht der Material- und Enzymkosten der enzymatischen Neu5Ac-Synthese gegeben werden. Zur Berechnung werden folgende Daten verwendet:

- Die experimentellen Daten stammen von Versuch Nr. 5 zum Einsatz des gekoppelten Enzymsystems. Die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 165 g/(L*d).
- Der jeweilige Enzymverbrauch wird unter Annahme einer Enzymdesaktivierung von 2%/d berechnet.
- Die Kosten für $MgCl_2$ sind vernachlässigbar.
- Bei der Berechnung der Substratkosten wird die Ausbeute von 33% berücksichtigt. Diese Kosten lassen sich durch eine Rückführung nicht umgesetzter Substrate reduzieren.
- Durch eine Konzentrationsverminderung lassen sich die ATP-Kosten um den Faktor 3 bis 5 vermindern.
- Die Gesamtkosten setzen sich aus den produktmengenspezifischen Enzym- und Cofaktorkosten und den molaren Substratkosten zusammen.

Substanz	DM/g	DM/mol bzw. DM/U
Materialpreise		
Neu5Ac (Fluka)	422,40	130 398
GlcNAc (Fluka)	0,977	215,92
(ManNAc (Sigma)	38,20	9129,80) ¹⁾
Na-Pyr (Fluka)	0,66	72,60
ATP (Fluka)	3070	2039,44
Aldolase (Seppim)	864,35	0,063 DM/U
Epimerase (Toyobo)	323,08	4,14 DM/U
Enzym- und Cofaktorkosten pro g bzw. mol gebildetes Produkt		
Aldolase (6,5 U/g) ²⁾	4,11	1270
Epimerase (0,2 U/g) ²⁾	8,22	2540
ATP	0,47	145,20
Summe	12,80	3955,20
Gesamtkosten der Neu5Ac-Synthese	15,60	4821,00

Tab. 7.2-1: Aufstellung zur Kostenübersicht der enzymatischen Neu5Ac-Synthese nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren.

¹⁾ ManNAc-Kosten gehen in die Berechnung nicht mit ein; der Preis ist nur der Vollständigkeit halber angegeben. ²⁾ In Klammern der berechnete produktmengenspezifische Enzymverbrauch.

Bedingungen: [GlcNAc]₀ = 221 mM; [Pyr]₀ = 202 mM; [Epi] = 21 g/L; [Ald] = 3,9 g/L; [ATP] = 5 mM; U_{Pyr} = 0,33; Raum-Zeit-Ausbeute = 165 g/(L*d);

Die Material- und Enzymkosten der enzymatischen Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren betragen etwa 4% des Katalogpreises für Neu5Ac.

Durch die basenkatalysierte Epimerisierung lassen sich die Enzymkosten für die Epimerase einsparen. Da sie jedoch batchweise durchgeführt wird, ist stattdessen ein größerer Arbeitsaufwand erforderlich.

In Abb. 7.2-1 sind die prozentualen Anteile der einzelnen Posten an den Gesamtkosten dargestellt.

- Den größten Anteil mit 53% hat die *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase, gefolgt von der Neu5Ac-Aldolase mit 27%.

- Die Substratkosten machen insgesamt 20% aus, wobei mögliche Rezyklierungen noch nicht berücksichtigt sind.

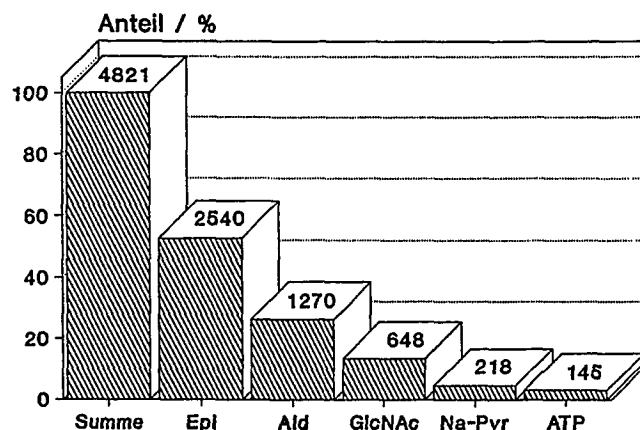


Abb. 7.2-1: Aufteilung der Kosten pro mol produzierter Neu5Ac auf die Enzym- und Substratkosten; die Zahlen auf den Balken geben die absoluten Kosten in DM an (vgl. Tab. 7.2-1)

7.3 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zur Neu5Ac-Synthese ausgehend von GlcNAc unter Verwendung des gekoppelten Enzymsystems aus *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase und Neu5Ac-Aldolase entwickelt. Durch eine umfassende Untersuchung der thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften der Einzelsysteme und des Gesamtsystems konnten optimale Reaktionsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese ermittelt werden. In ihrer Gesamtheit gelten die Daten natürlich nur für dieses untersuchte System.

Für andere Reaktionen können jedoch relativ einfach in analoger Weise kinetische und thermodynamische Daten gewonnen werden. Dies ist besonders für die Neu5Ac-Aldolase von Interesse, die auf Grund der möglichen Variation der Carbonylkomponente ein breites synthetisches Potential besitzt (Augé et al., 1990a; Bednarski et al., 1987; Kim et al., 1988; Simon et al., 1988).

Als ein Beispiel sei hier die Umsetzung von D-Arabinose mit Brenztraubensäure zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonsäure (KDO) genannt. Bei dieser Reaktion wurde zum erstenmal eine Diastereoselektivität von unter eins für die Neu5Ac-Aldolase beobachtet (Augé et al., 1989), da ein Gemisch der beiden Epimeren erhalten wird (Abb. 7.3-1). KDO ist ein wesentlicher Bestandteil der Core-Region von Lipopolysacchariden in der Zellwand gram-negativer Bakterien (Schlegel, 1985). KDO-Derivate könnten als Inhibitoren der Lipopolysaccharidsynthese Anwendung als Antibiotika finden.

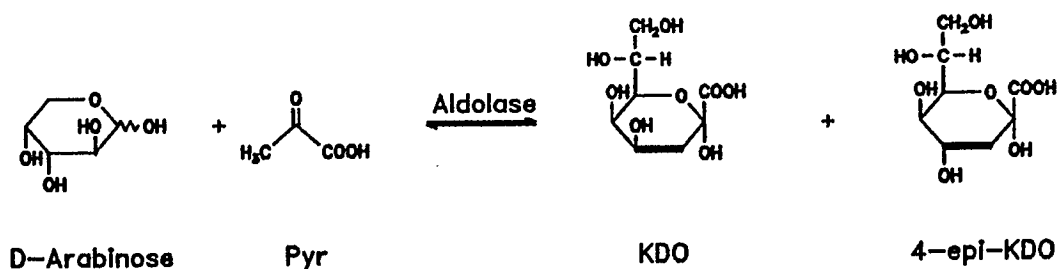


Abb. 7.3-1: Enzymatische Synthese von 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosensäure (KDO) mittels Neu5Ac-Aldolase; die gebildete Bindung ist fett gedruckt

Durch kinetische Untersuchungen gelang es, die Selektivität der KDO-Synthese von 0,44 (Augé et al., 1989) auf über 0,8 zu steigern (Gödde, 1990). Die Ausbeute an KDO kann vor allem durch folgende Maßnahmen gesteigert werden:

- Verwendung eines Arabinose-Überschusses an Stelle eines Pyr-Überschusses.
- Einsatz hoher Enzymkonzentrationen von bis zu 10 g/L; hier erweist sich die Verwendung des nativen Enzyms im Enzym-Membran-Reaktor als vorteilhaft, da damit höhere volumenspezifische Aktivitäten als mit dem trägerfixierten Enzym erreicht werden können.

"L'imagination est plus importante que le savoir."

<A. Einstein>

8 Zusammenfassung

- Erstmalig wurde im Rahmen dieser Arbeit *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) ausgehend von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) mit Hilfe des gekoppelten Enzymsystems aus *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase und *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase im kontinuierlichen Prozeß hergestellt. Das durch die Epimerase gebildete *N*-Acetylmannosamin wird ohne Isolierung direkt weiter zu Neu5Ac umgesetzt.
- Aufgrund ähnlicher pH- und Temperaturoptima lassen sich beide Enzyme zusammen im Enzym-Membran-Reaktor einsetzen.
- Für beide Enzyme wurden zum ersten Mal alle kinetischen Parameter zur Beschreibung des Einflusses aller Reaktanden ermittelt. Die Viskosität des Reaktionsmediums und die Mutarotation der Kohlenhydrate wurden als weitere Einflußgrößen untersucht.
- Die verwendeten kinetischen Modelle beschreiben sowohl die Kinetik als auch die Gleichgewichtslage der Einzelreaktionen und der Gesamtreaktion mit guter Genauigkeit.
- Durch Modellrechnungen konnten günstige Betriebsbedingungen für die Neu5Ac-Synthese ausgehend von ManNAc und unter Verwendung des gekoppelten Enzymsystems ausgehend von GlcNAc ermittelt werden. Die Modellrechnungen wurden experimentell bestätigt.
- Ausgehend von ManNAc wurden 250 g Neu5Ac mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 650 g/(L*d) produziert. Das im Unterschuß eingesetzte ManNAc wurde zu 80% umgesetzt.
- In einem weiteren Produktionsversuch wurden ca. 680 g Neu5Ac hergestellt (vgl. Kap. 7). Als Substratlösung wurde eine aus der basenkatalysierten Epimerisierung erhaltene Lösung von ManNAc und GlcNAc verwendet. Das im Unterschuß eingesetzte ManNAc wurde zu 80% umgesetzt.
- Ausgehend von GlcNAc wurden bei Einsatz des gekoppelten Enzymsystems bei äquimolaren Substratkonzentrationen Raum-Zeit-Ausbeuten bis zu 165 g/(L*d) bei einem Umsatz von 33% erzielt.
- Bei der Festlegung der Reaktionsbedingungen wurde auf eine möglichst einfache Produktisolierung geachtet. Auf den Einsatz von Puffersubstanzen konnte vollständig verzichtet werden. Für beide Verfahrensalternativen wurden geeignete Methoden zur Produktisolierung mittels Anionenaustauschchromatographie entwickelt.
- Die geringe massenspezifische Aktivität der Epimerase kann bei Verwendung des gekoppelten Enzymsystems durch höhere Aldolasekonzentrationen ausgeglichen werden, da der Umsatz nur in geringem Maße vom Aktivitätsmolenbruch abhängt.
- Durch Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten und der erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeuten wurden die Vorteile der enzymkatalysierten gegenüber der basenkatalysierten Epimerisierung zur ManNAc-Synthese aufgezeigt.

9 Material und Methoden

Wichtige Aspekte zur Durchführung der Experimente wurden bereits bei der Darstellung der Ergebnisse behandelt. In diesem Kapitel werden neben den analytischen Methoden detaillierte Vorschriften zur Entsalzung der Epimerase und zur basenkatalysierten Epimerisierung gegeben.

9.1 Analytische Methoden

9.1.1 Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der Durchführung von kinetischen Messungen und zur Überwachung kontinuierlicher Prozesse muß eine große Anzahl Proben innerhalb kurzer Zeit untersucht werden. Hierzu bieten sich HPLC-Methoden an, da sie ohne aufwendige Probenvorbereitung auskommen. Während früher vornehmlich Farbttests zur Quantifizierung von Sialinsäuren benutzt wurden (Araki et al., 1984; Schauer, 1982b, 1987), finden sich in der Literatur inzwischen zahlreiche Arbeiten über den Einsatz der HPLC zur Bestimmung von Sialinsäuren und Kohlenhydraten. Dabei werden entweder Aminophasen (Bergh et al., 1981), Anionenaustauscher (Shukla et al., 1986; Holzhauser et al., 1988; Lee, 1990) oder Kationenaustauscher (Silver et al., 1981; Honda et al., 1984; Bio-Rad, 1991) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kationenaustauschersäule des Typs Aminex HPX-87H der Firma Bio-Rad verwendet. Die Auswahl der Säule erfolgte im Hinblick auf die mögliche Trennung der beiden Epimeren ManNAc und GlcNAc, die z. B. auf Aminophasen nicht erreicht werden konnte. Abbildung 9.1.1-1 zeigt ein typisches Chromatogramm. In Tab. 9.1.1-1 sind die Bedingungen aufgelistet. Die Basislinientrennung von ManNAc und GlcNAc wird durch die Hintereinanderschaltung von zwei Säulen erreicht. Oxalsäure dient als interner Standard.

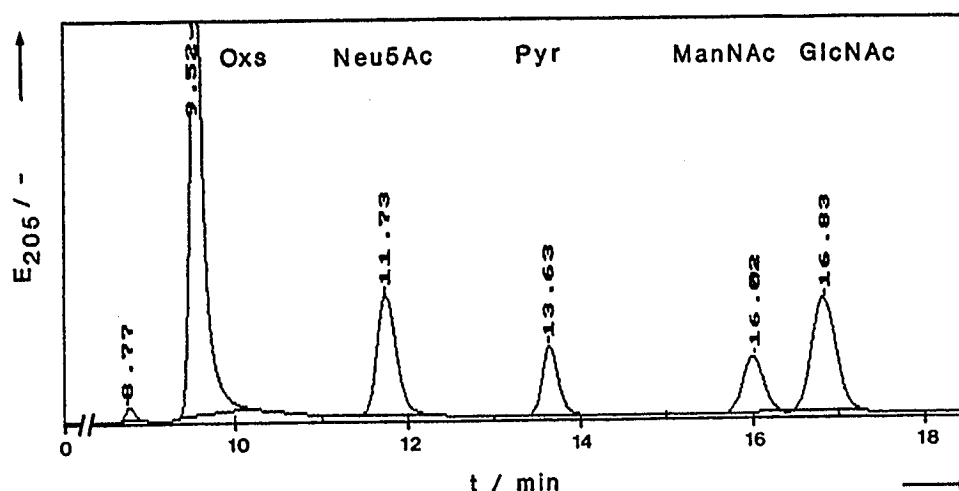


Abb. 9.1.1-1: HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Neu5Ac, Pyr, ManNAc und GlcNAc; Oxs = Oxalsäure; Bedingungen vgl. Tab. 9.1.1-1

Säule	Aminex HPX-87H, 2 * 300*7,8 mm
Vorsäule	Cation H ⁺ Cartridge, 30 * 4,6 mm
Eluent	0,006 M H ₂ SO ₄
Flußrate	0,8 mL/min
Temperatur	65 °C
Detektion (UV)	205 nm

Tab. 9.1.1-1: Bedingungen zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC

- Mit dieser Methode können Konzentrationen im Bereich von 0,2 bis 5 mM bestimmt werden.
- Die enzymatische Reaktion wird durch Verdünnen mit 0,1 M H₂SO₄ abgestoppt, der als interner Standard Oxalsäure zugesetzt ist.
- Eine gesonderte Proteinentfernung wurde nicht durchgeführt. Etwa alle drei Monate mußte die Vorsäule ersetzt werden, was sich durch Druckanstieg und nachlassende Trennleistung (Peaktailing) bemerkbar machte.
- Bei der Chromatographie von Verbindungen auf derartigen Kationenaustauschersäulen kommt es zu einer Überlagerung mehrerer Mechanismen, von denen die zwei wichtigsten kurz diskutiert werden sollen (Bio-Rad, 1991). Die Trennung von Neu5Ac und Pyr beruht auf einem Siebeffekt wie bereits bei der Produktaufarbeitung beschrieben wurde. Die kleinere Brenztraubensäure kann in das Innere der Ionenaustauschermatrix eindringen und wird daher später eluiert als Neu5Ac. Ähnliches gilt für die Oxalsäure. Die ungeladenen Zucker können auf Grund des "Donnan"-Ausschlusses (vgl. Kap. 6.2) leichter in das Korninnere diffundieren als geladene Teilchen und werden daher als letztes eluiert.

Weitere Komponenten, die sich mit Hilfe der benutzten Säule trennen lassen, sind in Tab. 9.1.1-2 mit Angabe der Retentionszeiten aufgelistet. Teilweise erfolgt die Detektion mit einem RI-Detektor.

HCOOH	19,7	min	
Milchsäure	18,8	min	
D-Arabinose	15	min	(RI)
KDO	11,0	min	(RI)
4-epi-KDO	11,4	min	(RI)

Tab. 9.1.1-2: Retentionszeiten weiterer auf der HPLC getrennter Substanzen

9.1.2 Gaschromatographie

Gaschromatographische Methoden wurden nur zur Überprüfung der Reinheit von Substraten und Produkten benutzt. Da Zucker nicht flüchtig sind, müssen sie durch Derivatisierung in GC-gängige Verbindungen überführt werden. Dazu werden in der Regel Silylverbindungen benutzt. Eine Übersicht findet sich in folgenden Stellen: Sweeley et al., 1963; Leibnitz, 1984; Schauer, 1987.

Als bestes Reagenz für die Silylierung hat sich ein Gemisch aus Hexamethyldisilazan (HMDS) und Trimethylchlorsilan (TMCS) in Pyridin erwiesen. Stärkere Silylierungsmittel wie z.B. *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) reagieren nicht nur mit den OH-Gruppen, sondern teilweise auch mit der Acetamidogruppe, wodurch keine einheitlichen Reaktionsprodukte entstehen.

Die Derivatisierung von Proben wurde folgendermaßen durchgeführt (Reuter et al., 1986):

- 1 mg Substanz (Feststoff)
700 µL Pyridin
150 µL Hexamethyldisilazan
150 µL Trimethylchlorsilan
- Reaktionszeit ca. 2 Stunden

Die Trennbedingungen sind in Tab. 9.1.2-1 angegeben, in Tab. 9.1.2-2 finden sich die Retentionszeiten.

Säule:	OV-1 Permaabond, 25 m * 0,25 mm	(Macherey & Nagel)
Trärgas He	30	cm/s
Split	1:50	
Injektor	250	°C
Detektor (FID)	250	°C
Temperaturprogramm zur Trennung von		
Neu5Ac, ManNAc	150 - 250 °C, 4 °C/min	
GlcNAc	140 - 180 °C, 1 °C/min	

Tab. 9.1.2-1: Trennbedingungen für die GC-Analytik

Neu5Ac	22	min
α-GlcNAc	43,1	min
β-GlcNAc	43,5	min
α-ManNAc	11,7	min
β-ManNAc	13,3	min

Tab. 9.1.2-2: Retentionszeiten zur GC-Analytik

9.1.3 Mg^{2+} -Bestimmung

Eriochromschwarz T bildet mit Mg^{2+} Komplexe, deren Zusammensetzung pH-Wert abhängig ist. Dabei erfolgt ein Farbwechsel von blau nach lila, der photometrisch bei 530 nm verfolgt werden kann. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,02 mM Mg^{2+} .

Die Bestimmung wird in leichter Abänderung der in der Literatur gegebenen Vorschrift (Onishi, 1989) folgendermaßen durchgeführt:

- Als Pufferlösung wird eine Lösung von 1 g NH_4Cl in 50 mL 25%igem Ammoniakwasser und 50 mL H_2O verwendet.
- Die Reagenzlösung besteht aus 100 mg Eriochromschwarz T gelöst in 100 mL Methanol. Eine entsprechende Menge dieser Lösung wird täglich frisch 1:10 mit Methanol verdünnt.
- Ansatz:
 - 1,50 mL Probe
 - 0,25 mL Pufferlösung
 - 0,50 mL verdünnte Reagenzlösung
 - 0,25 mL H_2O
- Die Messung der Extinktion erfolgt bei 530 nm in 1 cm Küvetten. Das Farbmaximum wird nach 30 min erreicht und bleibt etwa 60 min stabil. Die Konzentrationsermittlung erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve.

9.1.4 Verschiedenes

- ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden in der Zentralanalytik des Institutes für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.
- Elementaranalysen wurden in der Zentralabteilung für Chemische Analysen des Forschungszentrums Jülich angefertigt.
- Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Bradford (1976) mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G 250, dessen Absorptionsmaximum sich durch Bindung an ein Protein von 465 nach 595 nm verschiebt. Als Reagenz dient eine Lösung von 100 mg des Farbstoffes in 50 mL EtOH, die mit 100 mL 85%iger H_3PO_4 und H_2O auf 1 L aufgefüllt wird. Zur Messung werden 100 μL Probe und 900 μL des Reagenzes zusammengegeben. Nach 10 min wird die Extinktion bestimmt und aus einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve die Proteinkonzentration ermittelt.

9.2 Entsalzung der *N*-Acylglucosamin 2-Epimerase

Für die Entsalzung wurden fertig gepackte Einmalsäulen des Typs PD-10 der Firma Pharmacia benutzt (Gelvolumen 9,1 mL). Die Trennung von Protein und Begleitmaterialien erfolgt dabei durch Gelfiltration, wobei das verwendete Material eine Ausschlußgrenze von 5000 u besitzt.

Die Entsalzung wird folgendermaßen durchgeführt:

- Die Säule wird mit 25 mL des gewünschten Puffers äquilibriert. Hier wurde Phosphatpuffer, hergestellt durch Titration von 20 mM KH_2PO_4 auf pH 7,5, verwendet.
- 25 mg der Epimerasepräparation werden in 2,5 mL Puffer gelöst und auf die Säule gegeben.
- Die Epimerase wird durch Aufgabe von 3,5 mL Puffer eluiert und direkt für kinetische Messungen verwendet.

9.3 Struktur des verwendeten PEG-ATP

In Abbildung 9.3-1 ist die Struktur des verwendeten PEG-ATP dargestellt. Es ist das gleiche Derivat, das beim Einsatz zusammen mit einer Hexokinase zur Synthese von Glucose-6-phosphat die beste Aktivität zeigte (Berke, 1984; Berke et al., 1988).

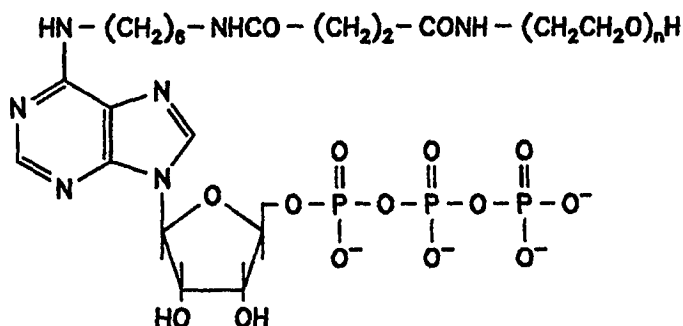


Abb. 9.3-1: Struktur des mit der Epimerase verwendeten PEG-ATP

Die Synthese des PEG-ATP erfolgt ähnlich der Synthese von PEG-NADH und ist in folgenden Literaturstellen beschrieben: Berke, 1984; Bückmann et al., 1981. Das hier verwendete polymervergrößerte ATP stammt aus der Arbeit von Berke und sollte auf Grund der zur Verfügung stehenden Menge nur dazu dienen, den möglichen Einsatz des polymervergrößerten Cofaktors aufzuzeigen.

9.4 Anlage zur Produktisolierung

Abbildung 9.4-1 zeigt das Fließbild der Anlage zur Produktaufreinigung, die für alle verwendeten Säulengrößen (Gelvolumen 14 mL bis 981 mL) identisch ist.

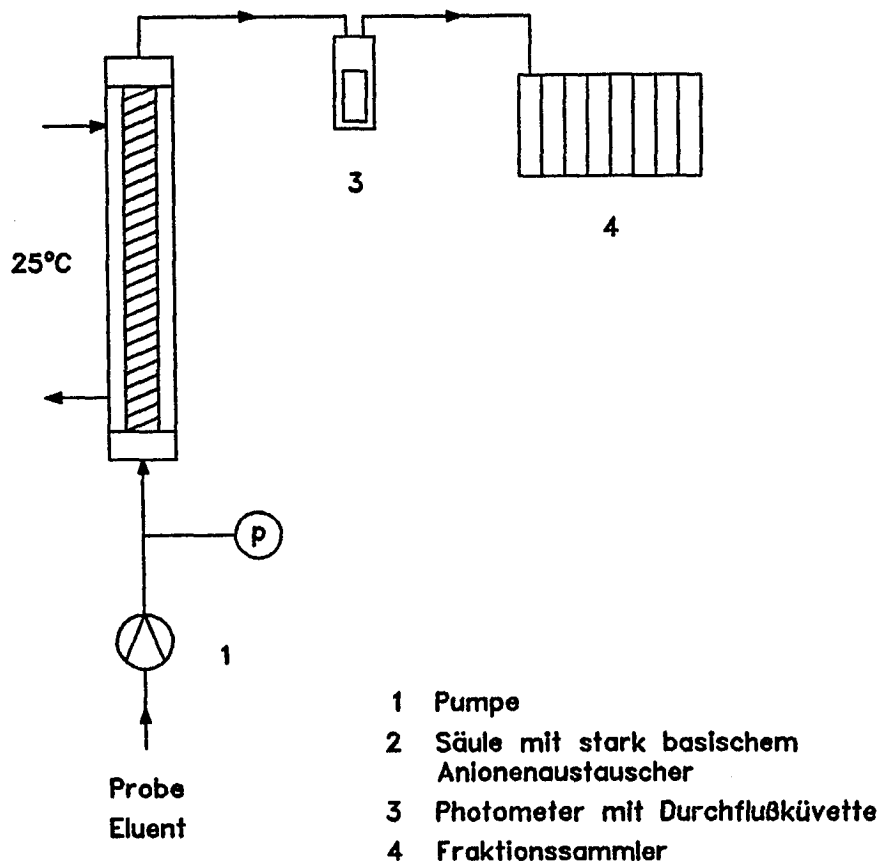


Abb. 9.4-1: Fließbild der Anlage zur Produktaufreinigung

- Zur Probenaufgabe wurde eine totvolumenarme Schlauchpumpe verwendet.
- Die isokratische Elution erfolgte mit einer Wechselkolbenpumpe.
- Bei den Gradientenverfahren wurde eine Anlage zur Mitteldruckchromatographie der Firma Pharmacia verwendet, die aus einem Controller, zwei Wechselkolbenpumpen und einer Mischkammer besteht.
- Mit Hilfe des Photometers kann durch Messung der Extinktion bei 205 nm der Verlauf der einzelnen Schritte (Aufpumpen, Spülen mit Wasser, Elution) verfolgt werden. Die Konzentrationsbestimmung in den gesammelten Proben erfolgte mittels HPLC.
- Bei Versuchen zur Abtrennung von ATP wurde mit einem zweiten Photometer oder einem Dioden-Array-Detektor die Extinktion bei 258 nm aufgezeichnet, die einen Hinweis auf den Zeitpunkt der Elution von ATP gibt.

Vorbereiten des Anionenaustauschers

Handelsübliche Anionenaustauscher werden meistens in der Chlorid-Form geliefert und müssen vor der Anwendung in die gewünschte Form überführt werden. Dazu wird das Harz nach dem Vorquellen in Wasser in mehreren Schritten mit ca. dem fünffachen Volumen 1 M Ameisensäure behandelt (Cooper, 1981).

Nach dem Füllen der Säule wird mit Wasser die Ameisensäure ausgewaschen (pH-Kontrolle). Mit Silbernitratlösung wird auf Chloridionen geprüft. Der in der Literatur empfohlene Zwischenschritt zur Überführung des Austauschers in die OH-Form mit 1 M NaOH wurde nicht durchgeführt, da es zu einer Dunkelfärbung des Harzes und der Freisetzung von Aminen kam. Die Freisetzung von Aminen trat bei Anionenaustauschern anderer Hersteller bereits beim Stehen mit Wasser auf.

9.5 Basenkatalysierte Epimerisierung von GlcNAc zu ManNAc

Die basenkatalysierte Epimerisierung von GlcNAc zur ManNAc wurde nach der von Simon et al., 1988, gegebenen Vorschrift durchgeführt, die folgende Arbeitsschritte enthält:

- 1 kg GlcNAc (4,5 mol) in 4,5 L H₂O lösen.
- Mit 10 M NaOH auf pH 11 einstellen und 3 Tage bei Raumtemperatur rühren.
- Die erhaltene gelbe Lösung mit konz. HCl neutralisieren und im Vakuum zur Trockne einrotieren.
- Den Rückstand mit 4 L siedendem EtOH behandeln, in dem sich GlcNAc schlechter als ManNAc löst.
- Die ethanolsche Lösung abkühlen und vom Niederschlag abfiltrieren; EtOH im Vakuum abziehen.
- Es werden 143 g des Epimerengemisches mit 88% ManNAc erhalten.
- Das zurückgewonnene GlcNAc wird erneut eingesetzt.
- In 3 Ansätzen wurden insgesamt 462 g mit einem ManNAc-Gehalt von 88% erhalten.
- Zur Entfernung von EtOH wird zweimal in H₂O gelöst und lyophilisiert.
- Aus der Reaktionszeit von je 3 Tagen und einem geschätzten Zeitbedarf für die Aufarbeitung von je 1 Tag errechnet sich eine Raum-Zeit-Ausbeute von 6 g/(L*d). Die Gesamtausbeute an ManNAc beträgt 41%.

Die Ergebnisse konnten bei eigenen Ansätzen sowohl im kleineren wie auch im größeren Maßstab bestätigt werden. Die Reaktionszeiten wurden ebenfalls übernommen, obwohl deutlich kürzere Zeiten ausreichend sind, um nahezu den Gleichgewichtsumsatz zu erreichen. Eigene Ausbeuten lagen bei 39%, die berechnete Raum-Zeit-Ausbeute liegt bei 5,2 g/(L*d). Gegenüber der Literaturvorschrift wurde am Ende zusätzlich mit Aktivkohle entfärbt, da bei der Epimerisierung braun gefärbte Substanzen entstehen, die jedoch unter der Nachweisgrenze der HPLC liegen.

9.6 Liste der verwendeten Geräte und Chemikalien

Analytik

Differential-Refraktometer, Nr.98.00,	Knauer, Berlin
Heizofen für HPLC-Säule, Nr. 89.00	
760 Series Interface, Integrations- software	Nelson Analytical, Wuppertal
2150 HPLC-Pumpe, 2151 UV-variable wavelength monitor, 2152 LC- Controller, 2157 Autosampler, pH- Durchflußelektrode	Pharmacia LKB GmbH, Freiburg
HPLC-Säule Aminex HPX-87H mit Vorsäule	Bio-Rad, München
Entgaser Degasser ERC-3310	ERC, Altglofsheim
Rechner IBM AT02	IBM Corp. USA
Gaschromatograph 438 A	Chrompack, Middelburg, NL
Polarimeter 241 MC	Perkin-Elmer, Überlingen
Spectrophotometer UV 150-02, UV 160	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Rheometer Rotovisco RV 100	Haake GmbH, Karlsruhe
pH-Meßgeräte (pH-Meter 632)	Metrohm, Filderstadt
pH-Elektroden	Ingold Meßtechnik GmbH, Steinbach

Kontinuierliche Produktionsanlage und Produktaufarbeitung

Ultrafiltrationsflachmembran Minisette OMEGA 5K	Filtron GmbH, Karlstein
Schlauchpumpe Minipuls 2	Gilson Medical Electronics, Villiers-le- Bel, France
Piezoresistiver Absolutdruckaufnehmer 4043A10 mit Verstärker 4610 A	Kistler Instruments GmbH, Ostfildern- Nellingen
Teflonschläuche, Anschlüsse, Chroma- tographiesäulen mit Thermostatisier- mantel	Latek, Heidelberg
2-Kanalflachschreiber LS-52-2	Linseis GmbH, Selb
Compactthermostat CS 6	MGW Lauda Wobster KG, Königshofen
Fraktionssammler FRAC-100, Fraktionssammler 2070 Ultrorac II, LC-Controller 500, Wechselkolben- pumpe P-500, LC-Leersäule XK 50/60	Pharmacia LKB GmbH, Freiburg
Wechselkolbenpumpe LDP-21	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Glas-Vakuumfiltrationsgerät, Sterilfilter- halter	Sartorius, Göttingen
Schlauchpumpe 501 U	Watson-Marlow Ltd., Falmouth, GB
Ultrafiltrationsmembran YM 5	Amicon GmbH, Witten
Verderpren-Pumpenschlauch	Verder-GmbH, Düsseldorf

Blasenfalle, Druckaufnehmerhalter,
Glasteile für den Reaktor, Enzym-
Membran-Reaktoren
Lyophilisator Lyovac GT 2, GT 20

Werkstätten des Forschungszentrums,
Jülich

Leybold Haereus AG, Hanau

Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Peressigsäure
Na-Pyruvat, Neu5Ac, ATP, Kalium-
gluconat, Bernsteinsäureanhydrid, 2-
Methylbuttersäure, Ammoniumformiat,
Trimethylchlorsilan, Coomassie
Brilliantblau G 250
PEG-ATP
PEG 400
HMDS, MSTFA
Titrisol Oxalsäurelösung, Titrisol
Schwefelsäure, Aktivkohle, Rinder-
serumalbumin, Glycerin, EtOH,
Pyridin, H_3PO_4 , KH_2PO_4 ,
 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, NaOH, NaCl,
 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, NaN_3
PD 10-Säule zur Entsalzung
Ameisensäure
N-Acetyl-D-Mannosamin, N-Acetyl-
D-Glucosamin
Anionenaustauscher Dowex 1x2, 1x8
N-Acetylneuraminsäure-Aldolase
N-Acylglucosamin 2-epimerase

Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

GBF, Braunschweig-Stöckheim
Hüls, Marl
Macherey-Nagel, Düren
Merck, Darmstadt

Pharmacia LKB GmbH, Freiburg
Riedel-de-Haen, Seelze
Rütgers-BioTech, Mannheim

Serva, Heidelberg
Toyobo, Osaka, Japan, Bezug über
Seppim, Sées, France
Toyobo, Osaka, Japan

10 Literatur

- Air, G. M.; Laver, W. G.; 1989: The neuraminidase of influenza virus
Proteins: Structure, Function, and Genetics 6, 341-356
- Aisaka, K.; Tamura, S.; Arai, Y.; Uwajima, T.; 1987: Hyperproduction of *N*-acetylneuraminate lyase by the gene-cloned strain of *Escherichia coli*
Biotechnol. Lett. 9, 633-637
- Aisaka, K.; Igarashi, A.; Yamaguchi, K.; Uwajima, T.; 1991: Purification, crystallization and characterization of *N*-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*
Biochem. J. 276, 541-546
- Angyal, S. J.; 1984: The composition of reducing sugars in solution
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 42, 15-68
- Anonymus; 1991: Tris-Puffer ist kein inertes Medium
Nachr. Chem. Tech. Lab. 39, 502
- Appel, P.; 1990: Reaktionstechnische Untersuchung zur enzymkatalysierten Produktion von *N*-Acetylneuraminsäure
Diplomarbeit Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
- Araki, H.; Yamada, M.; 1984: Sialic acid
in H. U. Bergmeyer (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis Vol. 6
Verlag Chemie, Weinheim, 80-90
- Armstrong, D. W.; Jin, H. L.; 1989: Liquid Chromatographic Separation of Anomeric Forms of Saccharides With Cyclodextrin Bonded Phases
Chirality 1, 27-37
- Augé, C.; David, S.; Gautheron, C.; 1984: Synthesis with immobilized enzyme of the most important sialic acid
Tetrahedron Lett. 25, 4663-4664
- Augé, C.; Bouxom, B.; Cavayé, B.; Gautheron, C.; 1989: "Scope and limitations of the aldol condensation catalyzed by immobilized acetylneuraminate pyruvate lyase"
Tetrahedron Lett. 30, 2217-2220
- Augé, C.; Gautheron, C.; David, S.; Malleron, A.; Cavayé, B.; Bouxom, B.; 1990a: Sialyl aldolase in organic synthesis: from the trout egg acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (KDN), to branched-chain higher ketoses as possible new chirons
Tetrahedron 46, 201-214
- Augé, C.; Fernandez-Fernandez, R.; Gautheron, C.; 1990b: The use of immobilised glycosyltransferases in the synthesis of sialyloligosaccharides
Carbohydr. Res. 200, 257-268
- Barbas, C. F.; Wang, Y.-F.; Wong, C.-H.; 1990: Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a synthetic catalyst
J. Am. Chem. Soc. 112, 2013-2014
- Barker, S.A.; Hatt, B.W.; Kennedy, J.F.; Somers, P.J.; 1969: Separations of carbohydrates based on ion exclusion and gel permeation
Carbohydr. Res. 9, 327-334

- Barrow, G. M.; 1977: Physikalische Chemie Teil 3: Mischphasenthermodynamik, Elektrochemie, Reaktionskinetik
Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 3. Auflage
- Baumann, W.; Freidenreich, J.; Weisshaar, G.; Brossmer, R.; Friebolin, H.; 1989: Spaltung und Synthese von Sialinsäuren mit Aldolase; ^1H -NMR-Untersuchungen zur Stereochemie, zur Kinetik und zum Mechanismus
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 370, 141-149
- Baumberger, F.; Vasella, A.; 1986: Synthesis of *N*-acetylneuraminic acid and *N*-acetyl-4-epineuraminic acid
Helv. Chim. Acta 69, 1205-1215
- Bednarski, M. D.; Chenault, H. K.; Simon, E. S.; Whitesides, G. M.; 1987: Membrane-enclosed enzymatic catalysis (MEEC): a useful, practical new method for the manipulation of enzymes in organic synthesis
J. Am. Chem. Soc. 109, 1283-1285
- Behr, J.-P.; Lehn, J.-M.; 1972: Stability constants for the complexation of alkali and alkaline-earth cations by *N*-acetyl-neuraminic acid
FEBS Lett. 22, 178-180
- Beilstein; 1979: Brenztraubensäure
E IV 3, Springer Verlag, Berlin, 1505-1510
- Beisswenger, R.; Snatzke, G.; Thiem, J.; Kula, M.-R.; 1991: Enzyme-catalyzed aldol reactions with 3-hexulose phosphate synthase
Tetrahedron Lett. 32, 3159-3162
- Bergh, M. L. E.; Koppen, P.; van den Eijnden, D. H.; 1981: High-pressure liquid chromatography of sialic acid-containing oligosaccharides
Carbohydr. Res. 94, 225-229
- Berke, W.; 1984: Kontinuierliche Regenerierung von ATP für enzymatische Synthesen
Dissertation, TU Berlin; Jül-Spez-271
- Berke, B.; Schütz, H.-J.; Wandrey, C.; Morr, M.; Denda, G.; Kula, M.-R.; 1988: Continuous regeneration of ATP in enzyme membrane reactor for enzymatic syntheses
Biotech. Bioeng. 32, 130-139
- Binkley, R. W.; 1988: Modern carbohydrate chemistry
Marcel Dekker, Inc., New York
- Bio-Rad; 1982: Ion Exchange Manual
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Bio-Rad; 1991: HPLC columns - methods and applications (Bulletin 1673)
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Biselli, M.; 1991: Enzymkatalysierte Racematspaltung von Aminosäuren mit integrierter Rückführung, dargestellt am Beispiel der Umsetzung von D,L-Alanin zu L-Alanin
Dissertation, Universität Bonn
- Biswas M.; Singh, B.; Rai, Y. P.; Datta, A.; 1982: Turnover of inducible *N*-acetylglucosamine catabolic enzymes in *Candida albicans*
Indian J. Exp. Biol. 20, 829-834
- Blix G.; 1936: Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarmucins
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 240, 43-54

- Bossow-Berke, B.; 1989: Kontinuierliche bioorganische Synthese am Beispiel der C-C-Verknüpfung mit Aldolase
Dissertation, Universität Bonn
- Bradford, M. M.; 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. 72, 248-254
- Brockamp, H.-P.; Kula, M.-R.; 1990: *Staphylococcus carnosus* aldolase as catalyst for enzymatic aldol reaction
Tetrahedron Lett. 31, 7123-7126
- Brunetti, P.; Jourdan, G. W.; Roseman, S.; 1962: The sialic acids; distribution and properties of animal *N*-acetylneuraminic aldolase
J. Biol. Chem. 237, 2447-2453
- Bückmann, A. F.; Morr, M.; Johanson, G.; 1981: Functionalisation of poly-(ethylene glycol) and monomethoxy-poly(ethylene glycol)
Macromol. Chem. 182, 1379-1384
- Butenuth, J.; Scharf, G.; 1974: Kinetik der Mutarotation: Demonstration des Massenwirkungsgesetzes
Chem. in uns. Zeit 8, 121-123
- Capon, B.; Walker, R. B.; 1974: Kinetics and mechanism of the mutarotation of aldoses
J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 1600-1610
- Comb, D. G.; Roseman, S.; 1958: Composition and enzymatic synthesis of *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid)
J. Am. Chem. Soc. 80, 497-499
- Comb, D. G.; Roseman, S.; 1960: The sialic acids; the structure and enzymatic synthesis of *N*-acetylneuraminic acid
J. Biol. Chem. 235, 2529-2537
- Cooper, T. G.; 1981: Biochemische Arbeitsmethoden
Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Cornish-Bowden, A.; 1981: Fundamentals of enzyme kinetics
Butterworths, London, speziell Kapitel 4 und 6
- Crout, D. H. G.; Christen, M.; 1989: Biotransformations in organic synthesis
Modern Synthetic Methods 5, 1-114
- Czarniecki, M. F.; Thornton, E. R.; 1977a: Carbon-13 NMR chemical shift titration of metal ion-carbohydrate complexes. An unexpected dichotomy for calcium ion binding between anomeric derivatives of *N*-acetylneuraminic acid (1)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 553-558
- Czarniecki, M. F.; Thornton, E. R.; 1977b: Carbon-13 nuclear magnetic resonance spin-lattice relaxation in the *N*-acetylneuraminic acids. Probes for internal dynamics and conformational analysis
J. Am. Chem. Soc. 99, 8273-8279
- Damjanovich, S.; Bot, J.; Somogyi, B.; Sümegi, J.; 1972: Effect of glycerol on some kinetic parameters of phosphorylase *b*
Biochim. Biophys. Acta 284, 345-348

- Danishefsky, S. J.; DeNinno, M. P.; Chen, S.; 1988: Stereoselective total synthesis of the naturally occurring enantiomers of *N*-acetylneuraminic acid and 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid. A new and stereospecific approach to sialo and 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid conjugates
J. Am. Chem. Soc. 110, 3929-3940
- Datta, A.; 1970: Regulatory role of adenosine triphosphate on hog kidney *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase
Biochemistry 9, 3363-3370
- Datta, A.; 1975: *N*-Acetylglucosamine 2-epimerase from hog kidney
Methods Enzymol. 41, 407-412
- Davies, H. G.; Green, R. H.; Kelly, D. R.; Roberts, S. M.; 1989: Biotransformations in preparative organic chemistry: the use of isolated enzymes and whole cell systems in synthesis
Academic Press, London
- De Dardel, F.; Arden, T. V.; 1990: Ion Exchangers
in Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A14, 5. Edition
Verlag Chemie, 393-459
- Deijl, C. M.; Vliegthart, J. F. G.; 1983: Configuration of substrate and products of *N*-acetylneuraminate pyruvate-lyase from *Clostridium perfringens*
Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 668-674
- DeNinno, M. P.; 1991: The synthesis and glycosidation of *N*-acetylneuraminic acid
Synthesis 8, 583-593
- Dow; 1989: Persönliche Mitteilung der Firma Dow, Rheinmünster
- Elfderink, V. H. M.; Breitgoff, D.; Kloosterman, M.; Kamphuis, J.; van den Tweel, W. J. J.; Meijer, E. M.; 1991: Industrial developments in biocatalysis
Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 110, 63-74
- Ellwood, D. C.; Sargeant, K.; Sergheraert, G.; van Bekkum, H.; Woelk, H.-U.; 1990: Towards a carbohydrate-based chemistry; proceedings of a symposium held in Amiens, France, 1989
Commission of the European Communities, EUR 12757 EN
- Fessner, W.-D.; Sinerius, G.; Schneider, A.; Dreyer, M.; Schulz, G. E.; Badia, J.; Aguilar, J.; 1991: Diastereoselektive, enzymatische Aldoladditionen mit L-Rhamnulose- und L-Fuculose-1-phosphat-Aldolasen aus *E. coli*
Angew. Chem. 103, 596-599
- Flaschel, E.; Raetz, E.; Renken, A.; 1982: The kinetics of lactose hydrolysis for the β -galactosidase from *Aspergillus niger*
Biotechnol. Bioeng. 24, 2499-2518
- Fletcher, A. P.; Neuberger, A.; 1972: Mutarotation of 2-amino-2-deoxy-D-glucose
J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 12-16
- Fluka; 1991: Katalog Chemika, Biochemika
Fluka Feinchemikalien GmbH
- Friebolin, H.; 1988: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Gais, H.-J.; Hemmerle, H.; 1990: Asymmetrische Synthesen mit Enzymen
Chem. in uns. Zeit 24, 239-248

- Gavish, B.; Werber, M. M.; 1979: Viscosity-dependent structural fluctuations in enzyme catalysis
Biochemistry 18, 1269-1275
- Gerhartz, W. (Hrsg); 1990: Enzymes in industry: production and applications
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Ghosh, S.; Roseman, S.; 1965a: The sialic acids: IV. *N*-Acyl-D-glucosamine 6-phosphate 2-epimerase
J. Biol. Chem. 240, 1525-1530
- Ghosh, S.; Roseman, S.; 1965b: The sialic acids: V. *N*-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase
J. Biol. Chem. 240, 1531-1536
- Giannis, A.; Henk, T.; 1991: Synthese chiraler Bausteine aus D-Glucosamin-Hydrochlorid
Liebigs Ann. Chem. 1991, 789-793
- Gielen, W.; 1967: Beitrag zur Chemie der Neuraminsäure
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 329-333
- Giesecke, U.; 1987: Programm Opti, IBT, Forschungszentrum Jülich
- Glaser, L.; 1972: Epimerases
in P.D. Boyer (Hrsg.): The Enzymes Vol. 6
Academic Press, New York, 355-380
- Gödde, A.; 1990: Optimierung der enzymatischen Synthese von 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonsäure
Forschungsarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen
- Good, N. E.; Izawa, S.; 1972: Hydrogen ion buffers
Methods Enzymol. 24, 53-68
- Hanchak, M.; Korytnyk, W.; 1976: Studies of the epimerization of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose: selective deuteration at C-2 of 2-acetamido-2-deoxyaldoses
Carbohydr. Res. 52, 219-222
- Hartmeier, W.; 1986: Immobilisierte Biokatalysatoren
Springer Verlag, Berlin
- Heimer, R.; Meyer, K.; 1956: Studies on sialic acid of submaxillary mucoid
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 42, 728-734
- Helfferich, F.; 1962: Ion-Exchange
McGraw-Hill, New York
- Helfferich, F.; Schmidt, E.; Lieser, K. H.; Naumann, G.; Martinola, F.; Ladendorf, P.; 1974: Ionenaustauscher
in Ullmanns Enzyklopädie der Technischen Chemie, Band 13, 4. Auflage
Verlag Chemie, 279-346
- Higa, H. H.; Rogers, G. N.; Paulson, J. C.; 1985: Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing *N*-acetyl-, *N*-glycolyl-, and *N,O*-diacetylneuraminic acids
Virology 144, 279-282
- Holzhauser, R.; Faillard, H.; 1988: Sialic acids in human lymphocytes. Qualitative and quantitative alterations in cancer cases
Carbohydr. Res. 183, 89-95

- Honda, S.; Suzuki, S.; 1984: Common conditions for high-performance liquid chromatographic microdetermination of aldoses, hexosamines, and sialic acids in glycoproteins
Anal. Biochem. 142, 167-174
- Horecker, B. L.; Tsolas, O.; Lai, C. Y.; 1972: Aldolases
in P. D. Boyer (Hrsg.): The Enzymes Vol. 7
Academic Press, New York, 213-261
- Hupe, D. J.; 1987: Enzyme reactions involving imine formation
in M. I. Page (Hrsg.): Enzyme mechanisms
University Press, Belfast, 317-344
- Jancsik, V.; Keletti, T.; Biczok, Gy.; Nagy, M.; Szabo, Z.; Wolfram, E.; 1975/76: Kinetic properties of aldolase in polymer solutions
J. Mol. Catal. 1, 137-144
- Jandera, P.; Churáček, J.; 1973: Ion-exchange chromatography of carboxylic acids
J. Chromatogr. 86, 351-421
- Jandera, P.; Churáček, J.; 1974: Ion-exchange chromatography of aldehydes, ketones, ethers, alcohols, polyols and saccharides
J. Chromatogr. 98, 55-104
- Jaques, L. W.; Brown, E. B.; Barrett, J. M.; Brey, W. S.; Weltner, W.; 1977: Sialic acid, a calcium-binding carbohydrate
J. Biol. Chem. 252, 4533-4538
- Jaworek, D.; Welsch, J.; 1985: Adenosine 5'-triphosphate
in H. U. Bergmeyer (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis Vol. 7
Verlag Chemie, Weinheim, 340-364
- Joks, B.; 1987: Programme Optiplus und Simuplus, IBT, Forschungszentrum Jülich
- Jones, J. B.; 1986: Enzymes in organic synthesis
Tetrahedron 42, 3351-3403
- Jorns, M. S.; 1980: Studies on the kinetics of cyanohydrin synthesis and cleavage by the flavoenzyme oxynitrilase
Biochim. Biophys. Acta 613, 203-209
- Juneja, L. R.; Koketsu, M.; Nishimoto, K.; Kim, M.; Yamamoto, T.; Itoh, T.; 1991: Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane
Carbohydr. Res. 214, 179-186
- Kim, M.-J.; Hennen, W. J.; Sweers, H. M.; Wong, C.-H.; 1988: Enzymes in carbohydrate synthesis: *N*-Acetylneuraminic acid aldolase catalyzed reactions and preparation of *N*-acetyl-2-deoxy-*D*-neuraminic acid derivatives
J. Am. Chem. Soc. 110, 6481-6486
- Klenk, E.; 1941: Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 268, 50-58
- Kolisis, F. N.; Sotiroidis, T. G.; Evangelopoulos, A. E.; 1980: The protective role of pyruvate against heat inactivation of *N*-acetylneuraminic acid lyase
FEBS Letters 121, 280-282
- Korngold, E.; 1984: Electrodialysis - membranes and mass transfer
in G. Belfort (Hrsg.): Synthetic Membrane Processes
Academic Press, New York, 191-220

- Kragl, U.; Wandrey, C.; Ghisalba, O.; Gygax, D.; 1989: Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von *N*-Acetylneuraminsäure
DE P 39 37 891 A 1 vom 15.11.89
- Kragl, U.; Niedermeyer, U.; Kula, M.-R.; Wandrey, C.; 1990: Engineering aspects of enzyme engineering - continuous asymmetric C-C bond formation in an enzyme-membrane-reactor
Ann. N. Y. Acad. Sci. 613, 167-175
- Kragl, U.; Gygax, D.; Ghisalba, O.; Wandrey, C.; 1991a: Enzymatische zweistufige Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure im Enzym-Membranreaktor
Angew. Chem. 103, 854-855
- Kragl, U.; Peters, J.; Wandrey, C.; Kula, M.-R.; 1991b: Enzym-Membran-Reaktor
DE P 39 37 892.6-41 vom 26.3.91
- Kula, M.-R.; Wandrey, C.; 1987: Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration
Methods Enzymol. 136, 9-21
- Lee, Y. C.; 1990: High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis
Anal. Biochem. 189, 151-162
- Lehmann, J.; 1976: Chemie der Kohlenhydrate
Thieme-Verlag, Stuttgart
- Leibnitz, E.; 1984: Handbuch der Gaschromatographie
Verlag Chemie, Weinheim
- Leuenberger, H. G. W.; 1990: Biotransformation - a useful tool in organic chemistry
Pure & Appl. Chem. 62, 753-768
- Mack, H.; Basabe, J. V.; Brossmer, R.; 1988: 2-Acetamido-2-deoxy-D-gluc- and D-manno-furanose: a simple preparation of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannose
Carbohydr. Res. 175, 311-316
- Meindl, P.; Bodo, G.; Palese, P.; Schulman, J.; Tuppy, H.; 1974: Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid
Virology 58, 457-463
- Meyerhof, O.; Lohmann, K.; Schuster, P.; 1936: Über die Aldolase, ein Kohlenstoff-verknüpfendes Ferment
Biochem. Z. 286, 319-335
- Morgan, D. M. L.; Neuberger, A.; 1974: Mutarotation of some biologically important 2-substituted hexoses
Proc. Roy. Soc., A 337, 317-332
- Morrison, J. D.; 1983-1985: Asymmetric synthesis Volume 1-5
Academic press, New York
- Nees, S.; Schauer, R.; Mayer, F.; Ehrlich, K.; 1976: Purification and characterization of *N*-acetylneuraminatase lyase from *Clostridium perfringens*
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 839-853
- Nilsson, K. G. I.; 1988: Enzymatic synthesis of oligosaccharides
Trends in Biotechnol. 6, 256-264

- Nilsson, K. G. I.; 1989: Enzymic synthesis of di- and tri-saccharide glycosides, using glycosidases and β -D-galactoside 3- α -sialyltransferase
Carbohydr. Res. 188, 9-17
- Noltmann, E. A.; 1972: Aldose-ketose isomerases
in P.D. Boyer (Hrsg.): The Enzymes Vol. 6
Academic Press, New York, 271-354
- Ogasawara, S.; Abiko, K.; Ito, M.; Shitori, Y.; 1988: N-Acetylneuraminic-acid salts as repairing agents for cells and tissues; MECT Corporation, Japan
EP 0 296 620 A2 vom 24.6.88
- Onishi, H.; 1989: Photometric Determination of Traces of Metals
John Wiley & Sons, New York, 13-14
- Page, M. I.; 1984: The chemistry of enzyme action
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 252-253
- Paulsen, H.; 1990: Synthesen, Konformationen und Röntgenstrukturanalysen von Saccharidketten der Core-Regionen von Glycoproteinen
Angew. Chem. 102, 851-968
- Peters, J.; 1990: Untersuchungen zur enzymatischen Regenerierung von polymer-gebundenem NADP/NADPH
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Pollak, A.; Blumenfeld, H.; Wax, M.; Baughn, R. L.; Whitesides, G. M.; 1980: Enzyme immobilisation by condensation copolymerization into cross-linked polyacrylamide gels
J. Am. Chem. Soc. 102, 6324-6336
- Reuter, G.; Schauer, R.; 1986: Comparison of electron and chemical ionization mass spectrometry of sialic acids
Anal. Biochem. 157, 39-46
- Reuter, G.; Schauer, R.; 1988: Suggestions on the nomenclature of sialic acids
Glycoconj. J. 5, 133-135
- Römpp; 1990: Chemie Lexikon
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Sabesan, S.; Paulson, J. C.; 1986: Combined chemical and enzymatic synthesis of sialyloligosaccharides and characterization by 500-MHz ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy
J. Am. Chem. Soc. 108, 2068-2080
- Saito, K.-I.; Sugai, K.; Fujikura, K.; Yamada, N.; Goto, M.; Ban, C.; Hayasaka, E.; Sugiyama, N.; Tomita, K.; 1989: Thermal degradation of sodium N-acetylneuraminate
Carbohydr. Res. 185, 307-314
- Salo, W.; Hamari, M.; Hallcher, L.; 1976: Preparation of [2- ^2H]-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose by epimerization of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannose in basic deuterium oxide; and proposal of a unifying type of mechanism for the 2-epimerization of 2-acetamido-2-deoxyhexoses
Carbohydr. Res. 50, 287-291
- Schauer, R.; 1982a: Sialic acids - chemistry, metabolism and function
Springer-Verlag, New York
- Schauer, R.; 1982b: Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 40, 131-234

- Schauer, R.; 1985: Sialic acids and their role as biological masks
Trends in Biochem. Sci. 10, 357-360
- Schauer, R.; 1987: Analysis of sialic acids
Methods Enzymol. 138, 132-161
- Schauer, R.; Fischer, C.; Lee, H.; Ruch, B.; Kelm, S.; 1988a: Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions in H. J. Gabius, G. A. Nagel (Hrsg.): Lectins and Glycokonjugates in Oncology
Springer-Verlag, Berlin, S.5-23
- Schauer, R.; Yamakawa, T. (Eds.); 1988b: Sialic Acids 1988. Proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids
Kieler Verlag Wissenschaft+Bildung
- Schauer, R.; Kelm, S.; 1990: Zelluläre Interaktionen über Sialinsäuren und Galaktose
Nachr. Chem. Tech. Lab. 38, 452-456
- Schwarz, A.; 1991: Kontinuierliche enzymatische Tripeptidsynthese - dargestellt am Beispiel von ArgTyrArg und TyrArgAla
Dissertation, Universität Bonn
- Scott, C. D.; 1971: Practice of Ion-Exchange Chromatography in J. J. Kirkland (Hrsg.): Modern Practice of liquid Chromatography
Wiley Interscience, New York, S.287-323
- Seebach, D.; 1990: Organische Synthese - wohin?
Angew. Chem. 102, 1363-1409
- Segel, I. H.; 1975: Enzyme kinetics - behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems
John Wiley & Sons, New York, speziell Kapitel 2 und 9
- Shukla, A. K.; Schauer, R.; 1986: Analysis of sialidase and *N*-acetylneuraminate pyruvate-lyase substrate specificity by high-performance liquid chromatography
Anal. Biochem. 158, 158-164
- Silver, H.; Karim, K. A.; Gray, M. J.; Salinas, F. A.; 1981: High-performance liquid chromatography quantitation of *N*-acetylneuraminic acid in malignant melanoma and breast carcinoma
J. Chromatogr. 224, 381-388
- Simon, E. S.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M.; 1988: Synthesis of CMP-NeuAc from *N*-acetylglucosamine: Generation of CTP from CMP using adenylate kinase
J. Am. Chem. Soc. 110, 7159-7163
- Spivak, C. T.; Roseman, S.; 1959: Preparation of *N*-acetylglucosamine (2-acetamido-2-deoxymannose) and mannosamine hydrochloride (2-amino-2-deoxy-D-mannose)
J. Am. Chem. Soc. 81, 2403-2404
- Spohn, U.; 1988: persönliche Mitteilung
Martin-Luther-Universität, Halle
- Stiller, R.; Thiem, J.; 1990: Enzyme in der Kohlenhydratsynthese
in P. Präve et al. (Hrsg.): Jahrbuch Biotechnologie
Carl Hanser Verlag, München, S. 101-136
- Straub, A.; Effenberger, F.; Fischer, P.; 1990: Aldolase-catalyzed C-C bond formation for stereoselective synthesis of nitrogen-containing carbohydrates
J. Org. Chem. 55, 3926-3932

- Sweeley, C. C.; Bentley, R.; Makita, M.; Wells, W. W.; 1963: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances
J. Am. Chem. Soc. 85, 2497-2507
- Teshima, S.; Tamai, K.; Hayashi, Y.; Emi, S.; 1988: New enzymatic determination of sialic acid in serum
Clin. Chem. 34, 2291-2294
- Thiem, J.; Treder, W.; 1986: Synthese des Trisaccharids Neu5Ac- α (2-6)Gal-B(1-4)GlcNAc mit immobilisierten Enzymen
Angew. Chem. 98, 1100-1101
- Thiem, J.; Wiemann, T.; 1990: Kombinierte chemoenzymatische Synthese von N-Glycoproteinbausteinen
Angew. Chem. 102, 78-80
- Toone, E. J.; Simon, E. S.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M.; 1989: Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates
Tetrahedron 45, 5365-5422
- Toyobo; 1985: Enzymic determination of N-acetylneuraminic acid
Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60.184.399 vom 19.9.1985 (CA 104, 3137b)
- Toyobo; 1989: Datenblatt zur Acylglucosamin 2-Epimerase (vgl. Anhang A2)
- Toyobo; 1991: Datenblatt zur N-Acetylneuraminsäure-Aldolase (vgl. Anhang A1)
- Uchida, Y.; Tsukada, Y.; Sugimori, T.; 1973: Improved microbial production of colominic acid, a homopolymer of N-acetylneuraminic acid
Agric. Biol. Chem. 37, 2105-2110
- Uchida, Y.; Tsukada, Y.; Sugimori, T.; 1984: Purification and properties of N-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*
J. Biochem. 96, 507-522
- Unverzagt, C.; Kunz, H.; Paulson, J. C.; 1990: High-efficiency synthesis of sialyloligosaccharides and sialoglycopeptides
J. Am. Chem. Soc. 112, 9308-9309
- van Gogh, V.; 1888: Zitiert nach J. G. van Gogh-Bonger (Hrsg.): Vincent van Gogh, Briefe an seinen Bruder, Band 1, Insel Taschenbuch 954, Frankfurt 1988, S. 736
- Varga, M.; Fitori, J.; Damjanovich, S.; 1978: Conductimetric testing of phosphorylase *b* reaction in the presence of polyethylene glycols
Stud. Biophys 70, 45-50
- von der Osten, C. H.; Sinskey, A. J.; Barbas, C. F.; Pederson, R. L.; Wang, Y.-F.; Wong, C.-H.; 1989: Use of a recombinant bacterial fructose-1,6-diphosphate aldolase in aldol reactions: preparative syntheses of 1-deoxy-nojirimycin, 1-deoxymannojirimycin, 1,4-dideoxy-1,4-imini-D-arabinitol, and Fangomine
J. Am. Chem. Soc. 111, 3924-3927
- Waldmann, H.; 1991: Enzymatische C-C-Verknüpfungen
Nachr. Chem. Tech. Lab. 39, 1408-1414
- Wandrey, C.; 1977: Reaktionstechnische Untersuchungen an Enzymkatalysatoren zur Entwicklung kontinuierlicher Verfahren
Habilitationsschrift, TU Hannover

- Weis, W.; Brown, J. H.; Cusack, S.; Paulson, J. C.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C.; 1988: Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid
Nature 333, 426-431
- Welch, G. R.; 1986: The fluctuating enzyme
John Wiley & Sons, New York
- Wong, C.-H.; Whitesides, G. M.; 1983: Synthesis of sugars by aldolase-catalyzed condensation reactions
J. Org. Chem. 48, 3199-3205
- Yamada, H.; Shimizu, S.; 1988: Mikrobielle und enzymatische Verfahren zur Produktion biologisch und chemisch wertvoller Verbindungen
Angew. Chem. 100, 640-661
- Yamada, H.; 1991: Persönliche Mitteilung
- Yoshimura, J.; Sakai, H.; Oda, N.; Hashimoto, H.; 1972: Aminosugars XX. Synthesis of some derivatives of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannose
Bull. chem. Soc. Jap. 45, 2027-2032
- Zbiral, E.; 1988: persönliche Mitteilung
- Zbiral, E.; Brandstetter, H. H.; Christian, R.; Schauer, R.; 1987: Synthesis of the C-7-, C-8-, and C-7.8-side chain epimers of 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acids and their behaviour towards sialidase from *vibrio cholerae*
Liebigs Ann. Chem. 1987, 781-786
- Ziegler, T.; Straub, A.; Effenberger, F.; 1988: Enzym-katalysierte Synthese von 1-Desoxymannojirimycin, 1-Desoxynojirimycin und 1,4-Didesoxy-1,4-imino-D-arabinitol
Angew. Chem. 100, 737-738
- Zurmühl, R.; 1965: Praktische Mathematik für Ingenieure und Physiker
Springer Verlag, Berlin, 417-435

N-ACETYLNEURAMINIC ACID ALDOLASE

from Microorganism

N-Acetylneuraminate pyruvate-lyase (EC 4.1.3.3)^{1~4)}



■ PREPARATION and SPECIFICATION

Appearance	: Light yellow amorphous powder, Lyophilized
Activity	: Grade III 15 U/mg-solid or more (30 U/mg-protein or more) (containing approx. 30% of stabilizers)
Contaminants	: Catalase ≤ 1.0% NADH oxidase ≤ 1.0 × 10 ⁻³ %
Stability	: Stable at -20°C for at least 6 months (Fig. 1)
Stabilizers	: Mannitol, EDTA

■ PROPERTIES

Molecular weight	: approx. 98,000
Isoelectric point	: 4.6 ± 0.1
Michaelis constant	: 2.5 × 10 ⁻³ M (N-Acetylneuraminic acid)
Structure	: 3 subunits (approx. 35,000) per mol of enzyme
Inhibitors	: p-Chloromercuribenzoate, sodium dodecyl sulfate, Hg ⁺⁺ , Ag ⁺
Optimum pH	: 7.5 – 8.0 (Fig. 2)
Optimum temperature	: 70°C (Fig. 3)
pH Stability	: pH 6.0 – 9.0 (10°C, 25 hr) (Fig. 4)
Thermal stability	: below 65°C (pH 7.5, 30 min) (Fig. 5)
Effect of various chemicals	: (Table 1)

■ APPLICATIONS^{5~7)}

The enzyme is useful for enzymatic determination of N-acetylneuraminic acid and sialic acid by coupling with the related enzymes in clinical analysis.

ASSAY

Principle:

N-Acetylneuraminate $\xrightarrow{\text{N-acetylneuraminic acid aldolase}}$ Pyruvate + N-Acetyl-D-mannosamine

Pyruvate + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{lactate dehydrogenase}}$ L-Lactate + NAD⁺

The disappearance of NADH is measured at 340 nm by spectrophotometry.

Unit definition:

One unit causes the oxidation of one micromole of NADH per minute under the conditions described below.

Method:

Reagents

- A. NANA solution : 50 mM [Dissolve 309 mg of N-acetylneuraminic acid (MW=309) in ca. 15 ml of 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.5 and, after adjusting the pH to 7.5 with 1N KOH, fill up to 20 ml with the same buffer.] (Stable for at least one week if stored at 0 – 5°C)
- B. LDH solution : ca. 50 U/ml [Dilute pig heart lactate dehydrogenase (Toyobo Grade II, ammonium sulfate suspension) to a concentration of ca. 50 U/ml with ice-cold 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.5] (Prepare freshly)
- C. NADH solution : 1.0 mM [Dissolve 7.6 mg of NADH·Na₂·3H₂O (MW=763) in 10 ml of 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.5] (Prepare freshly)
- D. Buffer solution : 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.5

Procedure

1. Prepare the following reaction mixture in a cuvette (d=1.0 cm) and equilibrate at 37°C for about 5 minutes.

1.0 ml	Substrate solution	(A)
0.5 ml	LDH solution	(B)
0.5 ml	NADH solution	(C)
0.4 ml	Buffer solution	(D)

Concentration in assay mixture	
K-Phosphate buffer	50 mM
NANA	20 mM
NADH	0.2 mM
LDH	ca. 10 U/ml

2. Add 0.1 ml of the enzyme solution* and mix by gentle inversion.
 3. Record the decrease of optical density at 340 nm against water for 3 to 4 minutes in spectrophotometer thermostated at 37°C, and calculate the ΔOD per minute from the initial linear portion of the curve (ΔOD test).
At the same time, measure the blank rate (ΔOD blank) by the same method as test except that the enzyme diluent (D) is added instead of the enzyme solution.
- * Dissolve the enzyme preparation in ice-cold buffer solution (D) and dilute to 0.1 – 0.3 U/ml with the same buffer, immediately before assay.

Calculation

Activity can be calculated by using the following formula:

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\Delta\text{OD/min} (\Delta\text{OD test} - \Delta\text{OD blank}) \times V_t \times df}{6.22 \times 1.0 \times V_s}$$

$$= \Delta\text{OD/min} \times 4.02 \times df$$

$$\text{Weight activity (U/mg)} = (\text{U/ml}) \times 1/C$$

- V_t : Total volume (2.5 ml)
- V_s : Sample volume (0.1 ml)
- 6.22 : Millimolar extinction coefficient of NADH (cm²/micromole)
- 1.0 : Light path length (cm)
- df : Dilution factor
- C : Enzyme concentration in dissolution (c mg/ml)

REFERENCES

- 1) D.G. Comb and S. Roseman; *J. Biol. Chem.*, **235**, 2529 (1960).
- 2) D.G. Comb and S. Roseman; *Meth. Enzymol.*, **5**, 391 (1960).
- 3) S.B. Arden, W. Chang and L. Barksdale; *J. Bacteriol.*, **112**, 1260 (1972).
- 4) Y. Uchida, Y. Tsukada and T. Sugimori; *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 181 (1985).
- 5) P. Burunetti, A. Swanson and S. Roseman; *Meth. Enzymol.*, **6**, 465 (1963).
- 6) K. Taniuchi, Y. Miyamoto, Y. Uchida, K. Chifu, M. Mukai, N. Yamaguchi, Y. Tsukada, T. Sugimori, K. Doi and S. Baba; *J. Med. Technol. (Japanese)*, **7**, 403 (1979).
- 7) K. Sugahara, K. Sugimoto, O. Nomura and T. Usui; *Clin. Chim. Acta*, **108**, 493 (1980).

Table 1. Effect of Various Chemicals on N-Acetylneuraminic Acid Aldolase
[The enzyme dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 (5 U/ml) was incubated at 30°C for 1 hr.]

Chemical	Concn. (mM)	Residual activity	Chemical	Concn. (mM)	Residual activity
None	—	100%	PCMB	2.0	0%
Metal salt	2.0		NEM	2.0	103
MgCl ₂		107	NaF	2.0	100
CaCl ₂		87	NaN ₃	20	100
BaAc ₂		95	EDTA	5.0	95
FeCl ₃		89	o-Phenanthroline	2.0	100
CoCl ₂		93	α, α' -Dipyridyl	2.0	101
MnCl ₂		98	Borate	50	86
ZnSO ₄		92	Triton X-100	0.10%	109
NiCl ₂		99	Na-cholate	0.10%	95
CuSO ₄		64	SDS	0.10%	0
PbAc ₂		87	Tween 40	0.10%	96
AgNO ₃		0	Span 85	0.10%	93
HgCl ₂		0			

Ac, CH₃COO; PCMB, p-Chloromercuribenzoate; NEM, N-Ethylmaleimide; EDTA, Ethylenediaminetetraacetate; SDS, Sodium dodecyl sulfate.

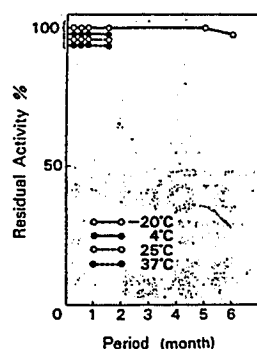


Fig. 1. Stability (Powder form)
[kept under dryness]

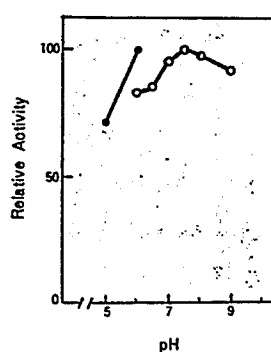


Fig. 2. pH-Activity
[37°C, 5min-reaction in 50mM buffer solution: pH 5.0-6.0, acetate; pH 6.0-9.0, K-phosphate;
The enzyme activity was assayed by the 2,4-dinitrophenyl-hydrazine method.]

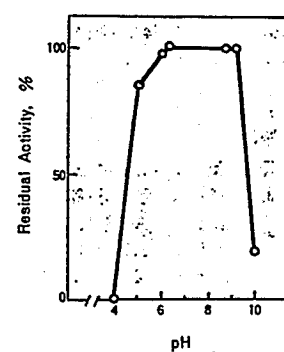


Fig. 4. pH-Stability
[10°C, 25hr-treatment with 50mM buffer solution: pH 4.0-6.0, acetate; pH 6.0-9.0, K-phosphate; pH 9.0-10.0, borate.]

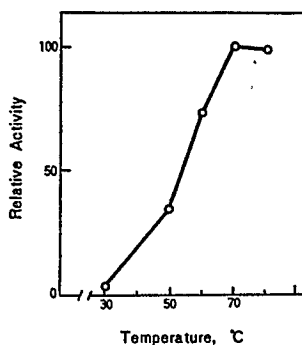


Fig. 3. Temperature activity
[5 min-reaction in 50mM K-phosphate buffer pH 7.5. The enzyme activity was assayed by the 2,4-dinitrophenyl-hydrazine method.]

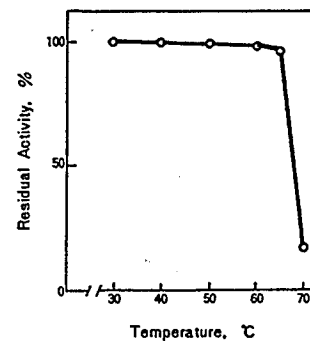


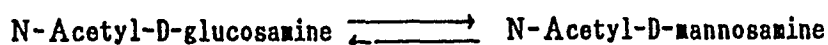
Fig. 5. Thermal stability
[30min-treatment with 50mM K-phosphate buffer, pH 7.5, enzyme concentration: 20U/ml]

● TOYOBO ENZYME ●
(Diagnostic Reagent Grade)

ACYLGLUCOSAMINE 2-EPIMERASE

from Hog Kidney

2-Acylamido-2-deoxy D-glucose 2-epimerase (EC 5.1.3.8) ¹⁻³⁾



■ PREPARATION and SPECIFICATION

Appearance	: Light yellow amorphous powder, lyophilized
Activity	: Grade II 0.3 U/mg-solid or more (containing approx. 50% of stabilizers)
Contaminants	: Catalase $\leq 5.0 \times 10^1$ %
Stability	: Stable at -20°C for at least 6 months
Stabilizers	: ATP, Mg ⁺⁺ , EDTA, potassium gluconate

■ PROPERTIES

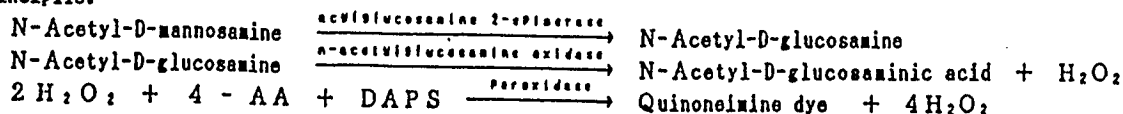
Molecular weight	: approx. 100,000
Isoelectric point	: 5.0 ± 0.1
Michaelis constant	: 3.0×10^{-3} M (N-Acetyl-D-mannosamine)
Inhibitors	: p-Chloromercuribenzoate, Sodium dodecyl sulfate, N-Ethylmaleimide, Hg ⁺⁺ , Ag ⁺
Optimum pH	: 7.0-7.5
Optimum temperature	: 45-50°C
pH Stability	: pH 5.5-7.5 (25°C, 16hr)
Thermal stability	: below 35°C (pH 7.5, 10 min)

■ APPLICATIONS

The enzyme is useful for enzymatic determination of sialic acid by coupling with neuraminidase and n-acetylneuraminate lyase in clinical analysis.

■ ASSAY

Principle:



The appearance of quinoneimine dye is measured at 590 nm by spectrophotometry.

Unit definition:

One unit causes the formation of micromole of hydrogen peroxide (half a micromol of quinoneimine dye) per minute under the conditions described below.

Method:

Reagents

- A. PIPES buffer, pH 7.5 : 0.1 M (Dissolve 30.24g of piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (MW=302.36) in ca.850 ml of H₂O and, after adjusting the pH to 7.5 with 5N NaOH, fill up to 1,000 ml with H₂O)
- B. 4-AA solution : 1.0 % (1.0g 4-aminoantipyrine/100 ml of H₂O) (Store at 4 °C in a brownish bottle.)
- C. DAPS solution : 0.15 % (150 mg Sodium N-ethyl-N-sulfoethyl-3,5-dimethoxyaniline/100 ml of H₂O) (Store at 4 °C in a brownish bottle.)
- D. ATP solution : 0.1 M (0.6 g adenosine 5'-triphosphate·Na₂·3H₂O (MW=605.2/10 ml of H₂O) (Prepare freshly)
- E. MgCl₂ solution : 0.1 M (2.0 g MgCl₂·6H₂O (MW=203.2)/100 ml of H₂O)
- F. POD solution : 0.1 % (100 mg peroxidase (100 purpurogallin units/mg)/100 ml of H₂O) (Store at 4 °C in a brownish bottle.)
- G. NGO solution : ca.25 U/ml (Dilute N-acetylglucosamine oxidase (ammonium sulfate suspension from Seisin) to a concentration of ca. 25 U/ml with H₂O) (Prepare freshly)
- H. NAM solution : 0.3 M (718 mg N-acetyl-D-mannosamine Monohydrate (MW=239.23)/10 ml of H₂O) (Stable for one week if stored at 0 — 5°C)
- I. Enzyme diluent : 20 mM PIPES buffer, pH 7.5

Procedure

1. Prepare the following working solution (20 tests) in a brownish bottle and store on ice.

30.0 ml	PIPES buffer, pH 7.5	(A)
3.0 ml	4-AA solution	(B)
6.0 ml	DAPS solution	(C)
6.0 ml	ATP solution	(D)
6.0 ml	MgCl ₂ solution	(E)
6.0 ml	POD solution	(F)
3.0 ml	NGO solution	(G)

Concentration in assay mixture	
PIPES buffer	47 mM
NAM (Substrate)	10 mM
4-Aminoantipyrine	2.3 mM
DAPS	0.43 mM
ATP	9.3 mM
MgCl ₂	9.3 mM
POD	ca. 9.3 U/ml
NGO	ca. 1.2 U/ml

2. Pipette 2.8 ml of working solution and 0.1 ml NAM Substrate solution (H) in a cuvette (d = 1.0 cm) and equilibrate at 37°C for about 5 minutes.
3. Add 0.1 ml of the enzyme solution² and mix by gentle inversion.
4. Record the increase of optical density at 590 nm against water for 3 to 4 minutes in a spectrophotometer thermostated at 37°C, and calculate the ΔOD per minute from the initial linear portion of the curve (ΔOD test).

At the same time, measure the blank rate (ΔOD blank) by the same method at test expect that the enzyme diluent (I) is added instead of enzyme solution.

Dissolve the enzyme preparation in ice-cold enzyme diluent (I) and dilute to 0.05 — 0.25 U/ml with the same buffer immediately before assay.

Calculation

Activity can be calculated by using the following formula:

$$\begin{aligned}
 \text{Volume activity (U/ml)} &= \frac{\Delta \text{OD}/\text{min} (\Delta \text{OD}_{\text{test}} - \Delta \text{OD}_{\text{blank}}) \times V_t \times d_f}{17.9 \times 1/2 \times 1.0 \times V_s} \\
 &= \Delta \text{OD}/\text{min} \times 3.352 \times d_f
 \end{aligned}$$

$$\text{Weight activity (U/mg)} = (\text{U/ml}) \times 1/C$$

- V_t : Total volume (3.0 ml)
- V_s : Sample volume (0.1 ml)
- 17.9 : Millimolar extinction coefficient of quinoneimine dye under the assay condition (cm/micromole)
- 1/2 : Factor based on the fact that one mole of H₂O₂ produces half a mole of quinoneimine dye
- 1.0 : Light path length (cm)
- d_f : Dilution factor
- C : Enzyme concentration in dissolution (c mg/ml)

Jül-2583

Februar 1992

ISSN 0366-0885