

SUMMARY

Chiral amines are highly valuable functionalised molecules which play an important role in the pharmaceutical, agrochemical and chemical industry. Nowadays, the asymmetric pathway, which is catalysed by ω -transaminase, receives a lot of attention in order to produce these optically active molecules. However, the pathway generally suffers from low productivity and thus must be intensified to meet industrial requirements. To evaluate potential intensification strategies in an efficient and fast way, microreactors can be used since they provide an ideal screening platform which can also be used for production by a so-called scaling-out. To limit the required experimental effort, mathematical models can be used. In this dissertation two types of mathematical models are used, i.e. kinetic and computational fluid dynamic (CFD) models. On the one hand, the kinetic model is used to characterise the kinetic behaviour of the enzyme, which makes it possible to optimise the process conditions or to determine its performance compared to other enzymes. On the other hand, CFD models provide insight into the mass transfer processes, and are used to identify conditions where mass transfer limitations drastically reduce the overall productivity. These models are used to gather process knowledge, and indicate which intensification strategies will prove more successful.

The first part of the dissertation deals with the kinetic characterisation of the ω -transaminase under study. The kinetic behaviour of the enzyme can be represented by the plain ping-pong bi-bi model. The kinetic parameters need to be estimated from experimental data before such a model can be used for any process analysis. Since every kinetic parameter has a physical or chemical meaning, it should have one unique and physically realistic value. When a multitude of parameter values yield the same model output, it is impossible to know which combination is the true one. However, this important feature does in many cases hold true, but should be verified when performing a parameter estimation. This type of problem is often related with poor model structures, overparameterised models or non-informative

data, but can be detected by using a so-called identifiability analysis. First, a structural identifiability analysis is performed to determine whether it is possible to retrieve the real parameter values when perfect and unlimited data are available. Second, a practical identifiability analysis is performed to assess whether the parameters can still be retrieved when only a limited amount of noise-corrupted data are available. In this respect, a numerical identifiability method is developed to assess both types of identifiabilities. The application of this numerical identifiability method yielded that the plain ping-pong bi-bi model is (at least locally) structurally identifiable. However, for the parameter values found in literature, it is found that not all the parameters are practically identifiable, which indicates that the experiments conducted to estimate those parameters are not sufficiently informative. Moreover, it is shown that the parameters are only practically identifiable for low measurement errors. The results of the numerical identifiability confirm that a proper parameter estimation should always be followed by an estimation of the parameter estimate uncertainties.

Since the plain ping-pong bi-bi model is found to be (at least locally) structurally identifiable, a parameter estimation can be performed. In this respect, it is chosen to use a model-based optimal experimental design. The aim of such a design approach is to reduce the total experimental effort by proposing highly informative experiments. However, for nonlinear models like the plain ping-pong bi-bi model, proposing an optimal experimental design is a nontrivial task. Such an experimental design is highly dependent on the intrinsic (i.e. “real”) values of the kinetic parameters, but since these kinetic parameter values are *a priori* unknown, it is impossible to propose an optimal design. To overcome this problem, an iterative approach is required to estimate the kinetic parameter values. First, some experiments are performed in real-life. This additional experimental information is used to update the current model parameters, and afterwards used to propose new experiments. However, the current experimental design is still highly dependent on the current parameter values, and thus a more advanced design method is required. By using a so-called iterative robust model-based optimal experimental design method, more robust experimental designs are proposed which are suitable for a range of parameter values instead of only one specific value. It is shown that by using such an iterative experimental design approach, the parameters can be estimated more accurately compared to a standard uniform design where the collected information is not used to optimise the experimental design. By applying this methodology, the plain ping-pong bi-bi model is properly calibrated and found to be practically identifiable.

To ensure that the calibrated parameter values represent the intrinsic parameter values, the measurements of such a parameter estimation exercise need to be conducted at conditions where there are no mass transfer limitations. This is an important condition, since this will determine whether microreactors can be successfully used as a screening device for biocatalytic reactions. For simple reactions and microreactor geometries, the mass transfer limitations can be easily calculated using dimensionless numbers. However, the ping-pong bi-bi reaction under study is more complex and thus these dimensionless numbers will only yield qualitative measures (i.e. high, medium, low). Moreover, these dimensionless numbers are only applicable for simple microreactor geometries, and thus the mass transfer limitations cannot be assessed for more complex microreactor geometries yet. To overcome this problem, a generic methodology is developed which is applicable for any kinetic model and microreactor geometry. For two simple microreactor configurations, this generic methodology is applied and its results coincide with those of the traditional approach of dimensionless numbers. These observations confirm that the generic methodology is valid and can be used to calculate productivity decreases due to these mass transfer limitations. The general applicability makes the method superior to the use of dimensionless numbers.

As stated above, kinetic parameters are typically estimated under the absence of any mass transfer limitations or at least this assumption is made. To achieve these so-called kinetically limited conditions in batch reactors, mixing is typically increased until no further improvement is seen with respect to the reactor productivity. However, the increase of the shear stresses can lead to the denaturation of the enzyme, which would yield a decrease in the reactor productivity. Moreover, increasing the mixing rate is not straightforward in microreactors and other solutions need to be found. In this respect, the aim of the final part of this dissertation is to investigate whether it is possible to calibrate kinetic parameters under mass transfer limited conditions. For a simple, irreversible enzymatic reaction it is proven that the parameter values can be estimated properly as long as the mass transfer limitations are not too severe. However, the quality of the parameter estimate is strongly related with the experimental conditions (e.g. the measurement error) and design (e.g. the measurement time). These observations indicate that a proper experimental design remains important to perform a parameter estimation under mass transfer limiting conditions. To optimise the experimental design, the Fisher information matrix is often used for kinetic models. For the coupled CFD-kinetic model, the Fisher information matrix showed good correspondence with the “exact” confidence interval, which is sampled directly from the objective function.

The main outcome of this dissertation is the indepth knowledge which was gained about the model calibration of biocatalytic processes and mass transfer limitations. Moreover, this dissertation led to a new generic methodology to assess mass transfer limitations in a (micro)reactor, but it was also illustrated that it is possible to calibrate of kinetic parameters under mass transfer limited conditions. The results of this dissertation will help future researcher to speed up both the enzyme characterisation and reactor development. These two factors are considered crucial with respect to the reduction of the lab-to-market time.

SAMENVATTING

Chirale amines zijn waardevolle, functionele moleculen die belangrijk zijn voor de farmaceutische, agrochemische en chemische industrie. Om deze optisch actieve moleculen te produceren, wordt de asymmetrische *pathway*, welke gekatalyseerd wordt door ω -transaminase, momenteel uitvoerig bestudeerd. Deze *pathway* heeft echter een lage productiviteit en dient geïntensifieerd te worden om te voldoen aan de industriële vereisten. Om de verschillende intensifieringstrategieën op een snelle en efficiënte manier te evalueren, worden typisch microreactoren gebruikt omdat deze een ideaal onderzoeksplatform bieden, dat tevens gebruikt kan worden voor de productie door een zogenaamde *scaling-out*. De totale experimentele inspanning dient echter haalbaar te zijn, maar kan beperkt worden door beroep te doen op wiskundige modellen. In deze thesis zullen twee types van wiskundige modellen gebruikt worden. Enerzijds de kinetische modellen die gebruikt worden om de kinetische karakteristieken van een enzym te achterhalen. Deze karakteristieken kunnen nadien gebruikt worden om de procescondities te optimaliseren of om de performantie met andere enzymen te vergelijken. Anderzijds zijn er de numerieke stromingsleermodellen die inzicht bieden in de massatransportprocessen en gebruikt worden om te identificeren wanneer de productiviteit gelimiteerd wordt door een (te) beperkt massatransport. Het gebruik van beide modeltypes laat toe om kennis op te bouwen, maar ook om te kijken welke intensifieringstrategieën mogelijk succesvol kunnen zijn.

In het eerste deel van deze thesis wordt de kinetische karakterisatie van ω -transaminase bestudeerd. Het kinetische gedrag van dit enzym kan worden voorgesteld door het zogenaamde ping-pong bi-bi model. De kinetische modelparameters dienen geschat te worden met behulp van experimentele data vooraleer het model effectief gebruikt kan worden voor enige procesanalyse. Tevens heeft elke kinetische parameter ook een kinetische of chemische betekenis en dus dient het ook een unieke en fysisch realistische waarde te verkrijgen. Deze belangrijke eigenschap is geldig in meeste gevallen, maar dient gevalideerd te worden bij het uitvoeren van

een parameterschatting. Indien een hele verzameling parameterwaarden éénzelfde modelvoorspelling oplevert, wordt het onmogelijk om de correcte parameterwaarde te selecteren. In zulke gevallen is het model vaak overgeparametriseerd, betreft het een gebrekkige modelstructuur of is the data niet voldoende informatief. Om deze modeldeficiënties te achterhalen, wordt een zogenaamde identificeerbaarheidsanalyse uitgevoerd. Allereerst wordt een structurele identificeerbaarheidsanalyse uitgevoerd om te detecteren of het mogelijk is om the reële parameterwaarden te achterhalen wanneer er een oneindige hoeveelheid perfecte data beschikbaar is. Ten tweede wordt een praktische identificeerbaarheidsanalyse uitgevoerd om te achterhalen of het nog steeds mogelijk is de parameterwaarden te achterhalen wanneer er slechts een beperkte hoeveelheid onzekere data beschikbaar is. Om beide identificeerbaarheidsanalyses uit te voeren, is er in deze thesis een numerieke identificeerbaarheidsmethode ontwikkeld. De toepassing van deze methode leidt tot de conclusie dat het ping-pong bi-bi model (ten minste lokaal) structureel identificeerbaar is. Echter voor de parameterwaarden uit de literatuur blijkt dat niet alle parameters praktisch identificeerbaar zijn, wat erop duidt dat de experimenten niet voldoende informatief waren om deze waarden ook effectief te schatten. Bovendien wordt ook getoond dat de overige parameters enkel praktisch zijn bij een lage meetonzekerheid. De resultaten van de numerieke identificeerbaarheidsmethode bevestigen dat een degelijke parameterschatting altijd gevolgd moet worden door een schatting van de parameteronzekerheden.

Aangezien het ping-pong bi-bi model (ten minste lokaal) structureel identificeerbaar is, kan een parameterschatting uitgevoerd worden. Om dit te realiseren, wordt gebruik gemaakt van een modelgebaseerd optimaal experimenteel ontwerp. Het doel van zulk ontwerp is om de totale experimentele inspanning te reduceren door enkel hoog informatieve metingen te ontwerpen en uit te voeren. Echter, het berekenen van een optimaal experimenteel ontwerp is niet triviaal voor niet-lineaire modellen zoals het ping-pong bi-bi model. Een experimenteel ontwerp is voor zulke modellen zeer afhankelijk van de intrinsieke parameterwaarden, maar deze parameterwaarden zijn initieel onbekend zodat het onmogelijk is om een geschikt optimaal experimenteel ontwerp voor te stellen. Om dit probleem te omzeilen, is een iteratieve procedure vereist om de parameterwaarden te schatten. Allereerst dienen enkele experimenten uitgevoerd te worden. Deze experimentele data kan nadien gebruikt worden om de huidige parameterwaarden te updaten. Deze verbeterde informatie kan vervolgens gebruikt worden om terug enkele (meer informatieve) experimenten voor te stellen. Aangezien deze experimentele ontwerpen nog steeds sterk afhankelijk zijn van de huidige parameterwaarden, dient een meer geavanceerde ontwerpmethodologie gebruikt te worden. Door gebruik te maken van zogenaamde robuuste modelgebaseerde optimale experimentele ontwerpmethoden,

kunnen meer robuuste experimentele ontwerpen voorgesteld worden die geschikt zijn voor een groot bereik aan parameterwaarden in plaats van slechts één specifieke parameterwaarde. Het gebruik van zulke iteratieve experimentele ontwerp-methode die ook robuust is, kunnen meer accurate parameterschattingen bekomen worden in vergelijking met een standaard uniform ontwerp waar de vergaarde informatie niet gebruikt wordt om het experimenteel ontwerp te optimaliseren. De toepassing van deze methode leidt tot een degelijk gecalibreerd ping-pong bi-bi model dat tevens praktisch identificeerbaar is.

Om te garanderen dat de geschatte parameterwaarden de intrinsieke parameterwaarden voorstellen, moeten de metingen voor zulke parameterschatting gebeuren onder condities waar massatransport geen limitatie vormt. Dit is een belangrijke voorwaarde, aangezien dit bepaalt of microreactoren geschikt zijn als onderzoeksplatform voor biokatalytische reacties. Voor eenvoudige reacties en microreactor geometriën kunnen de massatransportlimitaties al eenvoudig berekend worden met behulp van dimensieloze getallen. Het ping-pong bi-bi model is echter complexer en dus kunnen deze dimensieloze getallen enkel gebruikt worden om een kwalitatieve schatting te maken. Bovendien zijn deze dimensieloze getallen enkel toepasbaar voor zeer eenvoudige microreactor geometriën en dus kunnen massatransportlimitaties niet exact bepaald worden voor meer complexe reactoren. Om deze problemen het hoofd te bieden, wordt een generieke methode ontwikkeld die toepasbaar is voor elk kinetische model en microreactor geometrie. Deze generieke methodologie wordt toegepast voor twee eenvoudige microreactor configuraties en levert dezelfde resultaten op als de traditionele aanpak met behulp van dimensieloze getallen. Dit bevestigt dat de generieke methode geschikt is om productiviteitsdalingen ten gevolge van massatransport limitaties te berekenen. De algemene toepasbaarheid van de generieke methode maakt deze superieur tegenover het gebruik van dimensieloze getallen.

Zoals eerder gesteld worden kinetische parameters typisch geschat in de afwezigheid van massatransport limitaties of dit wordt toch verondersteld. Om zogenaamde kinetisch gelimiteerde condities te verkrijgen in *batch* reactoren, wordt typisch de mengsnelheid verhoogd tot er geen verdere verbetering wordt opgemerkt qua productiviteit. Dit leidt tot een toename van de schuifspanningen die aanleiding kunnen geven tot de denaturatie van het enzym. Bovendien is het niet voor de hand liggend om de mengsnelheid te verhogen in een microreactor en dus dienen andere oplossingen gezocht te worden. In het laatste deel van deze thesis wordt onderzocht of het mogelijk is om de kinetische parameters te schatten onder massatransport gelimiteerde condities. Voor een eenvoudige, irreversibele enzymatische reactie kan aangetoond worden dat de parameterwaarden kunnen worden geschat zolang

de massatransportlimitaties niet onredelijk hoog zijn. Echter, de kwaliteit van de parameterschattingen is sterk gerelateerd met de experimentele condities (bijv. de meetonzekerheid) en het ontwerp (bijv. het meettijdstop). Deze observaties tonen aan dat een degelijk experimenteel ontwerp belangrijk blijft om een degelijke parameterschatting uit te voeren onder massatransport gelimiteerde condities. Om het experimenteel ontwerp van kinetische modellen te optimaliseren wordt vaak de Fisher informatie matrix gebruikt. Voor het gekoppelde CFD-kinetisch model toont de Fisher informatie matrix een goede overeenkomst met het “exacte” betrouwbaarheidsinterval dat rechtstreeks verkregen is van de objectieffunctie.