

Biokatalytische Oxidationsreaktionen
unter *in-situ*-Cofaktorregenerierung mit einem Eisenporphyrin
als biomimetische NAD(P)H-Oxidase

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt der
Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

von

Philipp Alexander Böhm
aus Nürnberg

Bielefeld
August 2013

Als Dissertation genehmigt von der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld.

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Harald Gröger

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie des Departments Chemie und Pharmazie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und am Institut für Organische Chemie I der Universität Bielefeld unter Leitung von Prof. Dr. Harald Gröger in der Zeit von März 2009 bis August 2013 erstellt.

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

H. Maid, P. Böhm, S. M. Huber, W. Bauer, W. Hummel, N. Jux, H. Gröger,
Iron Catalysis for In Situ Regeneration of Oxidized Cofactors by Activation and Reduction of Molecular Oxygen: A Synthetic Metalloporphyrin as a Biomimetic NAD(P)H Oxidase,
Angew. Chem. **2011**, 123, 2445-2448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2397-2400.

Weitere im Rahmen dieser Promotion entstandene Veröffentlichungen:

M. Paravidino, P. Böhm, H. Gröger, U. Hanefeld, *Hydrolysis and Formation of Carboxylic Acid Esters*, in: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Gröger, O. May),
3. Auflage, Band 1, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, Kapitel 8, S. 251-362.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Harald Gröger für die freundliche und engagierte Unterstützung während meiner Promotion. Insbesondere möchte ich mich für das spannende Thema meiner Arbeit und die zahlreichen Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Sewald danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des SFB 583. Amano Enzymes und Oriental Yeast danke ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit mit Chemikalien. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Werner Hummel und seiner Arbeitsgruppe für die für meine Forschungsarbeiten zur Verfügung gestellten Alkohol-Dehydrogenasen.

Während meiner Doktorarbeit in Erlangen und in Bielefeld habe ich von zahlreichen Kollegen, von denen ich heute viele als Freunde betrachte, Unterstützung erhalten. Herzlich möchte ich mich daher bei meiner Arbeitsgruppe und allen Freunden aus anderen Arbeitsgruppen für all die Tips und Tricks im Laboralltag, für viele wissenschaftliche Diskussionen und für unzählige gemeinsame Kaffeepausen bedanken. An dieser Stelle möchte ich mich außerdem ganz besonders für die freundschaftliche Aufnahme in Bielefeld beim gesamten Team der OCI bedanken.

Bei meinen Blockpraktikanten Mark Sdahl, Steffen Schwarz, Hanno Dietrich und Isabel Denzer sowie bei unserer Auszubildenden Hanna März möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche Ergebnisse bedanken. Außerdem danke ich allen Angestellten aus Erlangen und Bielefeld, die mir im Laufe meiner Doktorarbeit auf freundliche Art und Weise geholfen haben.

Marcus Speck danke ich für die freundliche Unterstützung bei Fragen rund um das Thema Porphyrine sowie für die Zurverfügungstellung einer Porphyrinprobe. Ebenfalls danke ich Herrn apl. Prof. Dr. Norbert Jux für seine freundliche Hilfe während meiner Doktorarbeit. Walter Bauer möchte ich für eine tolle Zusammenarbeit und seine kompetente Hilfe bei zahlreichen Fragen zur NMR-Spektroskopie danken.

Während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten mich Carolin Giese, Marcel Heidlindemann, Wilko Greschner, Katharina Tenbrink und Giuseppe Rulli in besonderem Maße. Bei Euch möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich ganz besonders für den immerwährenden Rückhalt und die liebevolle Unterstützung danken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin Elena Herman für Ihre Hilfe. Deine Korrekturen und Vorschläge haben diese Arbeit maßgeblich beeinflusst. Danke, dass Du immer für mich da bist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung – Weltrekorde der industriellen Biokatalyse und Zukunftsaussichten	1
2	Motivation und Zielsetzung.....	4
3	Stand der Wissenschaft.....	8
3.1	Cofaktorregenerierung in der Enzymkatalyse.....	8
3.1.1	Methoden zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NAD(P)H.....	11
3.1.2	Methoden zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD(P) ⁺	19
3.1.3	Zusammenfassung und Aussicht	30
3.2	Das Eisen(III)-porphyrin FeTSPP (8)	31
3.2.1	Eigenschaften von FeTSPP (8)	32
3.2.2	Anwendungen von FeTSPP (8).....	34
3.3	Vorarbeiten zur Cofaktorregenerierung mittels FeTSPP (8)	40
4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Vorgehensweise und Ziele dieser Arbeit	43
4.2	Oxidation von D-Glucose (1) als Benchmark-Versuch.....	44
4.2.1	Kontrollversuche zur Überprüfung des Benchmark-Versuches.....	45
4.2.2	Koppelprodukt der Reduktion von Sauerstoff	49
4.2.3	Analytik: Umsatzbestimmung mittels ¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	52
4.3	Spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase.....	55
4.3.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität: Methode A.....	57
4.3.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität: Methode B.....	58
4.3.3	Spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert	61
4.3.4	Katalysemechanismus	66
4.4	Anwendungsbreite der künstlichen Cofaktorregenerierung mittels GDH	69
4.4.1	Reaktionsbedingungen der Oxidation von D-Glucose (1) mittels GDH.....	71
4.5	Alkohol-Dehydrogenase-katalysierte Oxidation achiraler Alkohole.....	78
4.5.1	Oxidation von Cyclohexanol (30) zu Cyclohexanon (31).....	79
4.5.2	Oxidation von Cycloheptanol (67) zu Cycloheptanon (68).....	84
4.5.3	Oxidation von Cyclooctanol (69) zu Cyclooctanon (70)	91

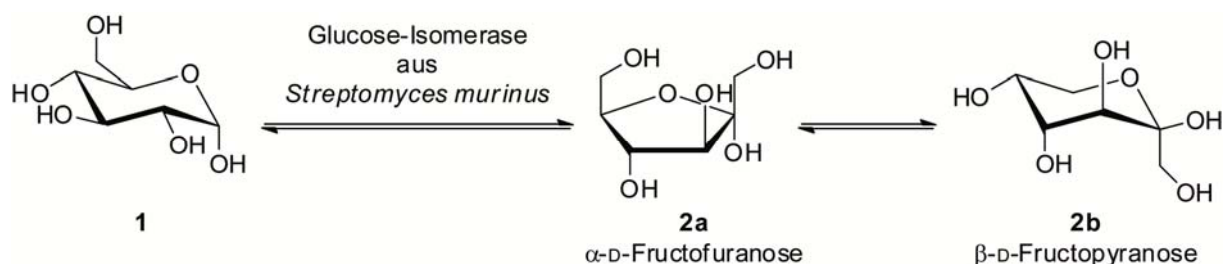
4.5.4	Zusammenfassung	97
4.6	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-p</i>-Chlorphenylethanol (<i>rac-71</i>) durch biokatalytische Oxidation mit gekoppelter <i>in-situ</i>-Cofaktorregenerierung.....	98
4.6.1	Spektrophotometrische Untersuchungen zum Screening relevanter Biokatalysatoren	99
4.6.2	Analytik zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (ee-Wert) und des produktbezogenen Umsatzes	101
4.6.3	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-p</i> -Chlorphenylethanol (<i>rac-71</i>) mit Substratgekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung	108
4.6.4	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-p</i> -Chlorphenylethanol (<i>rac-71</i>) mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (8)	110
4.6.5	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-p</i> -Chlorphenylethanol (<i>rac-71</i>) mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch NADH-Oxidase	114
4.7	Untersuchung weiterer Metalloporphyrine als potentielle künstliche NAD(P)H-Oxidasen	116
4.7.1	Vorarbeiten mit hydrophilen Eisen(III)-porphyrinen 72 – 74	116
4.7.2	Untersuchung des hydrophoben Eisen(III)-porphyrins 75	117
4.7.3	Untersuchung von MnTSPP (76), PdTSPP (77) und des freien TSPP-Liganden (78)	119
4.8	Eisen(III)-porphyrin-katalysierte <i>in-situ</i>-Cofaktorregenerierung – Prozessentwicklung und Recycling.....	122
4.8.1	Prozessoptimierung	123
4.8.2	Langzeitstabilität und -aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase 8	124
4.8.3	Recycling von FeTSPP (8)	127
5	Zusammenfassung	130
6	Abstract	136
7	Experimenteller Teil.....	137
7.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	137
7.2	Synthesen, Methoden und spektroskopische Daten	139
7.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Produktbezogene Umsatzbestimmung mittels ¹³ C-NMR-Spektroskopie am Beispiel der Oxidation von D-Glucose (1).....	139
7.2.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Quantitative Umsatz-bestimmung mittels ¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	139
7.2.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Oxidation von Monosacchariden mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (8)	140

7.2.4	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Bestimmung der berechneten Ausbeute mittels Standard am Beispiel der Oxidation von Cyclooctanol (69).....	150
7.2.5	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Oxidation achiraler Alkohole mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (8).....	152
7.2.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Recycling von FeTSPP (8).....	167
7.2.7	Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Oxidation achiraler Alkohole mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (75).....	172
7.2.8	Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV 8): Oxidation von Cyclooctanol (69) mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-21,23H-porphyrin (78).....	174
7.2.9	Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV 9): Oxidation von Cyclooctanol (69) mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Pd(II) (77).....	175
7.2.10	Allgemeine Arbeitsvorschrift 10 (AAV 10): Oxidation von D-Glucose (1) mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch MnTSPP (76).....	176
7.2.11	Allgemeine Arbeitsvorschrift 11 (AAV 11): Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler Gaschromatographie.....	177
7.2.12	Allgemeine Arbeitsvorschrift 12 (AAV 12): Oxidation chiraler Alkohole mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch Aceton.....	180
7.2.13	Allgemeine Arbeitsvorschrift 13 (AAV 13): Oxidation chiraler Alkohole mit gekoppelter <i>in-situ</i> -Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (8).....	185
7.2.14	Allgemeine Arbeitsvorschrift 14 (AAV 14): H ₂ O ₂ -Nachweis.....	193
7.2.15	Allgemeine Arbeitsvorschrift 15 (AAV 15): Spektralphotometrische Bestimmung der Enzymaktivität bei pH 7.0.....	194
7.2.16	Allgemeine Arbeitsvorschrift 16 (AAV 16): Spektralphotometrische Untersuchung der Oxidation von NADH durch FeTSPP (8) unter Sauerstoffausschluss.....	203
7.2.17	Allgemeine Arbeitsvorschrift 17 (AAV 17): Spektralphotometrische Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Umsatzfrequenz (TOF) von FeTSPP (8): Methode A 204	
7.2.18	Allgemeine Arbeitsvorschrift 18 (AAV 18): Spektralphotometrische Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Umsatzfrequenz (TOF) von FeTSPP (8): Methode B 207	
7.2.19	Allgemeine Arbeitsvorschrift 19 (AAV 19): Bestimmung der Langzeitstabilität von FeTSPP (8) in Lösung.....	210
7.2.20	Allgemeine Arbeitsvorschrift 20 (AAV 20): Absorptionsspektren von FeTSPP (8)...	211
8	Appendix.....	213
9	Literaturverzeichnis.....	214
10	Abkürzungsverzeichnis.....	225

1 Einleitung – Weltrekorde der industriellen Biokatalyse und Zukunftsaussichten

Die Biokatalyse gilt als „grüne“ Technologie in der organischen Synthese, da viele enzymkatalysierte Reaktionen in wässrigem Medium ohne hohe Temperaturen und Drücke bei milden Bedingungen durchgeführt werden können.^[1-2] Als Ergänzung zu etablierten Synthesestrategien ermöglicht die Biokatalyse in einigen Fällen Reaktionsschritte, die mit klassischen Methoden nur schwierig oder sogar überhaupt nicht durchzuführen sind.^[2-3] Teilweise können mehrere Syntheseschritte durch eine einzige Biotransformation ersetzt werden.^[1] Insbesondere Vorteile wie die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität können Prozesse vereinfachen und dadurch ökonomischer und umweltverträglicher gestalten.^[1,3] Eine Vielzahl von biokatalytischen Syntheseprozessen wird heutzutage bereits im industriellen Maßstab durchgeführt.

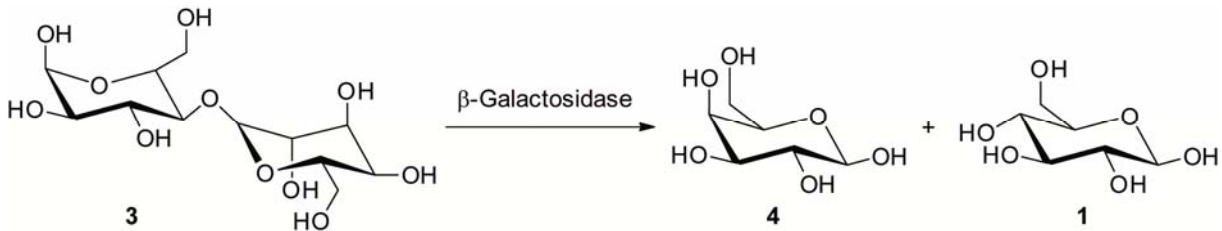
Hierbei hält die Glucose-Isomerase (EC 5.3.1.5) „Sweetzyme T“ der Firma Novo aus Dänemark einen Weltrekord in der Stärkeindustrie.^[1] Eine Säule mit immobilisiertem Sweetzyme T produzierte ausgehend von D-Glucose (**1**) 12 000 kg Fructosesirup (mit 42% D-Fructose (**2**) in der Trockensubstanz) pro kg Enzym über einen Zeitraum von 687 Tagen (Schema 1).



Schema 1. Isomerisierung von D-Glucose (**1**) zu D-Fructose (**2**)^[1]

Die Umsetzung von D-Glucose (**1**) zu D-Fructose (**2**) ist ein gebräuchliches Mittel zur Erhöhung des Fructoseanteils und damit der Süßkraft eines Sirups, da D-Fructose (**2**) eine deutlich höhere Süßkraft als D-Glucose (**1**) besitzt.^[1] In der Herstellung von Industriechemikalien stellt diese enzymatische Isomerisierung eine der größten Anwendungen eines immobilisierten Enzyms dar.^[1,4]

Ein weiterer enzymatischer Prozess in der Lebensmittelindustrie ist die Hydrolyse von Lactose (**3**) zu D-Galactose (**4**) und D-Glucose (**1**) durch die Lactase β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) (Schema 2).^[1]

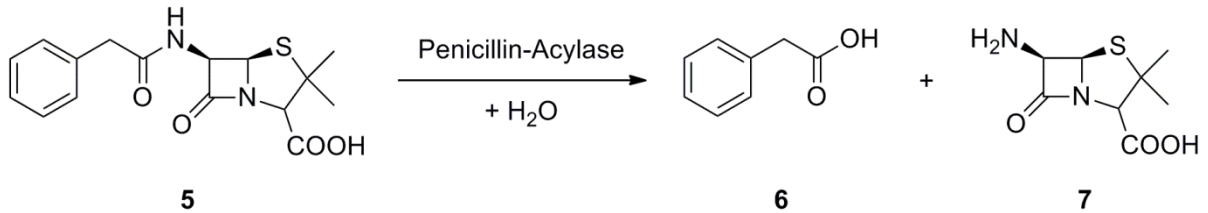


Schema 2. Hydrolyse der β -1,4-glycosidischen Bindung von Lactose (**3**) mittels β -Galactosidase^[1]

Ungefähr 75% der Weltbevölkerung verliert nach der Kindheit die Fähigkeit Lactose (**3**) vollständig zu verdauen, weshalb es einen großen Bedarf an lactosefreien Milchprodukten gibt.^[5] Die Firma *Central del Latte* war das erste Unternehmen, das kommerziell die Hydrolyse von Lactose (**3**) mittels einer immobilisierten Lactase durchführte.^[1,6] Heute betreibt das Unternehmen eine Anlage mit einer Kapazität von 10 Tonnen pro Tag.^[1]

Neben der Lebensmittelindustrie besitzen enzymatische Prozesse insbesondere in der Pharmaindustrie eine große Bedeutung. Beispielsweise finden enzymatisch hergestellte β -Lactam-Antibiotika wie Penicilline oder Cephalosporine weltweite Anwendung als Arzneimittel zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten und sind aus der Medizin nicht mehr wegzudenken. Auf der Suche nach neuen und immer wirksameren Antibiotika werden zahlreiche halbsynthetische β -Lactam-Antibiotika hergestellt.^[1] Die meisten dieser Verbindungen werden ausgehend von 6-Aminopenicillansäure (**7**, 6-APA), 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) und 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure (7-ADCA) synthetisiert. Gegenwärtig wird 6-Aminopenicillansäure (**7**) durch enzymatische Deacylierung mittels Penicillin-Amidase (EC 3.5.1.11) aus Penicillin G (**5**) oder Penicillin V hergestellt (Schema 3).^[1] Dieser Prozess wird bereits seit 1973 durchgeführt und repräsentiert eine der bekanntesten Anwendungen immobilisierter Enzyme in der Pharmaindustrie. Mehrere chemische Schritte werden hierbei durch eine einzige enzymatische Transformation ersetzt. Organische Lösungsmittel, die Verwendung tiefer

Temperaturen (-40 °C) und absolut wasserfreie Bedingungen sind im enzymatischen Prozess nicht mehr notwendig.^[1,7]



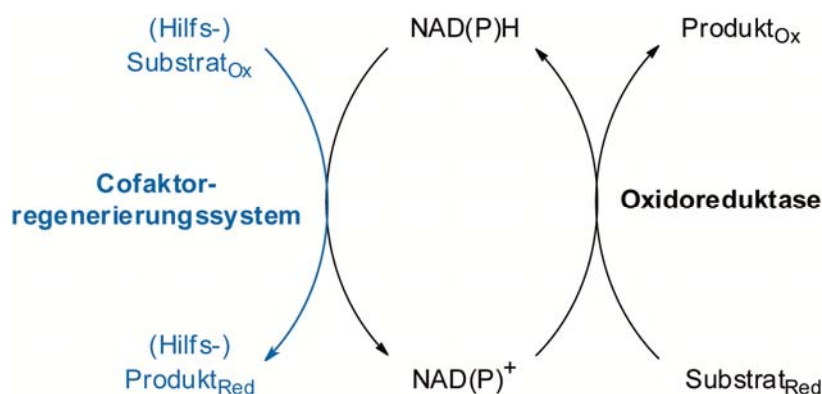
Schema 3. Enzymatische Deacylierung von Penicillin G (5)^[1]

Neben der Pharma- und der Lebensmittelindustrie wird die Biokatalyse heute ebenfalls in der Polymerchemie, der Spezialchemie und in der Synthese von Bulkchemikalien eingesetzt und die Zukunftsaussichten für die Etablierung neuer enzymatischer Prozesse sind vielversprechend.^[1,8] Inzwischen sind eine Menge Enzyme kommerziell verfügbar^[9] und es werden ständig vielversprechende neue Enzyme entdeckt oder entwickelt.^[1,8]

Möglicherweise werden zukünftige biokatalytische Verfahren sogar Reaktionen wie beispielsweise die Synthese von Ammoniak aus molekularem Stickstoff durch eine Nitrogenase (EC 1.18.6.1) oder die Fixierung und Nutzung von Kohlenstoffdioxid durch eine Carboxylase (EC 6.4.1.x) in effizienter Weise verwirklichen und eine nachhaltigere und umweltverträglichere chemische Industrie mitgestalten.^[8,10-11]

2 Motivation und Zielsetzung

Oxidationen sind eine der wichtigsten Transformationen in der organischen Synthese.^[12-13] Klassische Oxidationsmethoden benötigen häufig stöchiometrische Mengen giftiger Substanzen, wie beispielsweise Chromate.^[12-13] Durch die Entwicklung neuer Katalysatoren rücken solche Methoden immer mehr in den Hintergrund und weichen milderen, umweltverträglicheren Verfahren, die z.B. Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel verwenden.^[12-14] In diesem Zusammenhang gewannen in den letzten Jahren biokatalytische Oxidationen in der organischen Synthese immer mehr an Bedeutung und werden bereits industriell mittels Ganzzellkatalysatoren durchgeführt.^[1,12] Biokatalysatoren zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Selektivität (Chemo-, Regio- und Enantioselektivität) aus,^[2,13] liegen jedoch in Form von Ganzzellkatalysatoren als Gemisch verschiedener Enzyme mit unterschiedlichen Selektivitäten vor.^[12,15] Der Einsatz isolierter Enzyme bietet hierdurch entscheidende Vorteile.^[12-13] Viele der für Oxidationsreaktionen einsetzbaren Oxidoreduktasen weisen allerdings eine Abhängigkeit von den Nicotinamid-Cofaktoren NAD^+ oder NADP^+ auf.^[2] Diese Cofaktoren sind jedoch zu teuer, um in stöchiometrischen Mengen im industriellen Maßstab eingesetzt werden zu können.^[16] Der Einsatz isolierter Enzyme für Oxidationsreaktionen wird jedoch in attraktiver Weise durch Etablierung eines effizienten Cofaktorregenerierungssystems ermöglicht (Schema 4).^[16]

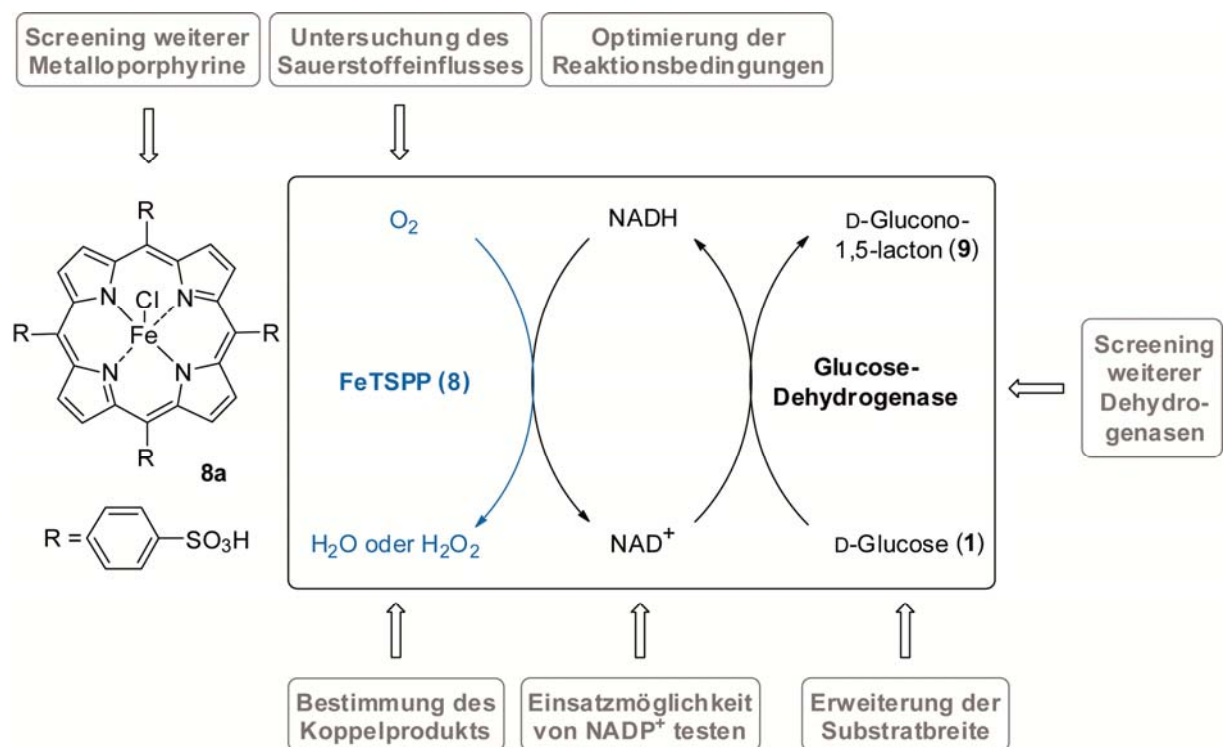


Schema 4. Konzept der Cofaktorregenerierung. (Indices: Red: reduzierte bzw. oxidierbare Verbindung; Ox: oxidierte bzw. reduzierbare Verbindung)

Für die oxidative Richtung der Cofaktorregenerierung konnten bisher außer NAD(P)H -Oxidasen^[17-21] als natürliche Katalysatoren auch chemoenzymatische,^[22] elektrochemische^[23]

und auch biomimetische^[24] Katalysatorsysteme angewendet werden.^[25] Allerdings liefern die bislang entwickelten biomimetischen Katalysatoren als Nebenprodukt das ungewünschte Wasserstoffperoxid anstelle von (vorzugsweise) Wasser^[24-25] und keines der Systeme ist bislang effizient genug für eine breite technische Anwendung.

Kürzlich wurde im Arbeitskreis GRÖGER ein neuartiges Cofaktorregenerierungssystem entwickelt, bei dem ein synthetisches, wasserlösliches Eisen(III)-porphyrin (FeTSPP, **8**) als künstliche, biomimetische NADH-Oxidase fungiert (Schema 5).^[26] Im Rahmen dieser Arbeiten wurde D-Glucose (**1**) in Anwesenheit einer Glucose-Dehydrogenase oxidiert. Der hierbei benötigte Cofaktor NAD^+ wird *in situ* durch FeTSPP (**8**), entsprechend der Wirkungsweise einer NADH-Oxidase, regeneriert. Das Eisen(III)-porphyrin **8** selbst wird dabei in Anwesenheit von Luftsauerstoff regeneriert.



Schema 5. Postuliertes Konzept der Cofaktorregenerierung mittels FeTSPP (**8**) entsprechend der Wirkungsweise einer NADH-Oxidase (rechts); FeTSPP (**8**) als kommerziell verfügbares Chlorid **8a** (links); Die verschiedenen Formen von FeTSPP (**8**) sind im Appendix erläutert

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Fragen nach dem möglichen Koppelprodukt (Wasser oder Wasserstoffperoxid) sowie nach dem Einfluss von Sauerstoff auf die Cofaktorregenerierung

unvollständig untersucht und als Substrat war bislang nur die Verwendung von D-Glucose (**1**) aufgezeigt (Schema 5). Zudem war die präparative Einsatzmöglichkeit von NADP⁺ anstelle von NAD⁺ sowie die Enzybreite nicht bekannt und alternative Metalloporphyrine zu FeTSPP (**8**) zeigten keine NAD(P)H-Oxidase-Aktivität. Außerdem war das Verhalten des Cofaktorregenerierungssystems bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen kaum untersucht.

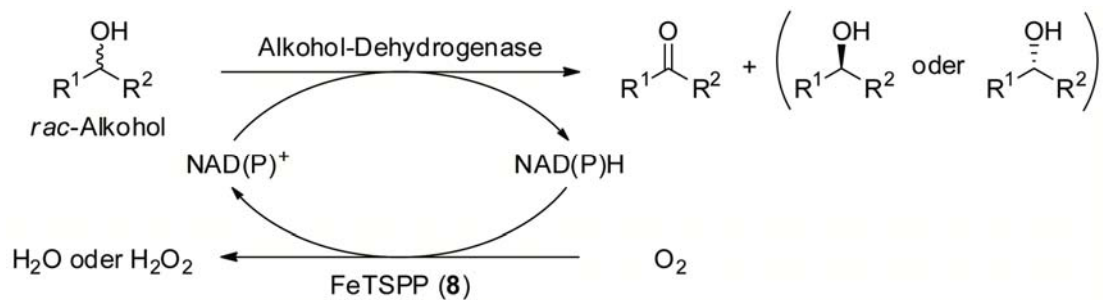
Das Ziel dieser Arbeit ist es, FeTSPP (**8**) als neuartiges Cofaktorregenerierungssystem zu charakterisieren sowie die präparative Anwendungsbreite der Regenerierung von NAD⁺ und NADP⁺ anhand von Oxidationsreaktionen verschiedener Substrate bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zu untersuchen.

Eine Charakterisierung beinhaltet die Bestimmung der Effizienz und der Robustheit von FeTSPP (**8**) als Regenerierungssystem. Zu diesem Zweck sollen Umsatzfrequenzen (TOF-Werte) und Wechselzahlen (TON-Werte) bei verschiedenen Reaktionsbedingungen ermittelt werden. Die Bestimmung der Wechselzahlen erfolgt typischerweise anhand präparativer Umsetzungen. Hierfür muss zunächst ein Benchmark-Versuch als auch eine geeignete Analytik etabliert werden. Die Vorversuche von GRÖGER *et al.* deuten darauf hin, dass **8** entsprechend der Wirkungsweise einer NAD(P)H-Oxidase in der Lage ist Sauerstoff zu aktivieren und zu reduzieren. Daher soll der Frage nach dem Koppelprodukt (Wasser oder Wasserstoffperoxid) nachgegangen werden und darüber hinaus geklärt werden welche Rolle Sauerstoff bei der Cofaktorregenerierung spielt (Schema 5).

Auf Grundlage der etablierten Analytik soll anschließend ausgehend vom Benchmark-Versuch eine Optimierung der bisherigen Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Cofaktorkonzentration, *etc.*) durchgeführt werden. Außerdem soll auf Basis der erhaltenen Daten ein möglicher Reaktionsmechanismus diskutiert werden.

Ein ideales Cofaktorregenerierungssystem ist universell einsetzbar. Daher soll im nächsten Schritt die Anwendungsbreite des Cofaktorregenerierungssystems untersucht werden. Hierzu soll die Kompatibilität von FeTSPP (**8**) mit verschiedenen Substraten und den entsprechenden Oxidoreduktasen in präparativen Umsetzungen getestet werden. Unter

anderem wäre es hierbei interessant, die Oxidation achiraler als auch chiraler Alkohole mittels Alkohol-Dehydrogenasen zu untersuchen und den *proof of concept* für eine Racematspaltung in Kombination mit dem Cofaktorregenerierungssystem aufzuzeigen (Schema 6). Zusätzlich soll ein Vergleich des künstlichen Cofaktorregenerierungssystems **8** mit etablierten Methoden der Cofaktorregenerierung durchgeführt werden.



Schema 6. Konzept der enzymatischen Racematspaltung mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

Für eine breite und effiziente Syntheseanwendbarkeit von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung soll in einer anschließenden Studie eine Prozessoptimierung durchgeführt werden. Zum einen soll hierfür die Skalierbarkeit des Benchmark-Versuches getestet werden. Zum anderen soll die Langzeitaktivität von FeTSPP (**8**) untersucht werden und zusätzlich eine Methode zum Recycling von **8** erprobt werden. Im Rahmen dieser Studie soll ebenfalls die Wechselzahl (*turn over number*) für den Gesamtprozess bestimmt werden.

Parallel zu den Arbeiten mit FeTSPP (**8**) sollen ebenfalls weitere Metalloporphyrine als potentielle biomimetische NAD(P)H-Oxidasen getestet werden. Sowohl ein Austausch des Zentralatoms als auch eine strukturelle Änderung des Porphyrinliganden sind hierbei von Interesse.

3 Stand der Wissenschaft

3.1 Cofaktorregenerierung in der Enzymkatalyse

Die Biokatalyse hat sich zu einem wichtigen Werkzeug zur industriellen Synthese von Bulkchemikalien und Feinchemikalien wie pharmazeutische und agrochemische Zwischenverbindungen, Arzneistoffe und Nahrungsmittelbestandteile entwickelt.^[1,27] Hydrolasen sind dabei die am häufigsten für industrielle Biotransformationen verwendeten Enzyme (Abbildung 1).^[1,28] Ein großer Vorteil der Hydrolasen ist, dass sie unabhängig von teuren Cofaktoren, wie beispielsweise NAD(P)H oder ATP, sind.^[2] Neben Hydrolasen werden oftmals solche Enzyme für industrielle Biotransformationen eingesetzt, bei denen kein externer Zusatz teurer Cofaktoren notwendig ist, wie beispielsweise Laccasen oder Oxidasen aus der Enzymklasse der Oxidoreduktasen (Abbildung 1).^[1]

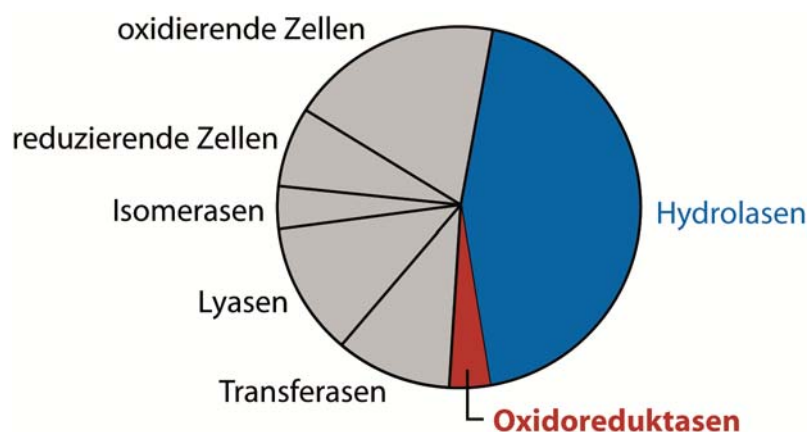


Abbildung 1. Kreisdiagramm über industriell bei Biotransformationen verwendete Enzyme^[1]

Ein enormes, auch für den industriellen Maßstab interessantes Potential für die organische Synthese haben zudem NAD(P)H-abhängige Enzyme aus der Enzymklasse der Dehydrogenasen.^[1,16,28] Diese Enzyme katalysieren Redoxreaktionen, wobei die entsprechenden Redoxäquivalente durch Cofaktoren übertragen werden. Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺/NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺/NADPH) sind mit 80% bzw. 10% die von den bisher bekannten Redoxenzymen am häufigsten verwendeten Cofaktoren. Flavine und Pyrroloquinoline werden dagegen weniger verwendet.^[2] Die Nicotinamid-Cofaktoren (NADH und NADPH) dienen als Hydridionenüberträger und unterscheiden sich strukturell nur durch eine zusätzliche

Phosphatgruppe (Abbildung 2). In der Natur dient dieser Unterschied zur Trennung des Katabolismus und des Anabolismus, weshalb viele Enzyme hochspezifisch für eine der beiden Formen sind.^[12]

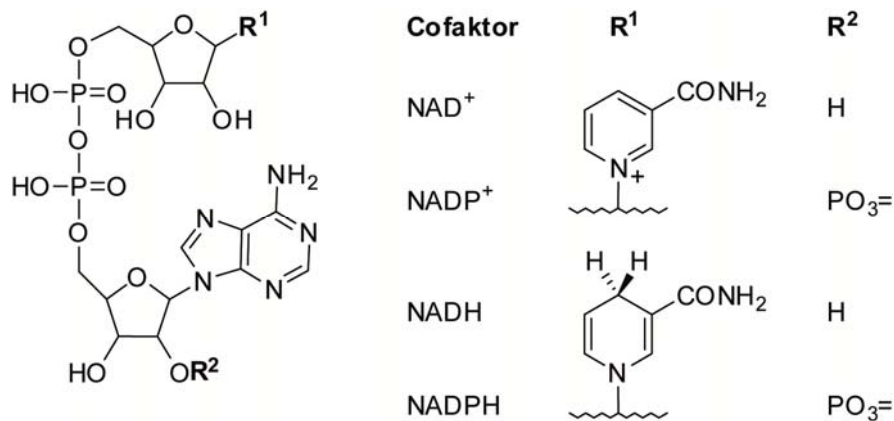


Abbildung 2. Reduzierte und oxidierte Formen der Nicotinamid-Cofaktoren NAD(P)^[29]

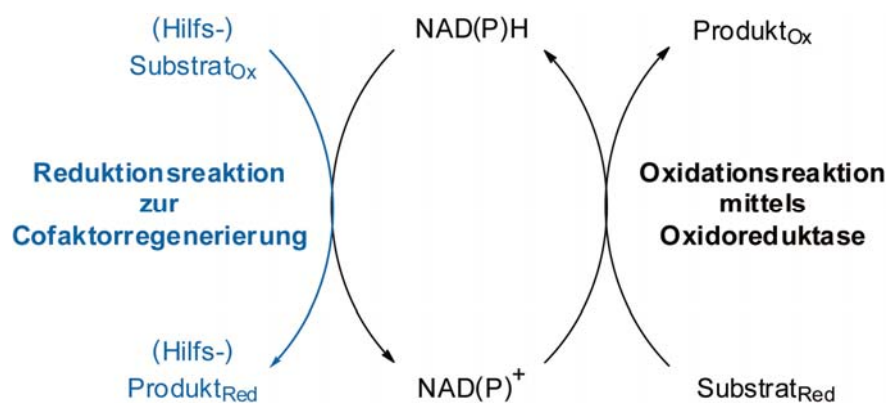
Der technische Einsatz von NAD(P)H-abhängigen Enzymen war lange Zeit stark limitiert. Zum einen aufgrund hoher Kosten für die zusätzlich benötigten Cofaktoren und zum anderen besitzen Oxidoreduktasen teilweise eine niedrige natürliche Substratbreite. Des weiteren erschweren die Verfügbarkeit der entsprechender Biokatalysatoren sowie die Stabilität dieser unter geeigneten Reaktionsbedingungen zusätzlich einen effizienten Einsatz.^[12,27]

Einige dieser Nachteile können durch den Einsatz von „maßgeschneiderten“, rekombinanten Ganzzellkatalysatoren bzw. aufgeschlossenen Zellen als Katalysatoren umgangen werden. Gemäß ihrer Natur enthalten diese Zellen neben dem für die Katalyse benötigten Enzym bereits den erforderlichen Cofaktor sowie das entsprechende Cofaktorregenerierungssystem. Daher werden bisher bei vielen technischen Anwendungen von NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen Ganzzellkatalysatoren verwendet.^[12] Allerdings können Zellen ein Gemisch aus verschiedenen (Iso-)enzymen enthalten, was sich in manchen Fällen negativ auf die Selektivität und die Ausbeute auswirken kann und maßgeschneiderte Zellen sind teilweise nicht immer bzw. nicht immer in ausreichenden Mengen verfügbar. Die Produktivität mikrobieller Umsetzungen ist außerdem in einigen Fällen niedrig, da viele unnatürliche Substrate für lebende Zellen toxisch sind und daher teils nur geringe Substratkonzentrationen verwendet werden können.^[2] Ein weiterer Nachteil liegt in der

großen Menge an Biomasse im Reaktionsmedium, welche die Produktisolierung erschweren kann.^[2]

Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren ein großer Forschungsaufwand betrieben, um einen Zugang zu einer effizienten Verwendung von rekombinanten und zudem „maßgeschneiderten“ Redoxenzymen zu erreichen. Heute steht eine große Auswahl an Techniken, wie beispielsweise das *protein engineering*, zur Verfügung, durch die eine höhere Stabilität sowie eine verbesserte Substratbreite und Enantioselektivität von Enzymen erhalten wurde. Weiterhin wurde die Verfügbarkeit sowie das Recycling der Biokatalysatoren verbessert.^[2,12]

Die hohen Kosten für die benötigten Cofaktoren können dadurch gesenkt werden, dass sie in katalytischen Mengen eingesetzt werden (Schema 7, schwarze Markierung). Dabei wird der verbrauchte Cofaktor *in situ*, unter Zuhilfenahme einer zweiten Redoxreaktion (Schema 7, blaue Markierung), regeneriert.^[2] Das Konzept einer solchen Cofaktorregenerierung wird hier exemplarisch für eine Oxidation von Substrat_{Red} zu Produkt_{Ox} durch eine Oxidoreduktase unter Reduktion des Cofaktors NAD(P)⁺ zu NAD(P)H gezeigt (Schema 7).



Schema 7. Enzymatische Oxidation mit gekoppelter Cofaktorregenerierung. (Indices: Red: reduzierte bzw. oxidierbare Verbindung; Ox: oxidierte bzw. reduzierbare Verbindung)

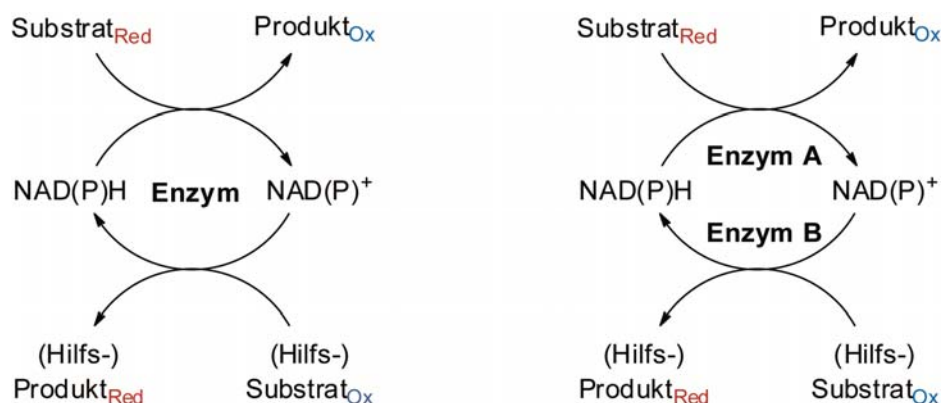
Für eine effiziente industrielle Anwendung sollte ein Cofaktormolekül, je nach Wert des Reaktionsproduktes, $>10^3 - 10^5$ mal regenerierbar sein.^[2,16] Ein ideales Cofaktorregenerierungssystem sollte zudem praktikabel, günstig und möglichst lang stabil sein. Weitere Voraussetzungen sind, dass die benötigten Enzyme und Hilfssubstrate leicht

verfügbar sind und dass keine Nebenreaktionen durch das Regenerierungssystem entstehen. Außerdem sollte die Produktbildung thermodynamisch und kinetisch begünstigt ablaufen und eine einfache Produktisolierung möglich sein.^[15] Inzwischen gibt es eine ganze Bandbreite an Cofaktorregenerierungssystemen mit enzymatischen, chemoenzymatischen, photochemischen und elektrochemischen Strategien.^[15-16,30-31] Nachfolgend werden einige der wichtigsten Methoden zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren und anschließend der oxidierten Cofaktoren beschrieben.

3.1.1 Methoden zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NAD(P)H

3.1.1.1 Enzymatische Cofaktorregenerierung

Enzymatische Ansätze zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren sind die am besten untersuchten Systeme und konnten bisher am meisten überzeugen. Ein Vorteil der enzymatischen Cofaktorregenerierung liegt in der hoch regioselektiven Regenerierung insbesondere bei der Reduktion der Cofaktoren NAD(P)^+ zu NAD(P)H . Zusätzlich sind enzymatische Cofaktorregenerierungsmethoden meist sehr kompatibel mit anderen Reagenzien der enzymatischen Reaktion.^[15,32] Grundsätzlich gibt es zwei Methoden einer enzymatischen Cofaktorregenerierung (Schema 8).^[33]



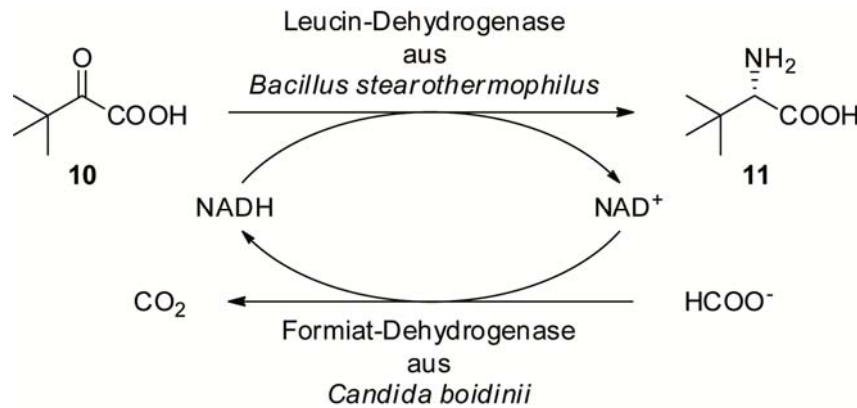
Schema 8. Substrat-gekoppelte (links) und Enzym-gekoppelte (rechts) Cofaktorregenerierung. (Indices: Red: reduzierte bzw. oxidierbare Verbindung; Ox: oxidierte bzw. reduzierbare Verbindung)

Bei beiden Methoden wird ein zusätzliches (Hilfs-)Substrat benötigt, wobei beim „Substrat-gekoppelten“ Ansatz die Bildung des Produktes als auch die Cofaktorregenerierung durch

dasselbe Enzym erfolgt (Schema 8, links). Beim „Enzym-gekoppelten“ Ansatz wird das (Hilfs-)Substrat hingegen durch ein zweites Enzym umgesetzt, um den Cofaktor zu regenerieren (Schema 8, rechts).^[2,15]

Für die Regenerierung der reduzierten Nicotinamid-Cofaktoren NAD(P)H ist bereits eine ganze Reihe an Enzymen etabliert. Eines der am besten untersuchten Enzyme zur Regenerierung von NADH ist die Formiat-Dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2).^[2,15] Dieses kommerziell erhältliche Enzym oxidiert Formiat irreversibel zu Kohlenstoffdioxid, während es gleichzeitig NAD⁺ zu NADH reduziert.^[2,34-35] Das benötigte Substrat ist kostengünstig und ebenfalls wie das gebildete Kohlenstoffdioxid für die meisten Enzyme unschädlich.^[2] Außerdem ist das gebildete Produkt ein inertes Gas, welches leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann, wodurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produktes verschoben wird.^[2,15] Die niedrige spezifische Aktivität der FDH (4 – 6 U mg⁻¹) und die daraus resultierenden ökonomischen Nachteile dieses Regenerierungssystems können durch Immobilisierung des Enzyms oder die Verwendung einer Membran zur Kompartimentierung des Enzyms leicht umgangen werden, sodass bereits *total turnover numbers* (TTN-Werte; Mol Produkt pro Mol Cofaktor) bis 600000 erreicht werden konnten.^[2,36-38]

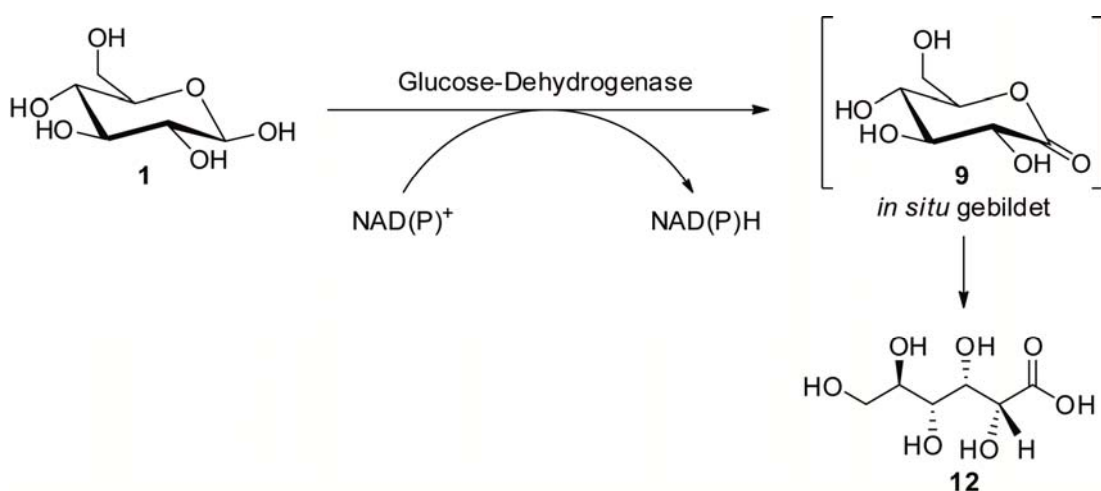
Beispielsweise wurde die *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch eine Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* bei der reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat (**10**) in Anwesenheit einer Leucin-Dehydrogenase (LeuDh, EC 1.4.1.9) aus *Bacillus stearothermophilus* zur Synthese von L-*tert*-Leucin (**11**) mit TTN-Werten von bis zu 125000 durchgeführt (Schema 9).^[35,38-40] Diese Synthese von enantiomerenreinem L-*tert*-Leucin (**11**) war der erste industrielle Prozess eines isolierten Redoxenzym in Kombination mit einer enzymatischen *in-situ*-Cofaktorregenerierung und wurde bereits im Multitonnen-Maßstab durchgeführt.^[15,41] Zwar kann auf diese Weise NADH effizient regeneriert werden, ein großer Nachteil bei Formiat-Dehydrogenasen als Regenerierungssystem ist allerdings, dass NADPH bisher nicht effizient regeneriert werden kann.^[2,15]



Schema 9. Irreversible Cofaktorregenerierung mittels Formiat-Dehydrogenase^[42]

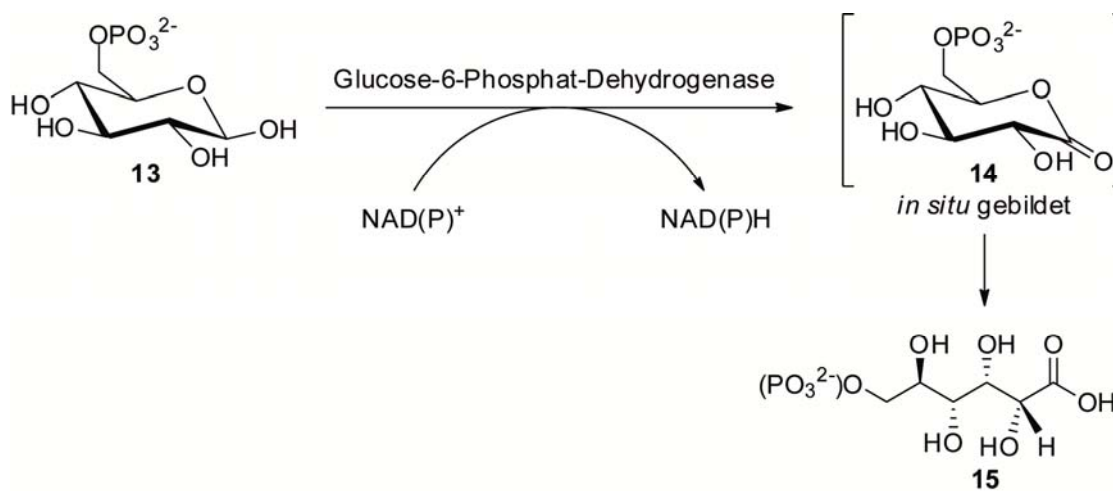
Immerhin wurden bereits mittels *protein engineering* genetisch veränderte Formiat-Dehydrogenasen hergestellt, die in der Lage sind NADPH zu regenerieren, jedoch besitzen diese Enzyme eine zu geringe Stabilität und Aktivität für eine wirtschaftliche Cofaktorregenerierung.^[2,15,43-45]

Eine Alternative zu Formiat-Dehydrogenasen bieten Glucose-Dehydrogenasen (GDH, EC 1.1.1.47). Sie oxidieren β -D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**), wobei NAD^+ oder NADP^+ reduziert wird. Das Lacton **9** hydrolysiert anschließend zu D-Gluconsäure (**12**) wodurch das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschoben wird (Schema 10).^[2] Durch Neutralisation der Säure **12** wird die Reaktion sogar irreversibel.^[25]



Schema 10. Konzept der irreversiblen Cofaktorregenerierung mittels Glucose-Dehydrogenase^[2]

Glucose-Dehydrogenasen besitzen deutlich höhere spezifische Aktivitäten ($20 - 100 \text{ U mg}^{-1}$) als Formiat-Dehydrogenasen ($4 - 6 \text{ U mg}^{-1}$); nachteilig kann jedoch die stöchiometrisch gebildete Menge an D-Gluconsäure (**12**) sein, die als Abfall anfällt und möglicherweise die Produktisolierung erschwert.^[2,15,45] Ebenfalls möglich ist der Einsatz einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH, EC 1.1.1.49).^[2,15] Dieses Enzym oxidiert D-Glucose-6-phosphat (**13**) zu 6-Phosphogluconolacton (**14**), welches anschließend spontan zu 6-Phosphogluconsäure (**15**) hydrolysiert, wodurch das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verschoben wird (Schema 11). Nachfolgende Neutralisation der Säure **15** macht die Reaktion irreversibel.^[2]

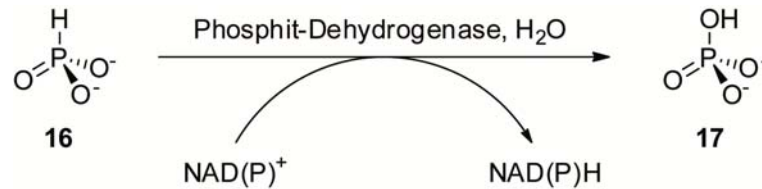


Schema 11. Konzept der irreversiblen Cofaktorregenerierung mittels Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase^[2]

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasen können sowohl NADH als auch NADPH regenerieren, sind relativ stabil und zudem kostengünstig. Jedoch sind die relativ hohen Kosten für D-Glucose-6-phosphat (**13**) nachteilig und die Produktisolierung gestaltet sich in Anwesenheit der gebildeten 6-Phosphogluconsäure (**15**) teilweise problematisch. Außerdem katalysieren sowohl das Substrat **13** als auch das gebildete Produkt **15** die Zersetzung der Cofaktoren NAD(P)H. Alternativ ist es allerdings möglich das Substrat Glucose-6-sulfat, welches leichter herzustellen ist, zu verwenden.^[2,15]

Phosphit-Dehydrogenasen (PTDH, EC 1.20.1.1) wurden vor wenigen Jahren erstmal isoliert und besitzen ein vielversprechendes Potential für die Cofaktorregenerierung.^[15,45] Diese

Enzyme katalysieren die fast irreversible Oxidation des kostengünstigen Substrates Phosphit (**16**) zu Phosphat (**17**) (Schema 12).^[15]

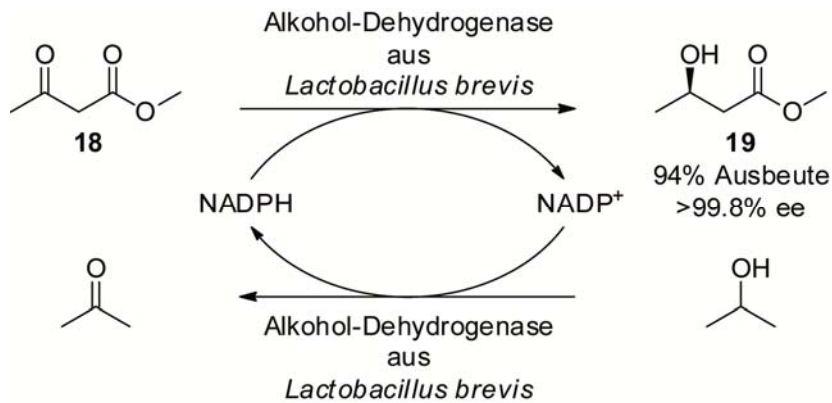


Schema 12. Konzept der Cofaktorregenerierung mittels Phosphit-Dehydrogenase

Das gebildete Produkt ist kompatibel mit den meisten Enzymen und Reagenzien und erschwert die Produktisolierung nicht.^[15] Der Wildtyp der Phosphit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* akzeptiert NADP^+ nur sehr schlecht als Substrat,^[46-47] jedoch konnte eine Mutante hergestellt werden, die NAD^+ und NADP^+ sehr effizient reduziert.^[48] Zusätzlich konnte die Thermostabilität des Enzyms durch gerichtete Evolution deutlich verbessert werden.^[15,49]

Alkohol-Dehydrogenasen sind wichtige Enzyme für die Regenerierung von NADH und NADPH (ADH, EC 1.1.1.1 und 1.1.1.2). Als Substrate dienen die kostengünstigen Alkohole Isopropanol oder Ethanol. Die entsprechenden Produkte Aceton und Acetaldehyd können leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Dadurch kann das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Produkte verschoben werden. Alternativ können die Alkohole im Überschuss eingesetzt werden, um das Gleichgewicht zu beeinflussen, was jedoch häufig die Enzymstabilität beeinträchtigt.^[2,15,50] Im industriellen Maßstab setzt die Wacker AG eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* zur Regenerierung von NADPH ein (Schema 13).^[50-52] Bei diesem Substrat-gekoppelten Verfahren zur Cofaktorregenerierung dient die selbe Alkohol-Dehydrogenase zur effizienten Reduktion von Acetessigsäuremethylester (**18**) für die Synthese von (*R*)-3-Hydroxybutansäuremethylester ((*R*)-**19**) im Multitonnen-Maßstab.^[50-52] Das Gleichgewicht der Reaktion wird bei diesem Prozess durch die Entfernung von Aceton aus dem Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck in Richtung der Produkte verschoben. In einem Downstream-Prozess wird das Produkt nach kontinuierlicher Extraktion und anschließender Destillation mit einer Ausbeute von 94% und einem sehr guten Enantiomerenüberschuß von >99.8% ee erhalten.

Dieser Prozess kann bei einer beeindruckenden Substratkonzentration von 3.7 mol L^{-1} entsprechend 430 g L^{-1} durchgeführt werden.^[2,15,50-52] Die TTN-Werte für den eingesetzten Cofaktor NADP^+ liegen bei ca. 70000.^[51-52]

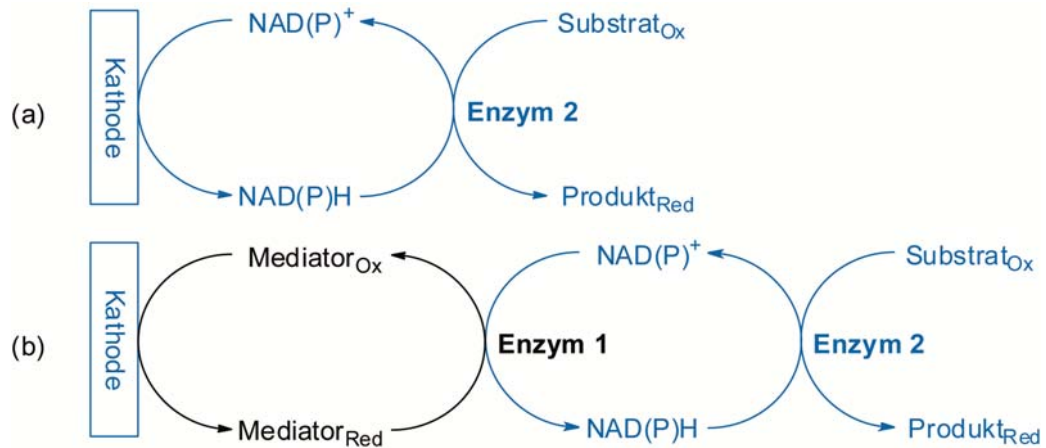


Schema 13. Cofaktorregenerierung mittels einer Alkohol-Dehydrogenase^[50-52]

3.1.1.2 Elektrochemische und chemische Cofaktorregenerierung

Neben den enzymatischen Methoden zur Cofaktorregenerierung zeigen elektrochemische Ansätze vielversprechende Vorteile wie beispielsweise geringe Kosten und die Verwendung von Elektronen zur Regenerierung.^[16,53] Die Abwesenheit eines Hilfssubstrates bzw. eines Coproduktes ermöglicht hierbei eine vereinfachte Produktisolierung.^[15-16,54]

Grundsätzlich gibt es die Methoden des direkten und des indirekten Elektronenübertrages. Der direkte Ein-Elektronenübertrag von der Kathode auf den oxidierten Cofaktor ist grundsätzlich möglich,^[16,55-56] jedoch werden hierbei zum einen meist hohe Potentiale an den Elektroden benötigt und zum anderen werden Cofaktorradikale gebildet (Abbildung 14a). Als Folge der Radikalbildung können Cofaktor-Dimere entstehen, die für enzymatische Prozesse inaktiv sind. Des Weiteren können die hohen Potentiale zu einer Passivierung der Elektroden (Elektroden *fouling*) führen. Als nächster Schritt findet nach der Elektronenübertragung eine Protonierung zur reduzierten Cofaktorform statt. Da diese Protonierung unselektiv abläuft, können neben dem für Enzyme benötigten NAD(P)H auch unbrauchbare Isomere entstehen.^[16,57]

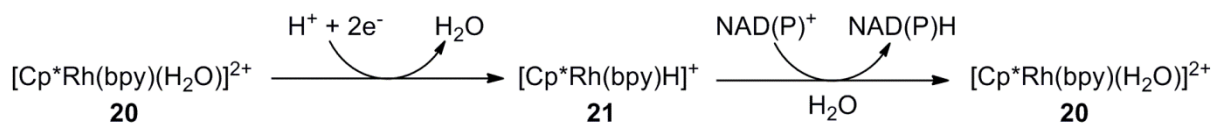


Schema 14. Konzepte der direkten und indirekten elektrochemischen Cofaktorregeneration^[58]

Bei indirekten Methoden zur Cofaktorregenerierung werden die Elektronen von der Kathode zunächst auf einen Mediator übertragen (Abbildung 14b). Dies ermöglicht deutlich mildere Reaktionsbedingungen bei Potentialen größer -0.9 V vs. SCE , (Kalomelektrode (GKE), engl.: *Saturated Calomel Electrode, SCE*), wodurch die Passivierung der Elektrode verringert werden kann. Zusätzlich kann die Bildung von Cofaktorradikalen vermieden werden. Dies kann durch den Einsatz eines zusätzlichen Enzyms geschehen, welches zwei (einzelne) Elektronen von einem Mediator empfängt und als Elektronenpaar (Zwei-Elektronenübertrag) auf den oxidierten Cofaktor überträgt.^[15-16] Zu diesem Zweck wurden beispielsweise die Enzyme Diaphorase (EC 1.6.99.1),^[59] Lipoamid-Dehydrogenase (EC 1.8.1.4),^[60-61] Ferredoxin-NAD(P)-Reduktase (EC 1.18.1.2),^[62] oder die sogenannten AMAPORS (*artificial-mediator-accepting pyridin-nucleotide oxidoreductases*)^[63] eingesetzt. Die Elektronenübertragung von der Kathode auf diese (Regenerierungs)-Enzyme läuft meist über Mediatoren wie Viologen,^[64] Cobalt(III)sepulchrat,^[63] Ferrocen,^[59,65] Flavin,^[66-67] und andere^[68-69] ab.^[15-16]

Vorteilhaft gegenüber einem komplizierten Multienzymsystem ist eine indirekte elektrochemische Reduktion von NAD(P)^+ für eine selektive Cofaktorregenerierung ohne zusätzliche Verwendung eines (Regenerierungs)-Enzyms (Abbildung 14b, Enzym 1).^[16] Hierbei wurden bereits Ansätze mit Ruthenium-Komplexen,^[70] Flavinen^[58,71] und Redoxfarbstoffen wie dem Neutralrot^[72-74] beschrieben.^[16] Bisher konnte jedoch der Rhodium(III)-Komplex $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (**20**) und dessen Derivate von allen Mediatoren am meisten überzeugen.^[75-82] Der Komplex **20** nimmt zunächst ein Proton sowie zwei Elektronen auf und bildet einen katalytisch aktiven Rhodium(II)-Hydrid-Komplex

$[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}]^+$ (**21**). Dieser koordiniert NAD(P)^+ reversibel über dessen Carbonylsauerstoff an das Zentralatom und überträgt ein Hydrid auf den Cofaktor, wodurch hochselektiv NAD(P)H gebildet wird (Schema 15).^[83-85]



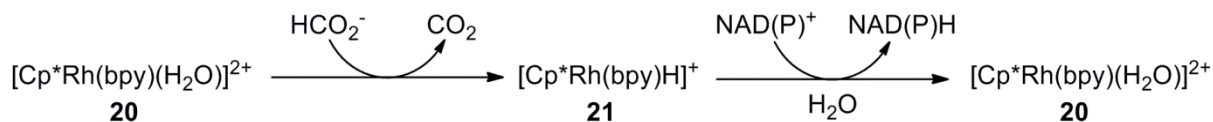
Schema 15. Elektrochemische Cofaktorregenerierung

Aufgrund der räumlichen Anordnung des koordinierten Cofaktors am Rhodium-Komplex verläuft der Hydridübertrag absolut unselektiv zwischen NAD^+ und NADP^+ , sodass beide Cofaktorformen die gleichen kinetischen Werte bezüglich des Hydridübertrages zeigen.^[86-87]

20 ist zudem über einen breiten pH-Bereich einsetzbar und sehr thermostabil.^[16,87]

Nachteilig ist jedoch die deutlich geringere Umsatzfrequenz (TOF) von **20** im Vergleich zu beispielsweise der enzymatischen Cofaktorregenerierung mittels einer Formiat-Dehydrogenase. Bei 30 °C zeigt die Formiat-Dehydrogenase eine Umsatzfrequenz von 2.4 s^{-1} , während der Rhodium-Komplex **20** lediglich eine Umsatzfrequenz von 0.01 s^{-1} hat.^[16,87]

Eine bemerkenswerte Eigenschaft des Rhodium-Komplexes **20** ist, dass dessen katalytisch aktive Form $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}]^+$ (**21**) selbst nicht nur elektronisch regeneriert werden kann, sondern ebenfalls durch chemische Reduktionsäquivalente wie beispielsweise Phosphit,^[88] Alkohole^[89] oder Formiat (Schema 16).^[16]



Schema 16. Chemische Cofaktorregenerierung

In einem Zwei-Phasen-System in Kombination mit Formiat wurden TTN-Werte von 1500 und eine Umsatzfrequenz (TOF) von 0.11 s^{-1} erzielt.^[86,90] Kürzlich wurden außerdem tertiäre Amine als Reduktionsäquivalente in einer indirekten photochemischen Regenerierungsmethode eingesetzt.^[88,91-93]

Eine ganze Reihe weiterer enzymatischer, elektrochemischer, photochemischer und chemischer Ansätze zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NAD(P)H wurden kürzlich in der Literatur zusammengefasst.^[15-16,30-31]

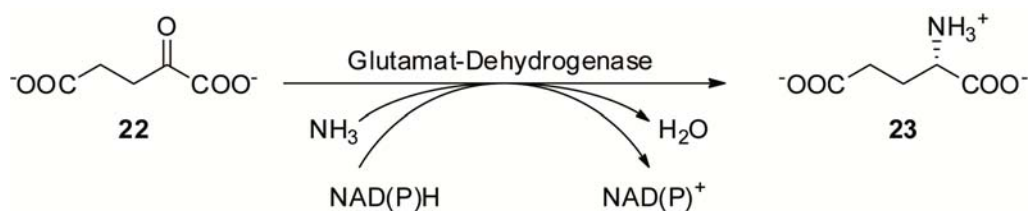
3.1.2 Methoden zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD(P)⁺

Während einige effiziente Methoden zur Regenerierung der reduzierten Nicotinamid-Cofaktoren entwickelt wurden, stehen für die Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD⁺ und NADP⁺ deutlich weniger geeignete Methoden zur Verfügung.^[94] Dem gegenüber steht ein großes Potential interessanter Anwendungsmöglichkeiten NAD(P)⁺-abhängiger Oxidoreduktasen für enzymatische Oxidationen in der organischen Synthese. Neben den meist sehr milden Reaktionsbedingungen enzymatischer Oxidationen ist deren Selektivität ein besonders erwähnenswerter Vorteil gegenüber anderen Methoden zur Oxidation. Einige Beispiele sind die regioselektive Oxidation von Polyolen, kinetische Racematspaltungen durch selektive Oxidation racemischer Alkohole oder Desymmetrisierungen von prochiralen Diolen bzw. von *meso*-Diolen.^[2,12,95] Jedoch stellt eine breite und effiziente Syntheseanwendung bzw. der technische Einsatz der Enzymklasse der Oxidoreduktasen für Oxidationsreaktionen immer noch eine Herausforderung dar, da eine geeignete und effiziente Regenerierung der oxidierten Cofaktoren fehlt. Zum einen laufen enzymatische Oxidationen gewöhnlich bevorzugt bei basischen Bedingungen (pH 8–9) ab, während hingegen die benötigten oxidierten Formen der Nicotinamid-Cofaktoren und einige Produkte wie z.B. Aldehyde bei höheren pH-Werten instabil sind.^[2,32,96-98] Zum anderen neigen Produkte wie Aldehyde und Ketone zur Produktinhibierung, da sie fester an das hydrophobe aktive Zentrum des Enzyms binden als ihre entsprechenden hydrophileren Substrate und damit das aktive Zentrum blockieren können.^[2,99] Zudem können zu hohe Konzentrationen von NAD(P)H ebenfalls das verwendete Enzym inhibieren.^[94,100-101] Ein weiterer Aspekt ist, dass Oxidationen von Alkoholen mit NAD(P)⁺-abhängigen Dehydrogenasen teilweise thermodynamisch ungünstig sind, weshalb die Regenerierung der oxidierten Cofaktoren ebenfalls erschwert wird.^[2] Umso wichtiger ist die Wahl eines geeigneten Cofaktorregenerierungssystems, mit dem idealerweise das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschoben werden kann. Zur Lösung des Problems der

Cofaktorregenerierung gibt es verschiedene enzymatische, elektrochemische, chemoenzymatische und photochemische Ansätze.^[2,15-16]

3.1.2.1 Enzymatische Cofaktorregenerierung mit Dehydrogenasen

Bisher gibt es nur wenige enzymatische Methoden zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren.^[15] Eine häufig verwendete Methode zur Regenerierung der Nicotinamid-Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ ist die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat (**22**) zu L-Glutamat (**23**) mit einer Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) in Anwesenheit von Ammoniak (Schema 17).^[2,15,102-106] Bezogen auf NAD^+ wurden bisher TTN-Werte von 1600 erhalten.^[103,107] Die stöchiometrisch gebildete Menge an L-Glutamat (**23**) erschwert jedoch die Produktisolierung und ist aus atomökonomischer Sicht nachteilig. An Stelle des Substrates α -Ketoglutarat (**22**) kann auch α -Keto adipat verwendet werden. Auf diese Weise entsteht L- α -Amino adipat als Nebenprodukt.^[2,108]

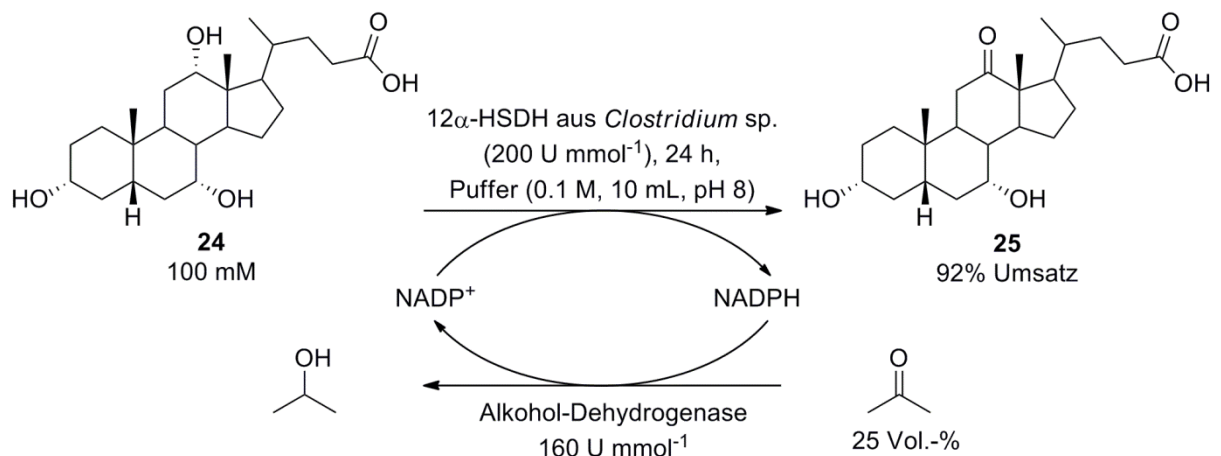


Schema 17. Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mittels Glutamat-Dehydrogenase

Bei einer attraktiven Alternative wird Pyruvat durch das Enzym L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) zu (S)-Lactat reduziert.^[2,15,109-110] Im Gegensatz zur Glutamat-Dehydrogenase besitzt die L-Lactat-Dehydrogenase eine größere spezifische Aktivität ($>2000 \text{ U mg}^{-1}$) und es wurden ebenfalls TTN-Werte >1000 bezogen auf den Cofaktor beschrieben. Nachteilig ist, dass das Enzym nur NADH akzeptiert und das Redoxpotential ungünstiger ist.^[2,15,109-110] Zudem greift Pyruvat den oxidierten Cofaktor nukleophil an und deaktiviert ihn dadurch.^[32,96,111-114] Diese Nebenreaktion wird zusätzlich von der L-Lactat-Dehydrogenase katalysiert.^[96,112-113] An Stelle von Pyruvat kann ebenfalls Glyoxylat als Substrat verwendet werden, welches den Vorteil hat, dass es ein höheres Redoxpotential hat. Jedoch wird dieses Substrat teilweise durch L-Lactat-Dehydrogenase oxidiert.^[110]

Des Weiteren wurde die Verwendung von Alkohol-Dehydrogenasen zur Oxidation von NADH beschrieben. Das hierbei verwendete Substrat Acetaldehyd wird dabei gleichzeitig zu Ethanol reduziert. Vorteilhaft ist hierbei, dass Acetaldehyd und Ethanol flüchtige Komponenten sind, wodurch die Produktisolierung vereinfacht wird. Mit der kostengünstigen Yeast-ADH wurden TTN-Werte von 1000 – 10000 erreicht, jedoch neigt Acetaldehyd zur Selbstkondensation und zur Desaktivierung des verwendeten Enzyms.^[2,15,99]

Ein weiteres geeignetes Substrat zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD(P)^+ in Verbindung mit einer Alkohol-Dehydrogenase ist Aceton. Diese einfache und effiziente Methode hat als einzigen Nachteil, dass teilweise hohe Konzentrationen an Aceton benötigt werden, um das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Zielproduktes zu verschieben.^[115] Enzyme können unter hohen Lösungsmittelkonzentrationen jedoch geschädigt werden. In Kombination mit verschiedenen kommerziell erhältlichen NAD(P)^+ -abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen zur Cofaktorregenerierung wurde beispielsweise die regioselektive Oxidation des Steroids Cholsäure (**24**) zu 12-Ketodesoxycholsäure (**25**) beschrieben (Schema 18).^[105-106,115-116]



Schema 18. Oxidation von Cholsäure (**24**) mit Aceton-gekoppelter Cofaktorregenerierung

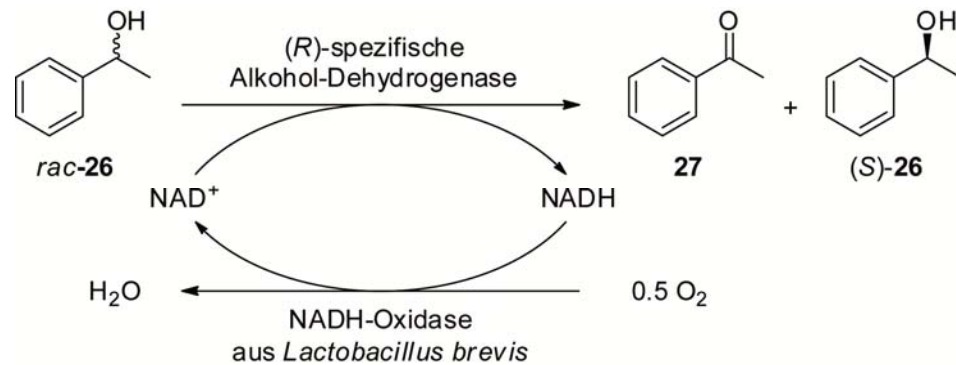
Bei Verwendung des Enzyms 12 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (12 α -HSDH, EC 1.1.1.176) aus *Clostridium* sp. wurde dabei ein Umsatz von 92% erzielt (Schema 18).^[105-106,115-116] Nach Aufreinigung wurde das Produkt **25** mit einer isolierten Ausbeute von 42.5% und einer Reinheit von 99% erhalten. In Anwesenheit von 25 Vol.-% Aceton wurden TON-Werte >1000 für den Cofaktor erhalten und die verwendeten Alkohol-Dehydrogenasen zeigten unter

diesen Bedingungen akzeptable Stabilitäten und Aktivitäten.^[115] Bei Verwendung von Ketonen zur Cofaktorregenerierung, die irreversibel reduziert werden, sind sogar nur äquimolare Mengen an Keton notwendig.^[117]

3.1.2.2 Enzymatische Cofaktorregenerierung mit NAD(P)H-Oxidasen

Bei der Cofaktorregenerierung unter Verwendung von NAD(P)H-Oxidasen (NOX, EC 1.6.3.1) wird Sauerstoff entweder in einer Vier-Elektronen-Reduktion zu Wasser (NOX-1) oder in einer Zwei-Elektronen-Reduktion zu Wasserstoffperoxid (NOX-2) reduziert. Beide Enzyme sind Flavoproteine, allerdings ist bekannt, dass sie nur entfernt miteinander verwandt sind.^[15,118-119] Das bei Verwendung der NOX-2 entstandene Wasserstoffperoxid kann zwar leicht durch den zusätzlichen Einsatz von Katalase (1.11.1.6) zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden, jedoch können teilweise bereits kleine Mengen an Wasserstoffperoxid das Enzym schädigen.^[16,24,120-121] Die enzymatische Oxidation der Cofaktoren NAD(P)H zur Cofaktorregenerierung mit Sauerstoff als Substrat und mit Wasser als einzigem Koppelprodukt erscheint dagegen ideal.^[122-123] Sowohl die Cofaktorregenerierung mit NOX-1 als auch mit NOX-2 verfügen zudem über eine sehr attraktive thermodynamische Triebkraft^[50,107,124] und wurden bereits mehrfach zur Cofaktorregenerierung in enzymgekoppelten Oxidationen von primären und sekundären Alkoholen, α -Hydroxycarbonsäuren oder Aminosäuren eingesetzt.^[17-18,20,124-125]

Beispielsweise wurde die Racematspaltung von *rac*-Phenylethanol (*rac*-**26**) durch eine (*R*)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase erfolgreich mit der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* zur Cofaktorregenerierung gekoppelt (Schema 19).^[15,18] Die verwendete NADH-Oxidase hat eine hohe spezifische Aktivität von 350 U mg⁻¹ und einen K_M-Wert von 24 mM. Als Koppelprodukt bildet das Enzym Wasser. Bei dieser Reaktion wurde das (*R*)-Enantiomer (*R*)-**26** vollständig zu Acetophenon (**27**) oxidiert, wodurch reines (*S*)-Phenylethanol ((*S*)-**26**) erhalten werden konnte.^[15,18]



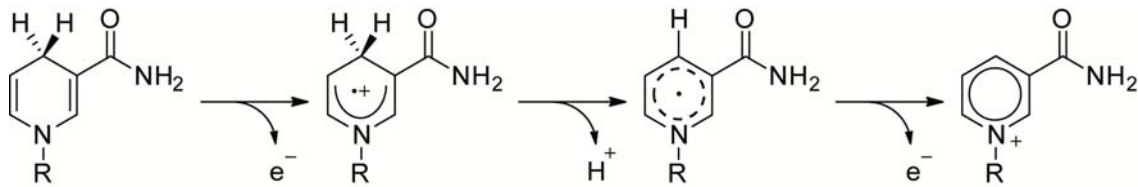
Schema 19. Racematspaltung mit NADH-Oxidase-gekoppelter Cofaktorregenerierung

Der Einsatz von NAD(P)H-Oxidasen ist jedoch häufig durch ihr im Sauren liegendes pH-Optimum begrenzt.^[95] Außerdem besitzen NAD(P)H-Oxidasen teilweise eine eingeschränkte Stabilität gegenüber Sauerstoff, wodurch ihr Einsatz zur Cofaktorregenerierung limitiert ist.^[126-127] In den letzten Jahren wurde eine ganze Reihe neuer NAD(P)H-Oxidasen identifiziert und charakterisiert. Darunter befinden sich thermostabile, Wasser-produzierende NAD(P)H-Oxidasen mit spezifischen Aktivitäten bis 350 U mg^{-1} und mit breitem pH-Optimum, teilweise bis pH 9.^[122,125-126,128] Die K_M -Werte dieser Enzyme bezogen auf NAD(P)H liegen im Bereich von $6.1 - 130 \mu\text{M}$.^[122,125] NAD(P)H-Oxidasen besitzen ein großes Potential, um zukünftig auch im größeren Maßstab effizient zur Cofaktorregenerierung eingesetzt werden zu können. Hierzu müssen allerdings die Stabilität des Enzyms unter Prozessbedingungen und die Verfügbarkeit des Biokatalysators in ausreichenden Mengen gewährleistet sein.^[124-125]

3.1.2.3 Elektrochemische Cofaktorregenerierung

Die elektrochemische Cofaktorregenerierung der oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren NAD(P)^+ zeichnet sich durch einige wesentliche Vorteile gegenüber anderen Ansätzen zur Cofaktorregenerierung aus. Durch die Verwendung einer Anode als Elektronenakzeptor wird keine äquimolare oder im Überschuss eingesetzte Menge eines Cosubstrates benötigt, wodurch diese Herangehensweise eine kostengünstige und umweltfreundliche Methode zur Cofaktorregenerierung darstellt.^[16] Bei der elektrochemischen Oxidation der Cofaktoren NAD(P)H entstehen selektiv die aktiven Cofaktorformen NAD(P)^+ .^[16,129-131] Inaktive Isomere der Cofaktoren, wie bei der elektrochemischen Reduktion von NAD^+ und NADP^+ , werden nicht gebildet und die radikalische Dimerisierung spielt nur eine untergeordnete Rolle.^[16] Im

einfachsten Fall ist es daher möglich den Cofaktor direkt durch anodische Oxidation zu regenerieren (Schema 20).^[16,129-131]



Schema 20. Mechanismus der direkten anodischen Oxidation von NAD(P)H^[16]

Die hohen Überspannungen von über +900 mV vs. NHE (Normalwasserstoffelektrode) beeinträchtigen allerdings die Enzymstabilität und es kann zur Elektrodenpassivierung kommen. Zusätzlich ist diese Methode auf Substrate und Produkte beschränkt, die unter diesen Spannungen stabil sind. Nachteilig bei dieser Methode ist jedoch vor allem die niedrige Geschwindigkeit, mit der die Cofaktoroxidation abläuft. Teilweise wurden die niedrigen Geschwindigkeiten der Cofaktoroxidation durch Vergrößerung der Elektrodenoberfläche verbessert. Eine deutliche Steigerung der Oxidationsgeschwindigkeit wurde durch die Verwendung von Redox-Mediatoren erreicht, wodurch gleichzeitig die hohen Überspannungen erheblich verringert wurden.^[15-16]

Die vielversprechendsten Mediatoren sind zwei-Elektronen-übertragende *ortho*- und *para*-Chinone und deren Derivate.^[16,24,132-139] Sie fungieren als Hydrid-Akzeptoren und können direkt auf der Elektrodenoberfläche angebracht werden, wodurch die benötigte Überspannung erniedrigt wird.^[16,129-131,140-141] Als besonders geeignete Mediatoren erwiesen sich die 1,10-Phenanthrolin-5,6-dione und deren Derivate.^[16,24,30,137,142] Komplextiert an Übergangsmetalle kann deren Elektronendichte verringert werden und gleichzeitig die Löslichkeit vergrößert werden. Dadurch kann das zur Cofaktoroxidation benötigte Oxidationspotential verringert und die Oxidationsgeschwindigkeit gesteigert werden.^[15,142] Um eine Oligo- oder Telomerisation der reduzierten Komplexe zu verhindern, müssen freie Koordinationsstellen des Metallzentrums blockiert werden. STECKHAN *et al.* entwickelten zu diesem Zweck stabile und effiziente Mediatoren wie beispielsweise Tris(1,10-phenanthrolin-5,6-dion)ruthenium(II)-perchlorat (**28**) oder den weiterentwickelten Cobalt-Komplex **29**. Letzterer besteht aus einem 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion-Liganden als katalytisch aktive

Einheit und einem vierzähligen Chelatliganden (Tris(aminoethyl)amin oder Tris(2-pyridylmethyl)amin), zur Blockierung freier Koordinationsstellen des Metallzentrums (Abbildung 3).^[15,137]

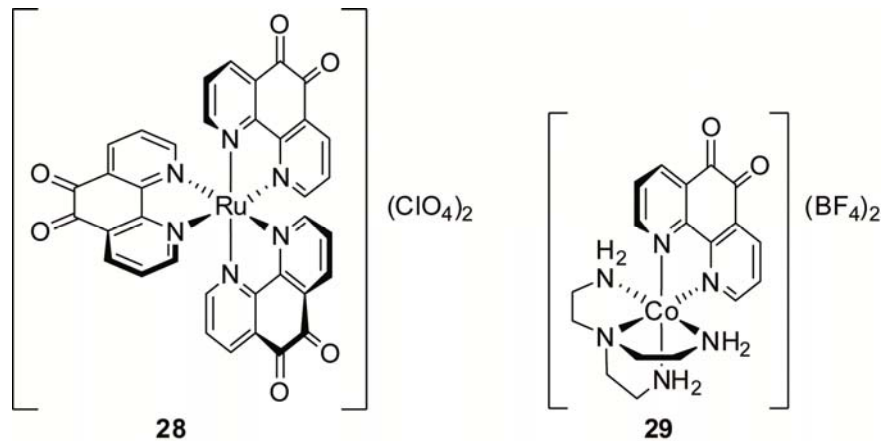
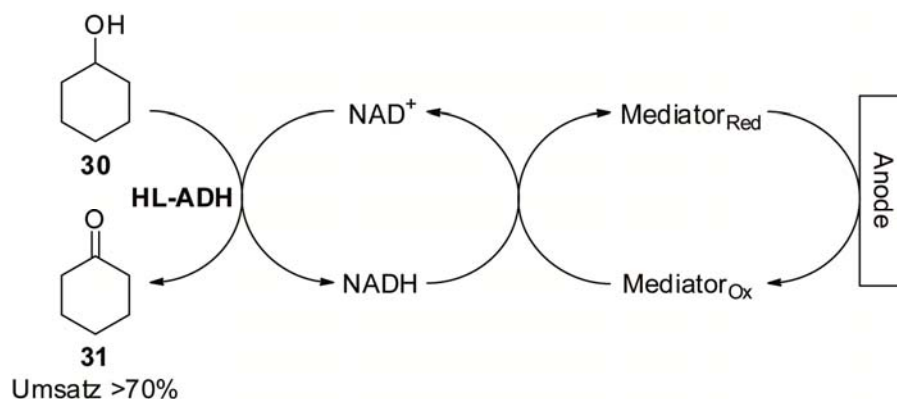


Abbildung 3. Zwei-Elektronen-übertragende Redoxmediatoren von STECKHAN *et al.*^[137]

Diese Regenerierungssysteme wurden u.a. zur Oxidation von Cyclohexanol (**30**) zu Cyclohexanon (**31**) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch eine Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (HL-ADH) katalysiert, bei der gleichzeitig NAD^+ reduziert wird (Schema 21). Es wurde gezeigt, dass die Umsatzfrequenz (TOF) im Gegensatz zu nicht-komplexiertem Phenanthrolineindion um einen Faktor von 14, auf $\text{TOF} = 28 \text{ h}^{-1}$, gesteigert werden konnte. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden wurde ein Umsatz $>70\%$ erhalten.^[15,137]



Schema 21. Mediator-katalysierte Cofaktoroxidation

Neben diesen Hydrid-Akzeptoren gibt es eine Reihe von ein-Elektronen-Akzeptoren, wie beispielsweise Übergangsmetallkomplexe,^[138,143] Viologen,^[144] Heteropolyanionen,^[145]

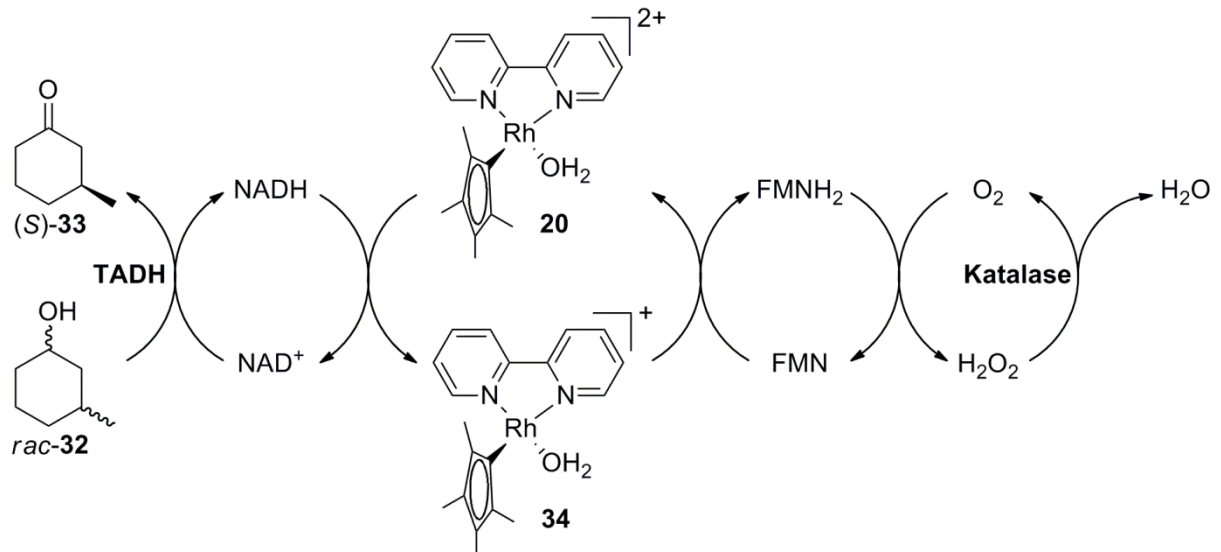
leitende Polymere,^[146] oder ABTS (Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure).^[16,23,107,147] In Kombination mit Diaphorase oder anderen Elektronentransfer-Proteinen konnten die teilweise langsamen Elektronenübertragungen zwischen Anode und Mediator beschleunigt werden.^[22,148-150]

Grundsätzlich besitzt die elektrochemische Oxidation der Nicotinamid-Cofaktoren zur Cofaktorregenerierung ein großes Potential. Die Verwendung einer Anode zur Oxidation bietet prinzipiell eine ökonomisch und ökologisch attraktive Alternative zu anderen Regenerierungsansätzen.^[16] Im Gegensatz zur direkten Oxidation an der Anode können bei indirekten Methoden niedrigere Spannungen verwendet werden und die niedrigen Regenerierungsgeschwindigkeiten konnten teilweise erhöht werden. Einige Mediatoren sind jedoch unter den üblichen Reaktionsbedingungen relativ instabil.^[96,138,147] Insgesamt sind elektrochemische Ansätze zur Regenerierung oxidierten Cofaktoren mit TTN-Werten <1000 und meistens sogar <100 bisher noch nicht überzeugend^[16,126] und die technische Realisierung einer elektrochemischen Cofaktorregenerierung im industriellen Maßstab wurde noch nicht beschrieben.^[15]

3.1.2.4 Chemische Cofaktorregenerierung

Molekulare Architektur zum Design biomimetischer und redoxaktiver Metallkomplexe mit einstellbarer Aktivität, Selektivität und hoher Stabilität könnte helfen, ein System zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD(P)⁺ zu entwerfen. Idealerweise ist ein solches System kompatibel mit den optimalen Reaktionsbedingungen des Produktionsenzym und ist generell zur Regenerierung sowohl von NAD⁺ als auch von NADP⁺ anwendbar.

Bereits 1973 verwendeten JONES *et al.* Pyridiniumsalze und Derivate des Flavins erfolgreich zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung im präparativen Maßstab.^[151] In zahlreichen Beispielen wurde daraufhin FMN (Flavinmononukleotid) erfolgreich zur Regenerierung von NAD⁺ eingesetzt. Allerdings verlief die Hydridübertragung nur sehr langsam (wenige katalytische Umsätze pro Tag) und FMN musste im Überschuss eingesetzt werden.^[30,152-155] Deutlich schneller (wenige Umsätze pro Stunde) verläuft die Hydridübertragung vom Cofaktor zum Flavin in Gegenwart des Mediators [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺ (**20**) (Schema 22).^[16,90]

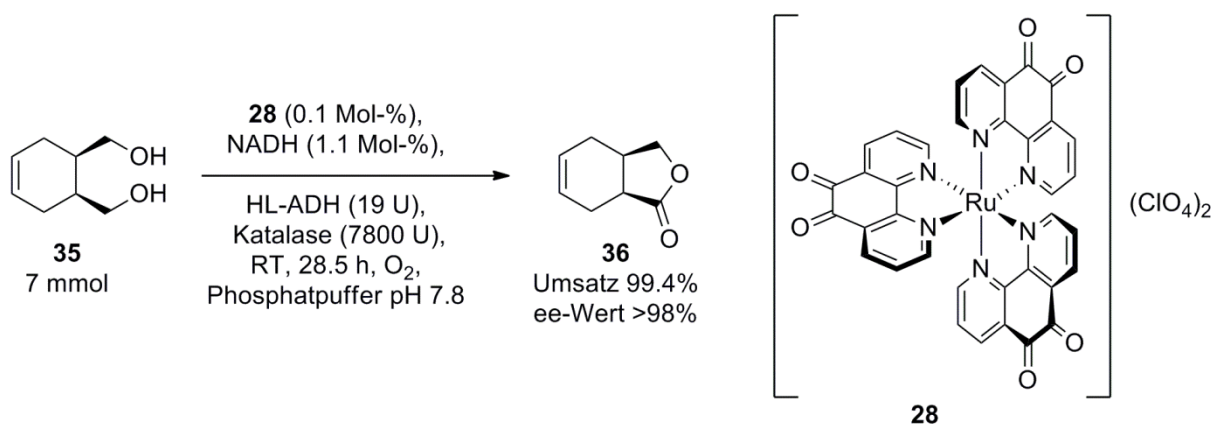


Schema 22. Cofaktorregenerierungssystem bestehend aus $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (**20**)/FMN/O₂

Das dabei reduzierte Flavin (FMNH₂) wird anschließend in Anwesenheit von Sauerstoff wieder oxidiert und kann dadurch in katalytischen Mengen eingesetzt werden. Das durch die Reduktion von Sauerstoff entstehende Wasserstoffperoxid kann schließlich durch den Einsatz einer Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden. Im präparativen Maßstab wurde dieses Cofaktorregenerierungssystem erfolgreich mit der Oxidation von *rac*-3-Methyl-cycloheptanol (*rac*-**32**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermus* sp. kombiniert.^[90] TTN-Werte von 0.5 bezüglich des Cofaktors und maximal 56 bezüglich des Rhodium-Komplexes **20** sind jedoch nicht überzeugend. Interessanterweise wurde der gleiche Komplex **20** ebenfalls zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren verwendet (siehe 3.1.1.2).^[75-82]

Die bereits bei der elektrochemischen Cofaktorregenerierung (siehe 3.1.2.3) beschriebenen Phenanthrolindione und deren Derivate wurden ebenfalls zur biomimetischen Cofaktorregenerierung, im Sinne einer künstlichen NAD(P)H-Oxidase, eingesetzt.^[24,137] Am besten eignete sich dabei Tris(1,10-phenanthrolin-5,6-dion)ruthenium(II)-perchlorat (**28**) zur Oxidation der reduzierten Nicotinamid-Cofaktoren. Im präparativen Maßstab wurde beispielsweise das Diol **35** in Anwesenheit einer Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (HL-ADH) zum entsprechenden Lacton **36** oxidiert, wobei gleichzeitig NAD⁺ zu NADH reduziert wurde (Schema 23). Bei der Regenerierung des oxidierten Cofaktors durch **28** wird dieser selbst reduziert. Der reduzierte Ruthenium-Komplex wird anschließend in

Anwesenheit von Sauerstoff wieder oxidiert und kann dadurch, wie auch der Cofaktor, in katalytischen Mengen eingesetzt werden. Bei diesem Prozess wurde ein TTN-Wert von 90 bezüglich des Cofaktors und ein TTN-Wert von 900 bezüglich des Ruthenium-Komplexes **28** erreicht. Bezogen auf die Reaktionszeit von 28.5 Stunden entspricht das für **28** einer Umsatzfrequenz (TOF) von 62 Umsätzen Stunde⁻¹. Das als Koppelprodukt entstehende Wasserstoffperoxid kann durch den Einsatz von Katalase abgebaut werden.

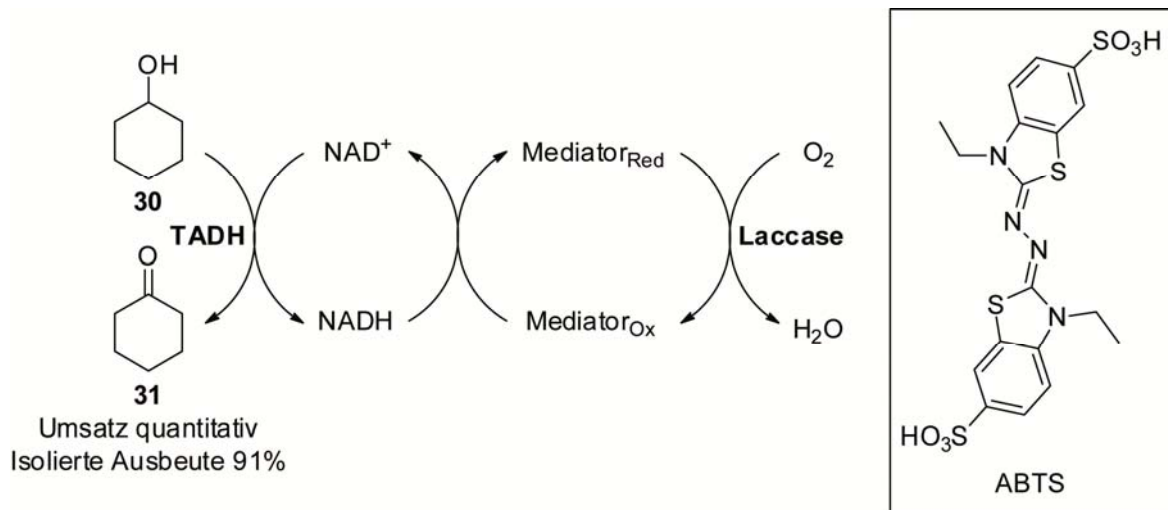


Schema 23. Enzymatische Oxidation gekoppelt mit einer biomimetischen NAD(P)H-Oxidase (**28**)

Der unkomplexierte Mediator Phenanthren-9,10-dion wurde ebenfalls erfolgreich zur Regenerierung von NAD⁺ und NADP⁺ in präparativen Umsetzungen eingesetzt.^[22] Quantitative produktbezogene Umsätze bei pH 8 und gute Umsatzfrequenzen von >70 Umsätzen Stunde⁻¹ wurden unter aeroben Bedingungen erreicht. Bezüglich des Mediators wurden TTN-Werte von knapp 1000 erreicht; bezogen auf die Cofaktoren NAD⁺ und NADP⁺ wurden entsprechend TTN-Werte von 125 und 40 erhalten. Die Cofaktorregenerierung mittels Phenanthren-9,10-dion als stabile, biomimetische NAD(P)H-Oxidase ist ein vielversprechender Ansatz. Nachteilig ist jedoch, dass als Koppelprodukt Wasserstoffperoxid entsteht.^[22]

Alternativ zu den bisher beschriebenen Cofaktorregenerierungssystemen wurde ein Laccase-Mediator-System zur Cofaktorregenerierung von NAD(P)⁺ vorgestellt, bei dem kein Wasserstoffperoxid, sondern Wasser als Koppelprodukt gebildet wird.^[107] In einem Modellsystem wurde beispielsweise Cyclohexanol (**30**) in Anwesenheit der

Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermus* sp. ATN1 (TADH) zu Cyclohexanon (**31**) oxidiert (Schema 24).^[107,156]



Schema 24. ABTS-katalysierte Cofaktorregenerierung

Der reduzierte Cofaktor wird anschließend durch den Mediator ABTS wieder oxidiert, wobei der Mediator selbst reduziert wird. Schließlich regeneriert die Laccase aus *Myceliophthora thermophila* (EC 1.10.3.2) den Mediator wieder unter gleichzeitiger Reduktion von Luftsauerstoff zu Wasser. Unter nicht-optimierten Reaktionsbedingungen wurden bereits TON-Werte >300 bezüglich des Cofaktors sowie TON-Werte >16000 bezüglich des Mediators erhalten.^[107] Dieses vielversprechende Regenerierungssystem ist anderen Systemen in vielen Punkten überlegen, allerdings erreicht es noch nicht die TTN-Werte der meisten Glutamat-Dehydrogenase-katalysierten Methoden mit TTN-Werten >1000.^[107]

Kürzlich wurde ein entsprechendes Laccase-Mediator-System zur Cofaktorregenerierung beschrieben, bei dem Meldolablu (MB) anstelle von ABTS den reduzierten Cofaktor oxidiert.^[126] In Kombination mit der Oxidation von Cholsäure (**24**) wurden in Anwesenheit einer Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Bacteroides fragilis* (7 α -HSDH, EC 1.1.1.159), bei pH 6.5, TTN-Werte bis 180 für NAD⁺ und TTN-Werte bis 945 für den Mediator erhalten. Die Umsatzfrequenzen lagen hierbei bei 20 h⁻¹ bezogen auf den Cofaktor bzw. bei 102 h⁻¹ bezogen auf Meldolablu. Alle verwendeten Komponenten zeigen unter den Reaktionsbedingungen eine hohe Stabilität.^[126] Ein Nachteil bei diesem System ist die Einschränkung auf ein saures Reaktionsmedium.

Die hier diskutierten biomimetischen, chemokatalytischen und Laccase-Mediator-katalysierten Systeme zur Cofaktorregenerierung sind interessante Alternativen zu enzymatischen Systemen. Die irreversible Reduktion von molekularem Sauerstoff hat einen positiven Einfluss auf thermodynamisch ungünstige Reaktionen. Jedoch bilden viele Systeme Wasserstoffperoxid als Koppelprodukt. Die Laccase-Mediator-basierten Systeme produzieren hingegen Wasser als Koppelprodukt.

3.1.3 Zusammenfassung und Aussicht

Für die Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH gibt es inzwischen einige effiziente Methoden mit hohen TTN-Werten. Dadurch konnte der Kostenfaktor bezüglich der Cofaktoren für enzymatische Reduktionsprozesse mit isolierten Enzymen gesenkt werden und auch technische Anwendungen wurden bereits beschrieben.^[12,15,22,157-160]

Im Gegensatz dazu ist die Cofaktorregenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ technologisch noch nicht ausgereift.^[22,94,111,161] Obgleich eine ganze Reihe von Ansätzen zur Regenerierung oxidierten Cofaktoren besteht, stellt die Regenerierung dieser Cofaktoren für eine breite und effiziente Anwendung isolierter NAD(P)^+ -abhängiger Oxidoreduktasen für Oxidationsprozesse immernoch eine Herausforderung dar. Einfache Immobilisierungstechniken zur Erhöhung der Enzymstabilität und zur Wiederverwendung des entsprechenden Biokatalysators, kombiniert mit einer geeigneten Reaktor-unterstützten Prozessführung zur Vermeidung von Enzyminhibierung und thermodynamischen Problemen, könnten zukünftig wesentlich dazu beitragen NAD(P)^+ -abhängige Oxidationen effizient zu verwirklichen.^[123]

3.2 Das Eisen(III)-porphyrin FeTSPP (**8**)

In der Natur besitzen Häme als eisenporphyrinhaltige prosthetische Gruppen zahlreicher Enzyme eine außergewöhnliche Vielfalt an Funktionen.^[162] Sie sind unter anderem an Oxidationsreaktionen der Cytochrome oder in Zusammenhang mit Globin an der Sauerstoffaufnahme im Blut beteiligt. Synthetische Eisenporphyrine sind als biomimetische Katalysatoren Gegenstand umfangreicher Untersuchungen und konnten erfolgreich in unterschiedlichen Reaktionen eingesetzt werden.^[163-164]

Porphyrine sind hydrophobe Moleküle und somit wasserunlöslich. Um Eisenporphyrine im wässrigen Medium als biomimetische Modellverbindungen von Enzymen untersuchen zu können, ist es notwendig die Hydrophilie der entsprechenden Porphyrine durch Einführung polarer oder ionischer Gruppen zu erhöhen.^[162] Als kationischer Vertreter unter den wasserlöslichen Eisenporphyrinen wurde FeTSPP (**8**) (5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid) ausführlich untersucht, da es sehr stabil ist und in wässriger Lösung nicht aggregiert (Abbildung 4).^[165]

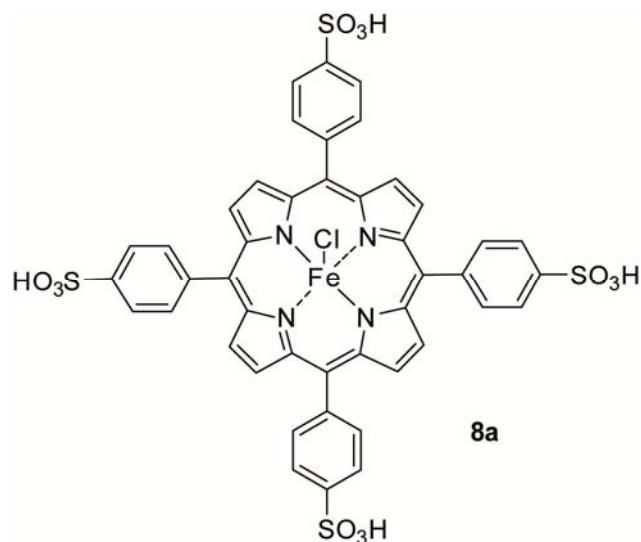
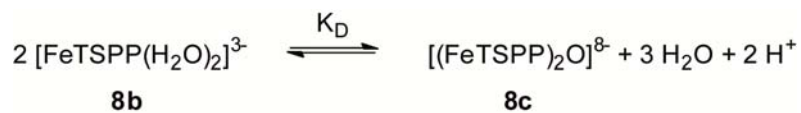


Abbildung 4. 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**8a**); Die verschiedenen Formen von FeTSPP (**8**) sind im Appendix erläutert

3.2.1 Eigenschaften von FeTSPP (**8**)

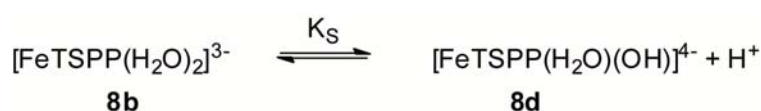
Die Synthese und Charakterisierung von FeTSPP (**8**) wurde erstmals 1971 von FLEISCHER *et al.* beschrieben.^[166] Die Phenylsubstituenten am Porphyringrundkörper in *meso*-Position stehen im Wässrigen fast senkrecht zu der vom Porphyrinliganden vorgegebenen Ebene und verhindern bei pH > 3 weitgehend Aggregation einzelner Eisen(III)-porphyrine untereinander.^[166-168] Aufgrund der Sulfonsäuregruppen ist das Porphyrin zudem sehr gut wasserlöslich. In wässriger Lösung liegt **8** in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen Monomer- (**8b**) und Dimerform (**8c**) vor (Schema 25).^[166]



Schema 25. Dimerisierungsgleichgewicht von **8**. (Zur Struktur von **8b-c** siehe Schema 27.)

Während das Monomer **8b** im Säuren vorliegt, liegt **8** in basischer Lösung als μ -oxo-verbrücktes Dimer **8c** vor. Anhand des Absorptionsspektrums lassen sich die beiden Spezies gut unterscheiden. Die Soret-Bande des Monomer **8b** liegt bei 392 nm^[166] bis 395 nm^[169] und die Q-Banden bei 528 nm^[166] und 680 nm.^[166] Die Soret-Bande des Dimers **8c** liegt hingegen bei 410 nm^[169] bis 415 nm^[166] und die entsprechenden Q-Banden bei 565 nm^[166] und 606 nm.^[166]

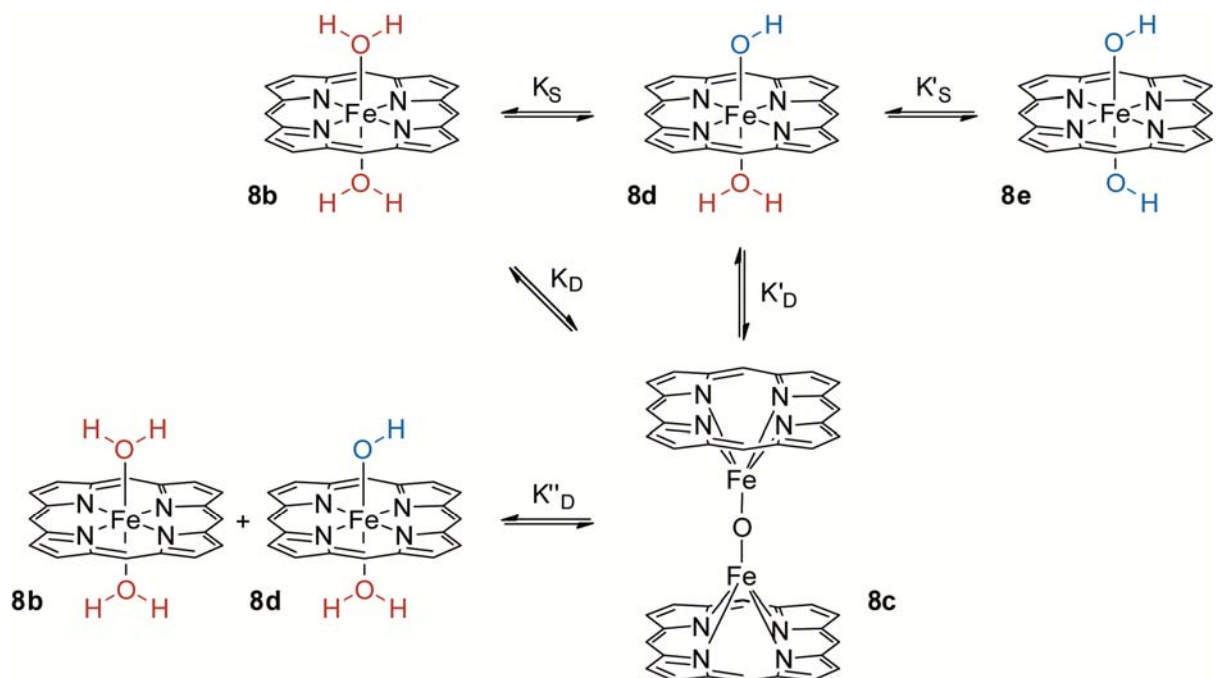
Mittels Temperatur-Sprung-Experimenten erhielten SUTTER *et al.* Hinweise auf ein weiteres Gleichgewicht, welches bei der Bildung des Dimers **8c** eine Rolle spielt und postulierten ein Deprotonierungsgleichgewicht zwischen den Monomeren **8b** und **8d** (Schema 26).^[167] Im Vergleich zur Dimerbildung mit Relaxationszeiten im 100-Millisekunden-Bereich ist das Deprotonierungsgleichgewicht mit Relaxationszeiten im Mikrosekunden-Bereich wesentlich schneller.^[167]



Schema 26. Deprotonierungsgleichgewicht zwischen **8b** und **8d**. (Zur Struktur von **8b** und **8d** siehe Schema 27.)

WILKINS *et al.* charakterisierten erstmals das monomere Monohydroxyintermediat **8d** bei Kinetikuntersuchungen der Dimerbildung mittels *pH-Sprung-stopped-flow*-Experimenten.^[169] Das Absorptionsspektrum von **8** wurde bei diesen Messungen mittels *rapid-scan*-Technik aufgenommen und eine Verschiebung der Soret-Bande von 395 nm für **8b** nach 413 nm für **8d** beobachtet. Q-Banden für **8d** wurden bei 413 nm^[169] (bzw. 414 nm^[170]) und 645 nm^[169] (bzw. 650 nm^[170]) gefunden. Der pK_S-Wert für das Monomer **8b** wurde von WILKINS *et al.* auf 6.5 – 7.0 ± 0.2 (für Ionenstärken zwischen 0.3 – 1.0 M) bestimmt.^[169]

Der Frage nach der Art der axialen Liganden der verschiedenen FeTSPP-Spezies in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert gingen IVANCA *et al.* mittels NMR-Messungen nach.^[168] Neben dem Monomer [FeTSPP(H₂O)₂]³⁻ (**8b**) und dem Dimer [Fe(TSPP)₂O]⁸⁻ (**8c**) ist ebenfalls das Monomer [FeTSPP(H₂O)(OH)]⁴⁻ (**8d**) im ¹H-NMR-Spektrum nachweisbar. [FeTSPP(H₂O)₂]³⁻ (**8b**) ist im Säuren bis pH = 6.84 detektierbar und [FeTSPP(H₂O)(OH)]⁴⁻ (**8d**) zwischen pH = 4.94 und 6.84. Das Dimer **8c** wird ab einem pH-Wert von 4.54 gebildet. Die NMR-Daten deuten auf sechsfach koordinierte *high-spin*-Fe(III)-Monomere **8b** und **8d** und einen antiferromagnetischen Dimer **8c** mit fünffach koordinierten Fe(III)-Atomen hin.



Schema 27. In wässriger Lösung postulierte Spezies von FeTSPP (**8**) in Abhängigkeit vom pH-Wert.^[168] (Die *meso*-ständigen Sulfonatophenylgruppen werden für eine bessere Übersicht im Schema nicht berücksichtigt. Die vollständige Struktur von **8** ist in Abbildung 4 gezeigt.)

Die Gleichgewichtskonstanten sind stark von der Ionenstärke I und der Temperatur sowie von der Gesamtkonzentration des Porphyrins **8** abhängig.^[166-167] Bei 25 °C wurden pK_D -Werte zwischen 8.1 und 9.6 beschrieben ($I = 0.1$).^[166,168-169] Die pK'_D -Werte bei diesen Bedingungen wurden auf -3.8 bzw. -5.9 bestimmt und die pK''_D -Werte auf 1.1 bzw. 2.9.^[168-169] Bei höheren Ionenstärken wurden niedrigere pK_D -Werte von 6.5 ($I = 1.0$) und 7.3 ($I = 0.3$) bzw. 9.0 ($I = 0.2$) erhalten.^[166,168-169]

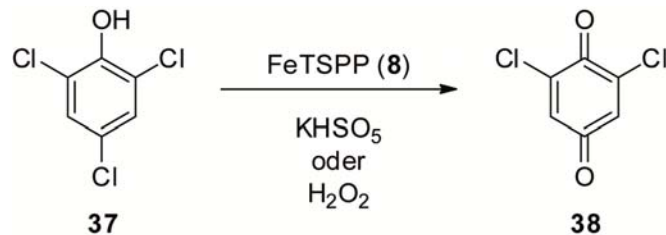
Aufbauend auf Untersuchungen von HUNT *et al.* studierten VAN ELDIK *et al.* mittels Hochdruck-NMR-Versuchen die Wasseraustauschreaktion von **8b**.^[171-172] Der TSPP-Ligand von **8** hat besonders aufgrund seiner Ladung, aber auch wegen sterischer Effekte einen labilisierenden Einfluss auf die axialen H_2O -Liganden. Das erhaltene Aktivierungsvolumen $\Delta V^\ddagger = 7.9 \pm 0.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ deutet auf einen dissoziativen *interchange* Mechanismus hin und auch die hohe Aktivierungsentropie ($\Delta S^\ddagger = 99 \pm 10 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) ist ein Hinweis für einen dissoziativen Mechanismus. Die Aktivierungsenthalpie wurde auf $\Delta H^\ddagger = 67 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt.^[171-172]

3.2.2 Anwendungen von FeTSPP (**8**)

Anhand von ausgewählten Beispielen wird im Folgenden ein Überblick über typische synthetische Anwendungen des wasserlöslichen Eisen(III)-porphyrins FeTSPP (**8**) gegeben. Eine Vielzahl weiterer Beispiele mit **8**, Derivaten von **8** oder anderen wasserlöslichen und wasserunlöslichen Metalloporphyrinen sind in der Literatur beschrieben.^[162-164,173]

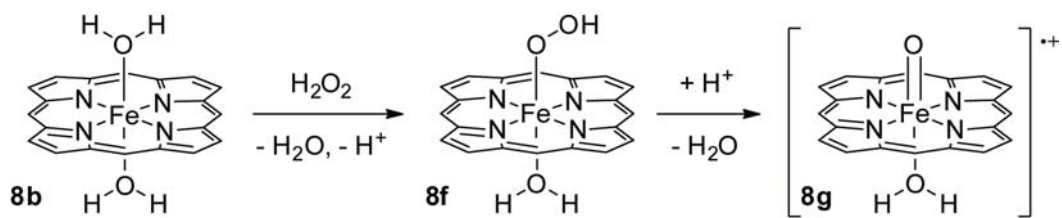
Eine häufig beschriebene Anwendung von FeTSPP (**8**) ist die katalytische Oxidation unterschiedlicher Verbindungen in Anwesenheit von Peroxiden (meist Wasserstoffperoxid oder Kaliummonopersulfat ($KHSO_5$)).^[163-164,174] MEUNIER *et al.* untersuchten beispielsweise den oxidativen Abbau einiger Organohalogen-Verbindungen in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) als biomimetische Ligninase durch Kaliummonopersulfat oder Wasserstoffperoxid.^[175-177] Zur Verbindungsgruppe der Organohalogen-Verbindungen gehören anthropogene Schadstoffe wie 2,4,6-Trichlorphenol (**37**), die teilweise mikrobiell nur sehr schlecht oder sogar überhaupt nicht abgebaut werden können und im Gewebe von Tieren und Pflanzen bioakkumulieren.^[175-176] Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass Ligninasen in der Lage sind

Organohalogen-Verbindungen abzubauen.^[175-176] Beispielsweise wurde 2,4,6-Trichlorophenol (**37**), ein Schadstoff der hauptsächlich in Abwässern von Papierfabriken gefunden wird, durch oxidative Dechlorierung zum entsprechenden Chinon **38** abgebaut (Schema 28).^[175-177] Hierbei wurde das Produkt **38** mit Umsätzen von 68% bzw. 95% bei Einsatz von H₂O₂ bzw. KHSO₅ als Oxidationsmittel erhalten.



Schema 28. FeTSPP-katalysierte Oxidation von 2,4,6-Trichlorophenol (**37**)

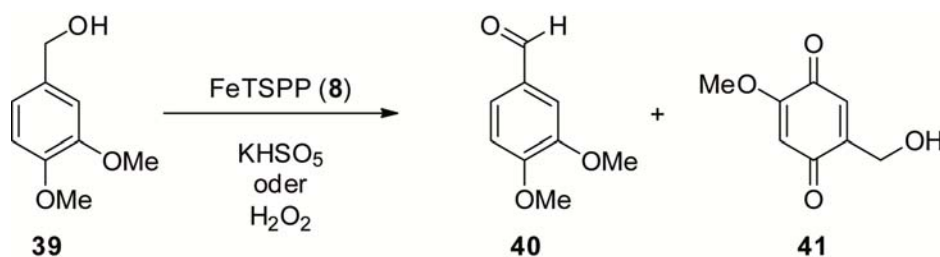
Im Rahmen mechanistischer Untersuchungen zu dieser Oxidation postulierten LENTE *et al.*, dass FeTSPP (**8**) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid einen reaktiven Eisen-Hydroperoxo-Komplex **8f** bildet, aus dem anschließend in geringeren Mengen eine Eisen(IV)-Oxo-Spezies **8g** entstehen kann (Schema 29).^[174] In Gegenwart von Kaliummonopersulfat wird **8g** direkt aus **8b** gebildet. Die Zwischenverbindung **8f** wird mit Kaliummonopersulfat nicht gebildet.^[174] Im Gegensatz dazu wird das Eisen(III)-porphyrin **8** in Abwesenheit eines oxidierbaren Substrates durch Wasserstoffperoxid selbst irreversibel oxidiert und zerstört.^[174]



Schema 29. Postulierte reaktive Zwischenverbindungen von FeTSPP (**8**). (Die *meso*-ständigen Sulfonatophenylgruppen werden für eine bessere Übersicht im Schema nicht berücksichtigt. Die vollständige Struktur von **8** ist in Abbildung 4 gezeigt.)

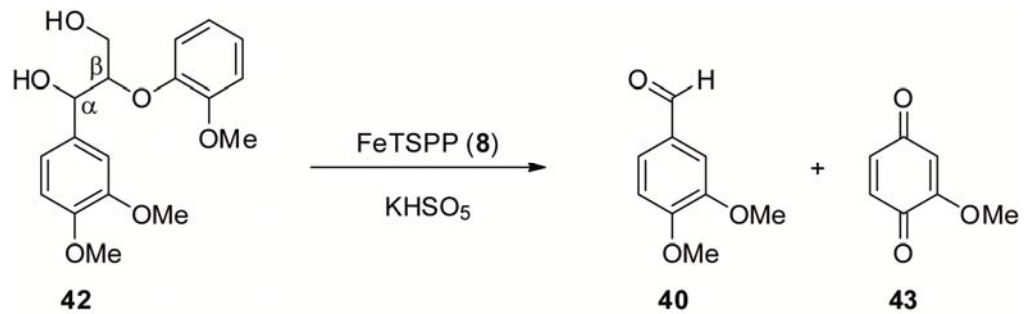
Als biomimetische Ligninase wurde FeTSPP (**8**) ebenfalls eingesetzt, um Lignin-Modellverbindungen abzubauen.^[177] Der Abbau von Lignin ist ein Schlüsselschritt in der industriellen Papierherstellung.^[177] LABAT und MEUNIER beschrieben beispielsweise die

Oxidation von Veratrylalkohol (**39**) in Anwesenheit von **8** und Wasserstoffperoxid oder Kaliummonopersulfat zu Veratrumaldehyd (**40**) und 2-Methoxy-5-(hydroxymethyl)-1,4-benzochinon (**41**) (Schema 30).^[177-178] Die besten Ergebnisse wurden bei pH 3 erhalten, wobei angenommen wird, dass bei diesen Bedingungen die Spaltung der inaktiven μ -Oxo-Dimerform von **8** bevorzugt ist. Bei Verwendung von Wasserstoffperoxid wurde ein Umsatz von 5% erhalten, wohingegen ein Umsatz von 67% bei Verwendung von Kaliummonopersulfat erreicht wurde. FeTSPP (**8**) immobilisiert auf Amberlit wurde ebenfalls als Katalysator getestet. Hierbei wurde bei Verwendung von Kaliummonopersulfat ein Umsatz von 50% erhalten und nach Recycling des Katalysators konnten 95% der Anfangsaktivität zurückerhalten werden. Bei Verwendung von Lignin-Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) wurden die gleichen Produkte erhalten.^[177-178]



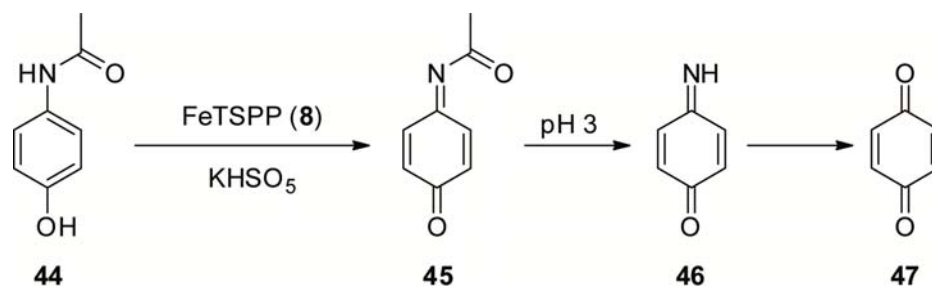
Schema 30. Oxidativer Abbau der Lignin-Modellverbindung **39** durch FeTSPP (**8**) und KHSO₅

In fortsetzenden Studien untersuchten MEUNIER *et al.* den oxidativen Abbau dimerer Lignin-Modellverbindungen.^[177-178] Unter Verwendung von FeTSPP (**8**) als biomimetische Ligninase in Kombination mit Kaliummonopersulfat als Oxidationsmittel wurde 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propan-1,3-diol (**42**) zu den monomeren Oxidationsprodukten **40** und **43** abgebaut (Schema 31).^[177-179] Das Substrat **42** ist eine geeignete Modellverbindung zur Untersuchung der Effizienz der oxidativen Spaltung von C_α-C_β-Bindungen von Arylglycerolarylether-Bindungen. Diese Bindungsart ist die häufigste Bindung im Ligninpolymer. In Anwesenheit von FeTSPP (**8**) und Kaliummonopersulfat wurde ein vollständiger Umsatz von **42** erhalten. Die beiden Hauptprodukte Veratrumaldehyd (**40**) und 2-Methoxy-1,4-benzochinon (**43**) wurden mit isolierten Ausbeuten zwischen 30 und 15% erhalten.^[177-178] Ein weiteres Beispiel zum Abbau von Ligninmodell-Verbindungen wurde von MANSUY *et al.* beschrieben.^[177,180]



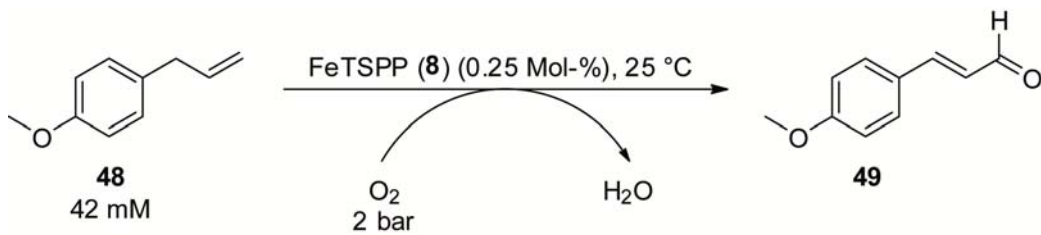
Schema 31. Oxidativer Abbau der dimeren Ligninmodell-Verbindung **42** durch FeTSPP (**8**) und Kaliummonopersulfat

MEUNIER *et al.* oxidierten ebenfalls das Schmerzmittel *para*-(Acetylamino)phenol (**44**) (Paracetamol) mittels FeTSPP (**8**) und KHSO₅ (Schema 32).^[177,181] Das entsprechende Chinonimin **45** wurde mit guten Ausbeuten bis 90% erhalten und die anfängliche Umsatzfrequenz (TOF, *turn over frequency*) von **8** als biomimetische Peroxidase ist vergleichbar mit dem System Meerrettichperoxidase/Wasserstoffperoxid.^[177,181] Bei pH 3 findet ein schneller Abbau des Imins **45** über **46** zu Benzochinon (**47**) statt, wohingegen bei pH 7 dieser Abbau nur langsam abläuft und eine Polymerisation von **45** bevorzugt abläuft.^[177,181]



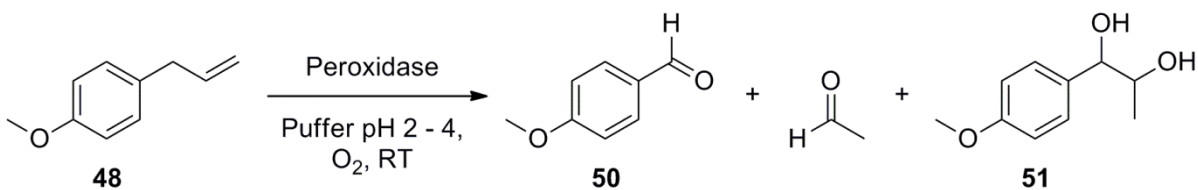
Schema 32. Oxidativer Abbau von Paracetamol (**44**) durch die biomimetische Peroxidase **8** und Kaliummonopersulfat^[177,181]

Die Oxidation von *trans*-Anethol (**48**) zum allylischen Aldehyd **49** durch Sauerstoff in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) wurde von KRUTIL *et al.* beschrieben (Schema 33).^[182] Die Reaktion wurde in einem Puffer-Dichlormethan-Gemisch durchgeführt und Tween 80 (0.0025 Mol-%) zur Homogenisierung der Reaktionslösung hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 72 Stunden konnte ein TON-Wert von 160 erreicht werden.^[182]



Schema 33. Chemoselektive, aerobe Oxidation von *trans*-Anethol (**48**)^[182]

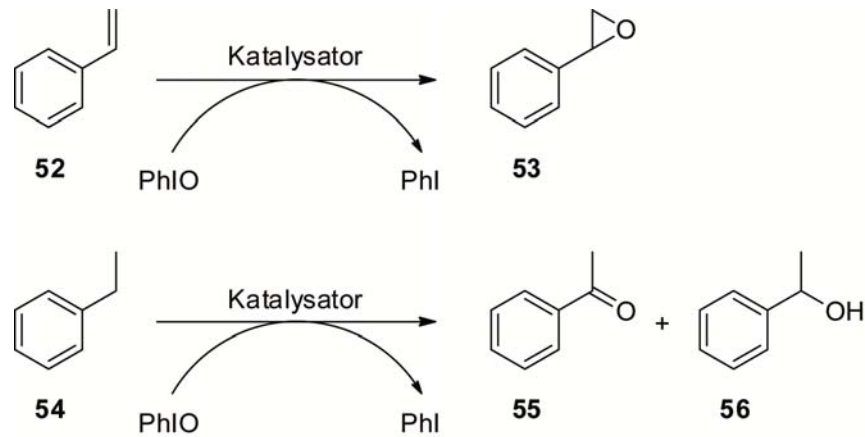
Anders als erwartet fand keine Bindungsspaltung oder Hydroxylierungsreaktion wie bei einer zuvor beschriebenen Biotransformation von *trans*-Anethol (**48**) unter Verwendung verschiedener Peroxidasen statt (Schema 34).^[183] Bei dieser Reaktion wurde neben *para*-Anisaldehyd (**50**) als Hauptprodukt auch 1-(*para*-Methoxyphenyl)propan-1,2-diol (**51**) erhalten.



Schema 34. Biotransformation von **48** mittels Peroxidase und Sauerstoff^[183]

Interessanterweise finden diese Reaktionen bei Verwendung von FeTSPP (**8**) nicht statt, sodass die Fe(III)-porphyrin-katalysierte Umsetzung hochgradig chemoselektiv verläuft (Schema 33). Die Weiteroxidation von **49** zur Carbonsäure wurde ebenfalls nicht beschrieben. Erst bei höherem Umsatz wurde eine Epoxidierung (<1%) bzw. Spaltung (4%) der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung von **49** beobachtet.^[182]

Wasserlösliche Eisen(III)-porphyrine zeigen im Vergleich zu nicht-wasserlöslichen Eisen(III)-porphyrinen deutliche Unterschiede in ihrer katalytischen Aktivität.^[162,177,182,184-185] Beispielsweise katalysieren wasserunlösliche Eisen(III)-porphyrine für gewöhnlich Oxidationsreaktionen mit unfunctionalisierten Olefinen und Alkanen (Schema 35).^[184]



Schema 35. Eisen(III)-porphyrin-katalysierte Epoxidierung und Hydroxylierung

Es ist daher nicht verwunderlich, dass das Tetranatriumsalz von FeTSPP (**8**) (FeTSPPNa) die Epoxidierung von Styrol (**52**) und die Hydroxylierung von Ethylbenzol (**54**) nicht katalysiert (Schema 35).^[184]

Allerdings ist es gelungen, das wasserlösliche FeTSPP (**8**) als Tetranatriumsalz in Polymere aus mehrarmigen und hochverzweigten Polypeptidketten einzubetten, um das aktive Zentrum und die hydrophobe Umgebung von Cytochrom P450 zu simulieren. Das eingekapselte FeTSPPNa wurde anschließend als Katalysator für die Epoxidierung von Styrol (**52**) und die Hydroxylierung von Ethylbenzol (**54**) eingesetzt (Schema 35).^[184] Die Reaktionen konnten in Chloroform durchgeführt werden und verliefen effizient mit TON-Werten von 8500 und 3800 und Ausbeuten von 97 und 92%. Das Porphyrin bleibt in einem Bereich von pH 4 – 10 im Polymer gebunden und die Dimerbildung ist weitestgehend unterdrückt. Bei pH >12 kann das Porphyrin aus dem Polymer freigesetzt und wiederverwendet werden.^[184]

Die Kombination aus FeTSPP (**8**) und Wasserstoffperoxid wurde außerdem als Katalysator für die oxidative Polymerisation von Pyrrol-Monomeren zur Synthese von leitfähigen Polymeren verwendet.^[186] Die entsprechende Reaktion unter Verwendung von Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP, EC 1.11.1.7) wurde als „grüne“ Alternative zu herkömmlichen Oxidationsmethoden untersucht und Poly-3,4-ethylendioxythiophen wurde erfolgreich hergestellt.^[186-187] Vorteilhaft beim Einsatz von FeTSPP (**8**) ist die hohe Stabilität und Aktivität

des Katalysators bei niedrigen pH-Werten sowie niedrigere Kosten im Vergleich zu enzymatischen Anwendungen.^[186]

Die Oxidation primärer und sekundärer Alkohole wurde mit immobilisiertem FeTSPP (**8**) als Katalysator und Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel durchgeführt.^[188] Als Modellreaktion wurde der Benzylalkohol **57** in einer Reaktionslösung aus Acetonitril : Wasser (1 : 1) mit einer Ausbeute von 6% zu Benzaldehyd (**58**) oxidiert. In Anwesenheit von Imidazol (**59**) wurde hingegen eine Ausbeute von 93% erhalten (Schema 36).



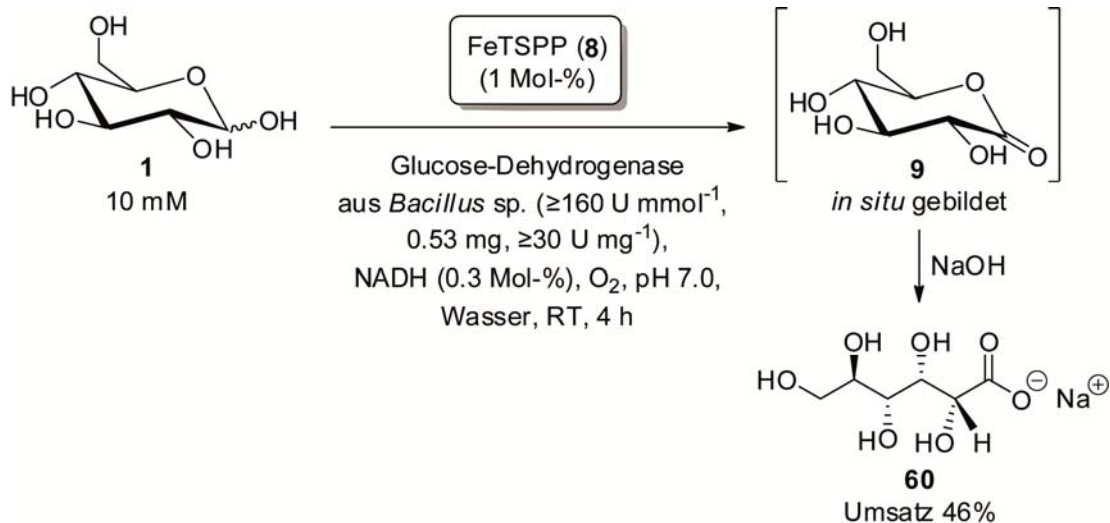
Schema 36. Oxidation von Benzylalkohol **57** in Anwesenheit von FeTSPP (**8**), H₂O₂ und Imidazol (**59**)

Diese Steigerung der Ausbeute ist durch Koordination von Imidazol (**59**) an das Eisenzentrum von FeTSPP (**8**) zu erklären. Durch den axialen Liganden wird der Katalysator **8** aktiviert. Der immobilisierte Katalysator wurde vier Mal hintereinander eingesetzt, wobei die Ausbeute dabei insgesamt nur um 3% abnahm. Es wurde gezeigt, dass insgesamt <4% des koordinierten Eisens von **8** in die Reaktionslösung überging. Für optimale Reaktionsbedingungen wird der Katalysator **8**, Wasserstoffperoxid, Imidazol (**59**) und das Substrat **57** in einem molaren Verhältnis von 1 : 100 : 10 : 50 eingesetzt.^[188]

3.3 Vorarbeiten zur Cofaktorregenerierung mittels FeTSPP (**8**)

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit beobachtete MAID erstmals eine Absorptionsabnahme der natürlichen Cofaktoren NADH und NADPH in Anwesenheit von Luftsauerstoff und katalytischen Mengen FeTSPP (**8**).^[189] In anschließenden Untersuchungen wurde die präparative Einsatzmöglichkeit von **8** zur Cofaktorregenerierung im Sinne einer künstlichen NAD(P)H-Oxidase getestet. Als Modellreaktion wurde hierzu D-Glucose (**1**) in Anwesenheit einer Glucose-Dehydrogenase ($\geq 160 \text{ U mmol}^{-1}$, 0.53 mg , $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) oxidiert, wobei gleichzeitig NAD⁺ zu NADH reduziert wird

(Schema 37). Das *in situ* gebildete Lacton **9** hydrolysiert anschließend quantitativ zu D-Gluconsäure (**12**), die schließlich durch automatische Zugabe von Natronlauge unter Bildung von Natrium-D-gluconat (**60**) neutralisiert wird, wodurch der pH-Wert der Reaktionslösung konstant gehalten werden kann.^[189]

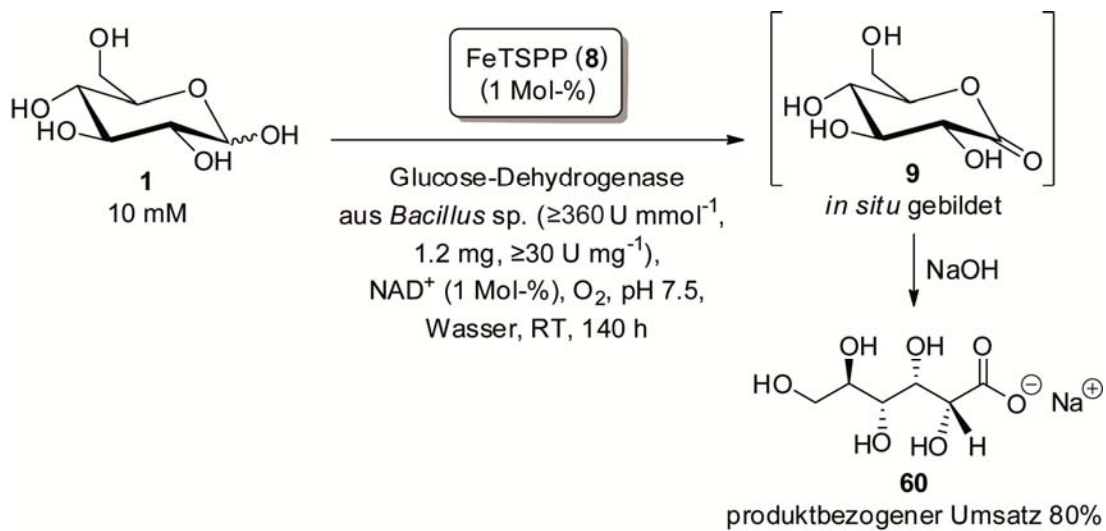


Schema 37. Konzept der künstlichen Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

In Anwesenheit katalytischer Mengen FeTSPP (**8**) (1 Mol-%) und der bereits reduzierten Cofaktor-Form NADH (0.3 Mol-%) erhielt MAID nach 4 Stunden bei pH 7.0 einen Umsatz von 46%. Der Umsatz wurde hierbei über die verbrauchte Menge an Natriumhydroxid ermittelt. In Abwesenheit von **8** wurde die Bildung von Natrium-D-gluconat (**60**) nicht beobachtet.^[189] Durch Verwendung von FeTSPP (**8**) ist MAID der *proof of concept* gelungen, ein synthetisches, wasserlösliches Metalloporphyrin als künstliche, biomimetische NAD(P)H-Oxidase in wässriger Lösung zu verwenden.

In Folgearbeiten etablierten HUBER und BAUER für die zuvor von MAID durchgeführte Oxidation von D-Glucose (**1**) eine Analytik zur Umsatzbestimmung mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie. Hierfür verwendeten sie die Methode des „*inverse gated decoupling*“, bei der eine Quantifizierung von ¹³C-NMR-Signalen und die Detektion von eventuellen Nebenprodukten möglich ist.^[190] Anschließend optimierte HUBER die Reaktionsbedingungen der Oxidation von D-Glucose (**1**).^[191] Mit leicht veränderten Reaktionsbedingungen (Glucose-Dehydrogenase (≥ 360 U mmol⁻¹, 1.2 mg, ≥ 30 U mg⁻¹),

Luftsauerstoff, NAD^+ (1 Mol-%) und FeTSPP (**8**) (1 Mol-%) erhielt HUBER bei pH 7.0, entsprechend dem Ergebnis von MAID bei pH 7.0, einen Umsatz von 48% (allerdings wurde hier der Umsatz noch über die verbrauchte Menge an Natriumhydroxid ermittelt). Bei pH 6.0 beobachtete HUBER einen produktbezogenen Umsatz^[192] von 53% (mittels NMR) bzw. von 52% (über die verbrauchte Menge an Natriumhydroxid). Den höchsten produktbezogenen Umsatz von 80% (mittels NMR) erzielte HUBER bei pH 7.5 nach 140 Stunden (Schema 38).^[191]



Schema 38. Optimierte Reaktionsbedingungen der Oxidation von D-Glucose (**1**) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vorgehensweise und Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, FeTSPP (**8**) als neuartiges Cofaktorregenerierungssystem eingehend zu charakterisieren sowie die präparative Anwendungsbreite der Regenerierung von NAD⁺ und NADP⁺ anhand von Oxidationsreaktionen verschiedener Substrate bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zu untersuchen.

Im Rahmen der Charakterisierung des neuartigen Cofaktorregenerierungssystems werden im ersten Teil dieser Arbeit eine Benchmark-Reaktion und eine geeignete Analytik etabliert. Hierbei wird sowohl auf die Art des Koppelproduktes als auch auf die Sauerstoffabhängigkeit des Regenerierungssystems eingegangen. Auf Grundlage der etablierten Analytik soll anschließend ausgehend vom Benchmark-Versuch eine Optimierung der bisherigen Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Cofaktorkonzentration, *etc.*) durchgeführt werden. Anschließend wird ein möglicher Mechanismus diskutiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Anwendungsbreite des Regenerierungssystems untersucht. Es soll hierbei gezeigt werden, ob FeTSPP (**8**) als Regenerierungssystem mit weiteren Substraten und Enzymen kompatibel ist. Außerdem soll ein Vergleich des künstlichen Cofaktorregenerierungssystems mit etablierten Methoden der enzymatischen Cofaktorregenerierung durchgeführt werden.

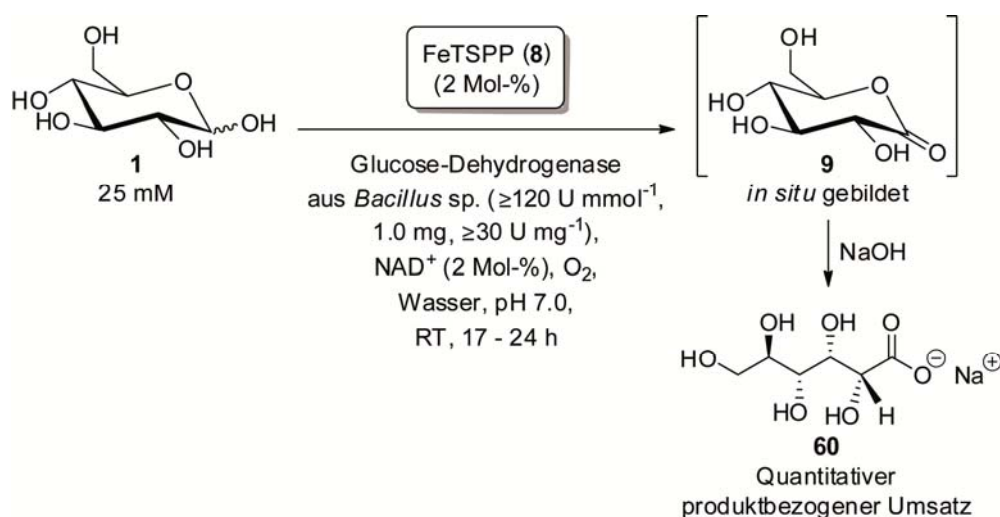
In einer anschließenden Studie sollen weitere Metalloporphyrine als potentielle biomimetische NAD(P)H-Oxidasen getestet werden. Sowohl ein Austausch des Zentralatoms als auch eine strukturelle Änderung des Porphyrinliganden sind hierbei von Interesse.

Im letzten Teil dieser Arbeit soll eine Prozessoptimierung durchgeführt werden. Zum einen soll hierfür die Skalierbarkeit des Benchmark-Versuches getestet werden. Zum anderen soll die Langzeitaktivität von FeTSPP (**8**) untersucht werden und zusätzlich eine Methode zum Recycling von **8** erprobt werden. Im Rahmen dieser Studie soll ebenfalls die Wechselzahl (*turn over number*) des Gesamtprozesses bestimmt werden.

4.2 Oxidation von D-Glucose (1) als Benchmark-Versuch

Zur Untersuchung der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** etablierten MAID und HUBER die Oxidationsreaktion von D-Glucose (**1**) in Anwesenheit einer Glucose-Dehydrogenase als Modellsystem, bei der die oxidierte Cofaktorform NAD^+ benötigt und in die reduzierte Form umgewandelt wird (Schema 37 – 38).^[26] Bei dieser Reaktion wird D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) oxidiert. Das *in situ* gebildete Lacton **9** hydrolysiert anschließend quantitativ zu D-Gluconsäure (**12**), die schließlich durch automatische Zugabe von Natronlauge unter Bildung von Natrium-D-gluconat (**60**) neutralisiert wird, wodurch der pH-Wert der Reaktionslösung konstant gehalten werden kann. Den höchsten Umsatz erzielte HUBER bei der Oxidation von 10 mM D-Glucose (**1**) in Gegenwart von Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. ($\geq 360 \text{ U mmol}^{-1}$, 1.2 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$) sowie jeweils 1 Mol-% NAD^+ und FeTSPP (**8**) bei pH 7.5 und Raumtemperatur. Nach 140 Stunden wurde ein produktbezogener Umsatz von 80% erhalten.^[193]

In dieser Arbeit wurde unter optimierten Bedingungen erstmals ein quantitativer produktbezogener Umsatz der Oxidation von D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) erreicht (Schema 39).



Schema 39. Quantitative Oxidation von D-Glucose (**1**) unter optimierten Bedingungen. (Da keine Nebenreaktionen beobachtet wurden und im NMR-Spektrum neben den Signalen des Produktes keine unerwarteten Signale sind, wird im Folgenden ein quantitativer Umsatz im Rahmen der Fehlergrenzen der Methode angegeben. Eine Quantifizierung erfolgt weiter unten (Kapitel 4.2.3).)

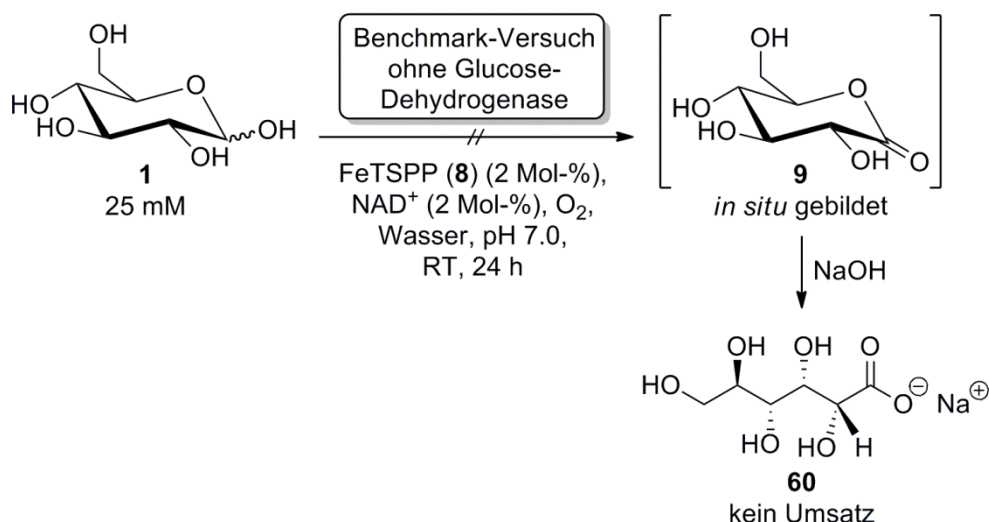
Hierzu wurde die Substratkonzentration auf 25 mM erhöht. Außerdem wurde die Konzentration des Cofaktors NAD^+ und der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** auf jeweils 2 Mol-% verdoppelt. In Gegenwart einer verringerten Menge Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. ($\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$, 1.0 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$) wurde bei pH 7.0 nach 17 – 24 Stunden (bei verschiedenen Ansätzen wurde eine Varianz der Reaktionszeit beobachtet) ein quantitativer produktbezogener Umsatz^[192] erhalten. Diese Reaktion wird im Folgenden als Benchmark-Versuch für weitere Untersuchungen von **8** als künstliche NAD(P)H-Oxidase verwendet.

Nach aktuellem Kenntnisstand ist FeTSPP (**8**) bis *dato* der erste biomimetische Katalysator für die Regenerierung von NAD(P)^+ aus NAD(P)H durch Aktivierung und Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser entsprechend der Wirkungsweise einer NAD(P)H-Oxidase.

4.2.1 Kontrollversuche zur Überprüfung des Benchmark-Versuches

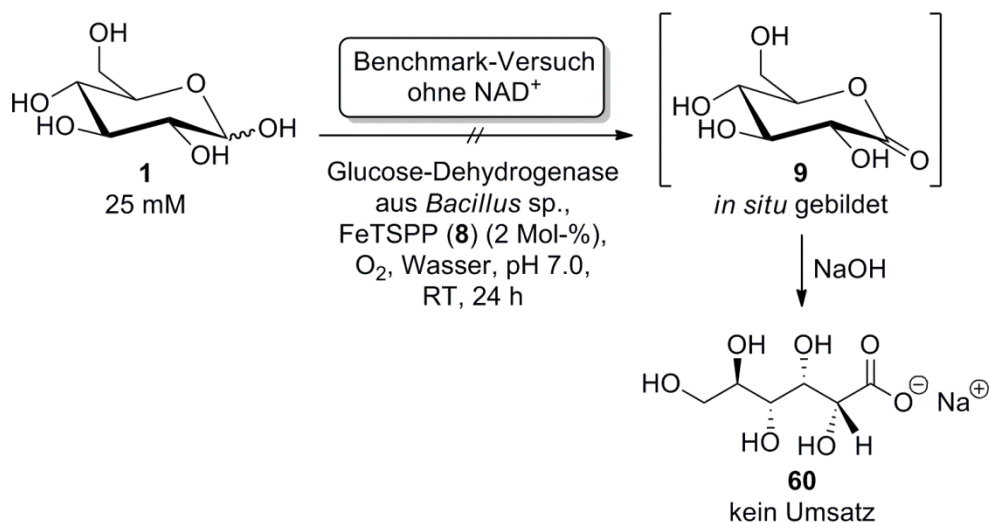
Um die Notwendigkeit der beteiligten Komponenten (Glucose-Dehydrogenase, Cofaktor und FeTSPP (**8**)) für die Oxidation von D-Glucose (**1**) zu Natrium-D-gluconat (**60**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) zu untersuchen, wurden ausgehend vom Benchmark-Versuch entsprechende Kontrollversuche unter Ausschluss jeweils einer Komponente durchgeführt (Schema 40 – 42).

Zunächst wurde getestet, ob eine FeTSPP-katalysierte Hintergrundreaktion^[194] (siehe Stand der Wissenschaft) bzw. eine Autooxidation der D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) stattfindet. Hierzu wurde der Benchmark-Versuch in Abwesenheit von Glucose-Dehydrogenase durchgeführt, wobei allerdings kein Umsatz festgestellt wurde (Schema 40). Demnach findet keine FeTSPP-katalysierte Hintergrundreaktion bzw. autokatalytische Oxidation der D-Glucose (**1**) statt. Die Transformation der D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) ist unter den gewählten Bedingungen allein auf die Glucose-Dehydrogenase zurückzuführen.



Schema 40. Benchmark-Versuch ohne Glucose-Dehydrogenase

Anschließend wurde die Benchmark-Reaktion in Abwesenheit von Cofaktor durchgeführt (Schema 41). Ohne die Zugabe von Cofaktor wurde kein Umsatz festgestellt. Die verwendete Glucose-Dehydrogenase zeigt demnach keine Glucose-Oxidase-Aktivität (katalytische Promiskuität^[195]), bei der die Anwesenheit von Cofaktor zur Oxidation von D-Glucose (**1**) nicht notwendig wäre.

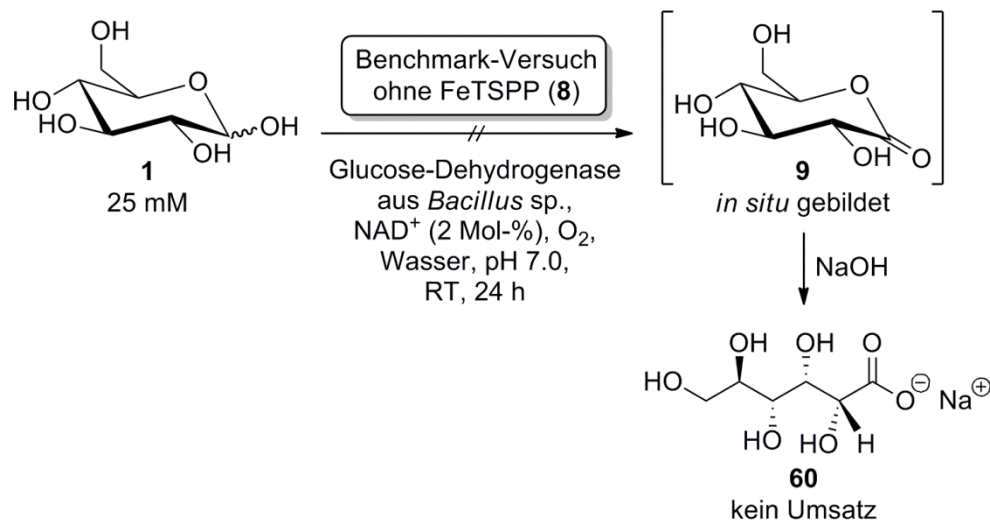


Schema 41. Benchmark-Versuch ohne Cofaktor

Außerdem befindet sich in der Enzymformulierung keine merkliche Beimengung durch Cofaktor oder Glucose-Oxidasen, da in beiden Fällen auch ohne externen Zusatz von Cofaktor ein Umsatz von D-Glucose (**1**) zu erwarten wäre. Die Katalyse findet am aktiven

Zentrum der Glucose-Dehydrogenase unter Beteiligung von Cofaktor statt. Bei einer katalytischen Aktivität des Enzyms aufgrund von Oberflächeneffekten der Proteinstruktur, anstelle von einer Katalyse über das aktive Zentrum wäre die Anwesenheit von Cofaktor nicht notwendig.^[196-197] Die gewünschte Oxidation von D-Glucose (**1**) findet demnach ausschließlich erst nach Zugabe von Cofaktor statt.

Schließlich wurde die Reaktion in Abwesenheit von FeTSPP (**8**) durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch ohne Cofaktorregenerierungssystem ein Umsatz detektiert werden kann (Schema 42). Zum einen soll hierbei ausgeschlossen werden, dass sich in der Enzymformulierung der Glucose-Dehydrogenase eine Verunreinigung durch NAD(P)H-Oxidasen befindet, zum anderen soll eine NAD(P)H-Oxidase-Aktivität der Glucose-Dehydrogenase (katalytische Promiskuität^[195]) ausgeschlossen werden. Da es ohne Zugabe von FeTSPP (**8**) zu keinem Umsatz kam, kann davon ausgegangen werden, dass die *in-situ*-Cofaktorregenerierung ausschließlich durch FeTSPP (**8**) als künstliche NAD(P)H-Oxidase katalysiert wird.



Schema 42. Benchmark-Versuch ohne FeTSPP (**8**)

Insgesamt wurde bei keinem der Kontrollversuche eine Umsetzung beobachtet. Die Anwesenheit aller verwendeten Komponenten, wie das Enzym, der Cofaktor als auch das Eisenporphyrin **8** sind für einen Umsatz notwendig. Es gibt zudem keine Hinweise auf Neben- oder Hintergrundreaktionen.

Des Weiteren wurde die Sauerstoffabhängigkeit der Oxidation von NADH mittels FeTSPP (**8**) untersucht. Hierzu wurde die Absorption von NADH (0.5 mM) bei 340 nm in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) (0.1 mM) zeitlich verfolgt (Abbildung 5). Da nur NADH im Gegensatz zu NAD^+ bei 340 nm absorbiert, kann eine Abnahme der NADH-Konzentration, durch Oxidation von NADH mittels FeTSPP (**8**), über die Abnahme der Absorption verfolgt werden.

Unter aeroben Bedingungen beobachtet man zunächst eine deutliche Abnahme der Absorption, die nach ca. 100 Sekunden zum Erliegen kommt (Abbildung 5, schwarze Kurve). Bei Anwesenheit von Sauerstoff kann somit eine Oxidation des NADH mittels FeTSPP (**8**) beobachtet werden. Wird die Messung unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, ist zunächst eine leichte Abnahme der Absorption erkennbar, die bereits nach wenigen Sekunden zum Erliegen kam (Abbildung 5, rote Kurve). Diese leichte Abnahme der Absorption könnte entweder auf Restsauerstoff oder auf eine anaerobe Reaktion von FeTSPP (**8**) mit NADH zu einem Fe(III)-Hydrid-Komplex und NAD^+ zurückzuführen sein.

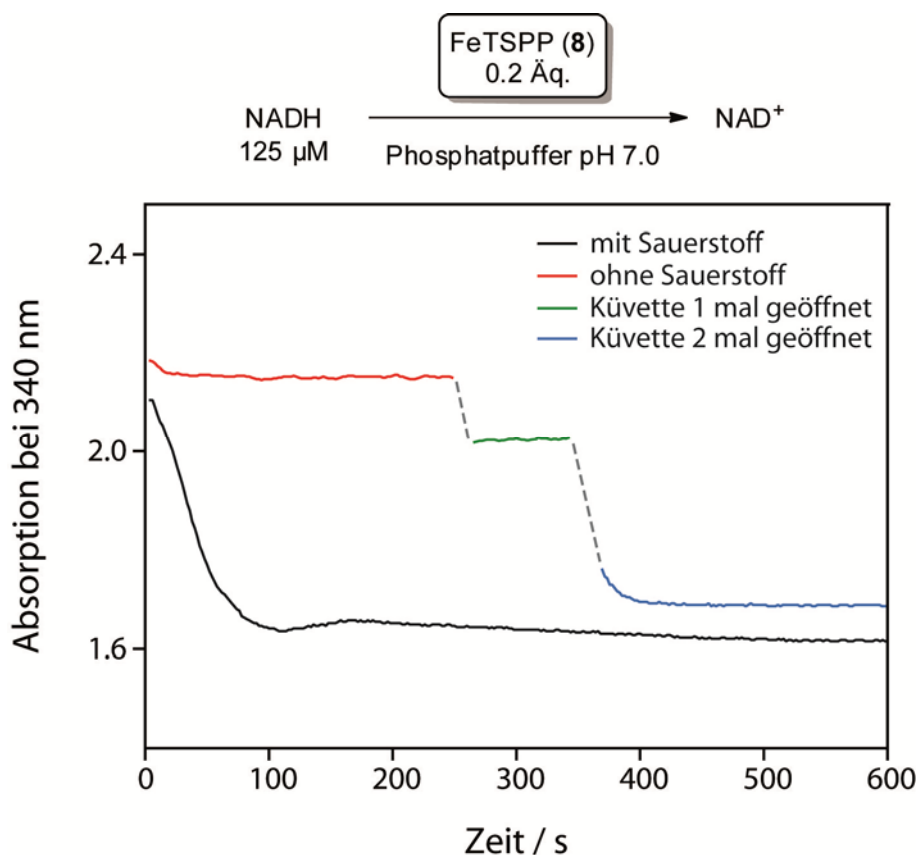


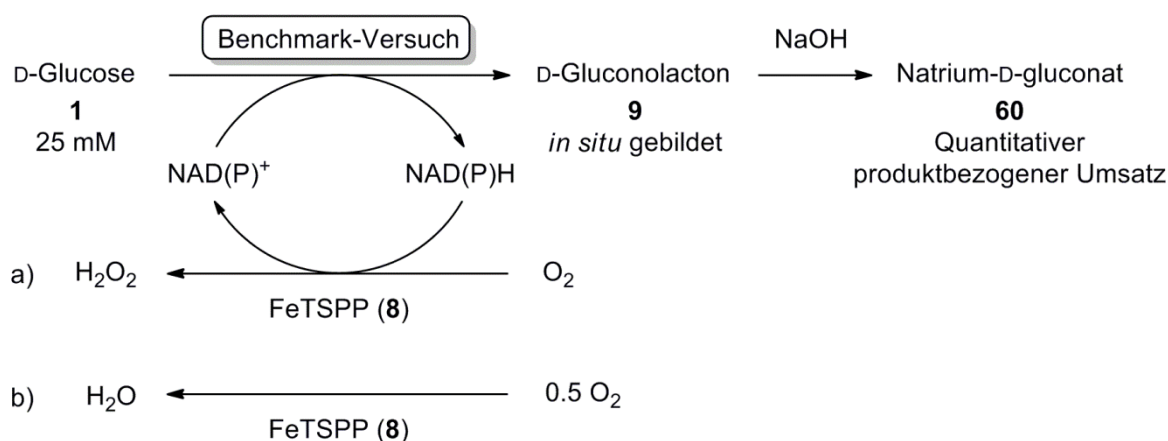
Abbildung 5. Aufnahme der Absorption von NADH in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) bei 340 nm gegen die Zeit unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Erst nach kurzem Öffnen der Küvette, war eine deutliche Absorptionsabnahme erkennbar, die jedoch bis zur Fortsetzung der Messung (<5 Sekunden) bereits zum Erliegen kam und deshalb nicht online verfolgt werden konnte (Abbildung 5, grüne Kurve). Nach erneutem Öffnen und Schütteln der Küvette konnte analog eine Absorptionsabnahme beobachtet werden (Abbildung 5, blaue Kurve). Dieses Experiment zeigt einen deutlichen Hinweis auf eine Sauerstoffabhängigkeit der Oxidation von NADH mittels FeTSPP (**8**). Die Messergebnisse deuten darauf hin, dass FeTSPP (**8**) in Anwesenheit von Sauerstoff in der Lage ist, NADH katalytisch zu oxidieren und dass in Abwesenheit von Sauerstoff diese katalytische Oxidation von NADH nicht abläuft. Deshalb wird postuliert, dass bei der katalytischen Cofaktorregenerierung das FeTSPP (**8**) selbst durch Sauerstoff regeneriert wird. Da die Abnahme der Absorption in Anwesenheit von limitierenden Mengen an Sauerstoff immer wieder zum Erliegen kommt, wird angenommen, dass der vorhandene Sauerstoff verbraucht wird. Die Notwendigkeit, dass alle beteiligten Komponenten (Glucose-Dehydrogenase, Cofaktor, FeTSPP (**8**) sowie molekularer Sauerstoff) für eine erfolgreiche Cofaktorregenerierung vorliegen müssen, wurde durch negativ verlaufende Kontrollversuche bestätigt, bei denen jeweils eine dieser Komponenten fehlte.

4.2.2 Koppelprodukt der Reduktion von Sauerstoff

Bei der Regenerierung von NAD(P)^+ durch Oxidation von NAD(P)H unter Verwendung von NAD(P)H -Oxidasen wird Sauerstoff entweder in einer vier-Elektronen-Reduktion zu Wasser (NOX-1) oder in einer zwei-Elektronen-Reduktion zu Wasserstoffperoxid (NOX-2) reduziert (siehe 3.1.2.2).^[15] Die bislang entwickelten biomimetischen Katalysatoren liefern als Nebenprodukt das ungewünschte Wasserstoffperoxid anstelle von (vorzugsweise) Wasser (siehe 3.1.2.4).^[24,137] Wasserstoffperoxid kann zwar leicht durch den zusätzlichen Einsatz von Katalase *in situ* abgebaut werden, jedoch können teilweise bereits geringe Mengen Wasserstoffperoxid die Enzymstabilität sowie den Cofaktor beeinträchtigen.^[16,24,120-121] Ein Cofaktorregenerierungssystem, bei dem Wasser als Koppelprodukt der Reduktion von Sauerstoff entsteht, wäre demgegenüber von Vorteil. Bis *dato* ist nach aktuellem Kenntnisstand noch kein biomimetischer Katalysator für die Regenerierung von NAD(P)^+ aus NAD(P)H durch Aktivierung und Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser, entsprechend der Wirkungsweise einer NAD(P)H -Oxidase (NOX-1), bekannt.

Zur Überprüfung, welches Koppelprodukt (Wasser oder Wasserstoffperoxid) bei Verwendung von FeTSPP (**8**) als künstliche NAD(P)H-Oxidase entsteht, wurde die Reaktionslösung des Benchmark-Versuches auf eine eventuelle Akkumulation von Wasserstoffperoxid mittels Teststäbchen (Quantofix®; $0.5 - 25 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$) untersucht (Schema 43). Die FeTSPP-haltige (0.5 mM) Reaktionslösung des Benchmark-Versuches ist selbst dunkel gefärbt, sodass ein quantitativer Nachweis von eventuell bei der Reaktion gebildetem Wasserstoffperoxid mittels Farbskala der Teststäbchen nicht möglich ist. Um die Nachweisgrenze von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) zu ermitteln, wurden FeTSPP-Lösungen (0.5 mM) mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen ($0.5 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) angesetzt.



Schema 43. Benchmark-Versuch mit den denkbaren Koppelprodukten der Reduktion von Sauerstoff a) Wasserstoffperoxid oder b) Wasser

Hierbei konnte im Rahmen unabhängiger Ansätze stets eine H_2O_2 -Konzentration von 10 mg L^{-1} nachgewiesen werden, wohingegen eine H_2O_2 -Konzentration von 5 mg L^{-1} nicht mehr detektiert werden konnte. Die Nachweisgrenze für Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) (0.5 mM) wurde demnach auf 10 mg L^{-1} bestimmt. Im Falle von äquimolar gebildetem Wasserstoffperoxid, wäre dieses demnach eindeutig nachweisbar. In der Reaktionslösung des Benchmark-Versuches konnte auf diese Weise kein Wasserstoffperoxid detektiert werden. Dies bedeutet, dass keine Wasserstoffperoxidkonzentration $>10 \text{ mg L}^{-1}$ akkumulierte. Demzufolge wurde entweder kein Wasserstoffperoxid gebildet oder es wurde *in situ* abgebaut, sodass keine Wasserstoffkonzentration oberhalb der Nachweisgrenze akkumuliert.

Beim Benchmark-Versuch wird 25 mM D-Glucose (**1**) quantitativ zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) oxidiert. Die ermittelte Nachweisgrenze von Wasserstoffperoxid liegt hingegen bei 10 mg L⁻¹ (0.29 mM); dies entspricht einem Umsatz von <2% unter der Voraussetzung dass Wasserstoffperoxid quantitativ gebildet wird und akkumuliert. Würde also stöchiometrisch Wasserstoffperoxid entstehen und akkumulieren, wäre der Nachweis mit dieser Methode eindeutig möglich. Es wurde somit gezeigt, dass bei Verwendung von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung keine Wasserstoffperoxidkonzentration $\geq 2\%$ akkumuliert und dass daher kein Einsatz von Katalase zum Abbau von Wasserstoffperoxid bei präparativen Ansätzen notwendig ist, da keine Schädigung des Enzyms zu erwarten ist. Es wird gefolgert, dass Wasser als Koppelprodukt der Reduktion von Sauerstoff in Anwesenheit von **8** entsteht.

Allerdings wäre es im Falle von Wasserstoffperoxid als Koppelprodukt auch möglich, dass dieses schnell durch Eisenporphyrin **8** *in situ* umgesetzt und abgebaut wird und daher nicht in der Reaktionslösung akkumuliert. Reaktionen von **8** mit Wasserstoffperoxid wurden bereits beschrieben (siehe 3.2.2).^[176,198]

Im Fall einer tatsächlichen Bildung von Wasserstoffperoxid, könnte dieses in zukünftigen Arbeiten mit Hilfe einer schnellen Abfangreaktion, beispielsweise in Gegenwart einer Peroxidase und des Farbstoffes *o*-Dianisidin oder 9-Acetylresorufin (Amplex Red), *in situ* nachgewiesen werden, bevor es abgebaut wird.^[20-21] Eine Nachweismethode für Wasserstoffperoxid unter Verwendung von ABTS wurde ebenfalls beschrieben.^[122]

Nach unserem Kenntnisstand, ist dies die erste Anwendung eines synthetischen Metalloporphyrins als Katalysator für die Aktivierung und Reduktion von molekularem Sauerstoff mithilfe eines natürlichen Cofaktors in wässriger Lösung, bei dem kein unvorteilhaftes Wasserstoffperoxid akkumuliert und somit auf den zusätzlichen Einsatz von Katalase verzichtet werden kann. Mit der beschriebenen Methode steht damit eine neuartige Möglichkeit zur Verfügung, enzymatische Oxidationsreaktionen unter *in-situ*-Regenerierung des oxidierten Cofaktors NAD(P)⁺ mithilfe eines nichtenzymatischen, synthetischen Katalysators als „künstlichem Enzym“ durchzuführen.

4.2.3 Analytik: Umsatzbestimmung mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Für eine genaue Untersuchung des Benchmark-Versuches (Oxidation von D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) und anschließender Hydrolyse und Neutralisation des *in-situ* gebildeten Lactons **9** zu Natrium-D-gluconat (**60**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)), war es notwendig eine Analytik mit einer genauen und verlässlichen Umsatzbestimmung zu etablieren. Typischerweise werden Umsatzbestimmungen für wasserlösliche Verbindungen in der Organischen Chemie mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, wässriger Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC) oder wässriger Gaschromatographie (GC) durchgeführt. Die Umsatzbestimmung der Oxidation von D-Glucose (**1**) zu Natrium-D-gluconat (**60**) mittels ^1H -NMR-Spektroskopie konnte aufgrund von Signalüberlagerungen von Edukt und Produkt nicht durchgeführt werden. Die Analyse mittels GC ist nicht möglich, da das Natrium-D-gluconat (**60**) nicht verdampfbar ist und daher nicht quantifiziert werden kann. Eine wässrige HPLC war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit nicht verfügbar.

Weiter zu berücksichtigen war bei der Etablierung einer geeigneten Analytik zur Umsatzbestimmung, dass das wasserlösliche FeTSPP (**8**) nicht aus dem Rohprodukt entfernt werden konnte und die Analytik daher in Anwesenheit des Fe-Komplexes **8** durchgeführt werden musste. Als eine geeignete Methode erwies sich dabei die ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Obwohl FeTSPP (**8**) als paramagnetische Verbindung eine Verbreiterung von NMR-Signalen verursacht, ist eine präzise Umsatzbestimmung trotzdem möglich, sodass im Rahmen dieser Arbeit diese Methode zur Analytik der Umsatzbestimmung etabliert werden konnte.^[190]

Zur Quantifizierung von ^{13}C -NMR-Signalen wurde zum einen die in Vorarbeiten zu dieser Arbeit bereits von HUBER und BAUER etablierte Methode des „*inverse gated decoupling*“ verwendet.^[25,190] Bei dieser universell einsetzbaren Methode zur Quantifizierung der Signale eines ^{13}C -NMR-Spektrums wird ein Protonen-Breitband-entkoppeltes Spektrum aufgenommen, bei dem die Spin-Entkopplung während der ^{13}C -Messimpulse und des FID (engl.: *free induction decay*) aktiviert ist, nicht jedoch in der anschließenden Verweildauer. Die Verweildauer muss so gewählt werden, dass sie länger als die Relaxation des „langsamsten“ Kohlenstoff-Kerns ist. Spin-Gitter-Relaxation und Kern-Overhauser-Effekt haben dann auf die Besetzung der Kernniveaus und damit auf die Signalintensitäten keinen

Einfluss mehr,^[190] jedoch verlängern sich die Messzeiten im Gegensatz zu „normalen“ Protonen-Breitband-entkoppelte ¹³C-NMR-Messungen erheblich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von BAUER eine Möglichkeit zur Quantifizierung Protonen-Breitband-entkoppelter ¹³C-NMR-Spektren von D-Glucose : D-Gluconat-Mischungen etabliert, bei der keine stark verlängerten Messzeiten anfallen. Im Folgenden wird diese Methode kurz beschrieben.^[199] Die Quantifizierung der Signalintensitäten eines Protonen-Breitband-entkoppelten ¹³C-NMR-Spektrums ist abhängig von den Relaxationszeiten der entsprechenden Kohlenstoffkerne, sowie vom jeweiligen Kern-Overhauser-Effekt.^[190] Zur Umsatzbestimmung einer D-Glucose : D-Gluconat-Mischung wurde ein Protonen-Breitband-entkoppeltes ¹³C-NMR-Spektrum aufgenommen und die Spin-Gitter-Relaxationszeiten (T₁-Zeit) der einzelnen Kohlenstoffatome gemessen. Die T₁-Zeit des quartären Kohlenstoffatoms (Carbonyl-Kohlenstoffatom) liegt bei 5.4 Sekunden. Alle anderen Kohlenstoffatome haben Spin-Gitter-Relaxationszeiten von 0.8 – 1.4 Sekunden. Die Pulswiederholrate (D1) beträgt 6.6 Sekunden. Somit sind nach dieser Zeit alle nicht-quartären Kohlenstoffatome komplett relaxiert und können quantifiziert werden.^[190,200] Gegenüber der Methode des „*inverse gated decoupling*“ ist diese Methode deutlich schneller, aber dafür müssen die Spin-Gitter-Relaxationszeiten im Vorfeld gemessen und die Pulswiederholrate entsprechend lang eingestellt werden, um eine vollständige Relaxation der Kerne gewährleisten zu können. Zudem ist zu beachten, dass nur Signale „ähnlicher“ Kerne, also Kerne mit einer möglichst ähnlichen chemischen Umgebung (gleiche Anzahl an benachbarten Protonen, Kohlenstoffatomen *etc.*) miteinander verglichen werden können.

Für den Fall, dass kein Edukt im Rohprodukt eines Protonen-Breitband-entkoppelten ¹³C-NMR-Spektrums gefunden wird, also keine Integration der Signale zur Umsatzbestimmung notwendig ist, kann unter Umständen die entsprechende Nachweisgrenze dieser Methode als produktbezogener Umsatz angegeben werden. Es muss jedoch gewährleistet sein, dass keine Nebenprodukte bei der Umsetzung gebildet werden und weder das Edukt noch das Produkt flüchtig ist. Nachfolgend wird die Bestimmung der Nachweisgrenze von D-Glucose (**1**) neben Natrium-D-gluconat (**60**) beschrieben.

4.2.3.1 Nachweisgrenze von D-Glucose (1) in Anwesenheit des paramagnetischen FeTSPP (8) mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Im Folgenden wird die Bestimmung des produktbezogenen Umsatzes des Benchmark-Versuches (Bildung von Natrium-D-gluconat (60) aus D-Glucose (1)) mittels Protonen-Breitband-entkoppelter ^{13}C -NMR-Spektroskopie beschrieben. Das ^{13}C -NMR-Spektrum des Rohproduktes des Benchmark-Versuches (gemessen in D_2O) weist auf einen quantitativen produktbezogenen Umsatz hin, da neben den Produktsignalen keine Signale des Edukts **1** oder eines Nebenproduktes erkennbar sind. Zur Überprüfung, ob eine Menge von 5 Mol-% der Ausgangsverbindung **1** (entsprechend einem Umsatz von 95%) im ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert werden kann, wurde als Vergleichsprobe eine Mischung des Edukts **1** und des Produkts **60** im Verhältnis von 5 : 95 in D_2O gemessen und mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum des Rohproduktes des Benchmark-Versuches verglichen (Abbildung 6).

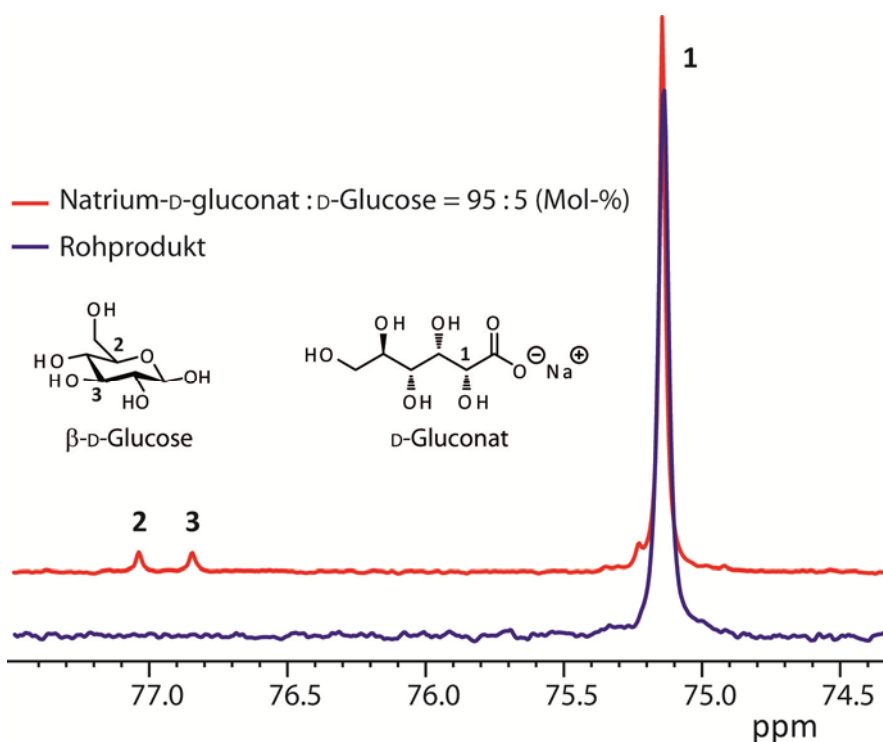


Abbildung 6. Ermittlung der Nachweisgrenze des produktbezogenen Umsatzes mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Von der Vergleichsprobe (95% Produkt und 5% Edukt) wurden 9800 Scans aufgenommen, während die Probe des Rohproduktes über 49388 Scans gemessen wurde. Die langen Messzeiten ermöglichten trotz Anwesenheit des paramagnetischen FeTSPP (**8**) in der Probe

des Rohprodukts ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Während im Spektrum der Vergleichsprobe (Abbildung 6, rote Kurve) Signale der D-Glucose (**1**) bei einer Konzentration von 5 Mol-% zu erkennen sind, können im Spektrum des Rohproduktes (blaue Kurve) nur Signale von Natrium-D-gluconat (**60**) detektiert werden. In einer wässrigen Lösung befindet sich D-Glucose (**1**) in einem Gleichgewicht aus der α - und der β -Glucopyranose-Form (36% bzw. 64%). Die Signale bei 76.8 ppm und 77.0 ppm lassen sich auf die β -Glucopyranose-Form zurückführen. Demzufolge entsprechen diese Signale jeweils 64% der Gesamtmenge an D-Glucose (**1**) aus der Mischung (Abbildung 6, rote Kurve). Die gemessene Probe des Rohproduktes zeigt im entsprechenden Bereich des ^{13}C -NMR-Spektrums keine Signale von D-Glucose (**1**) (Abbildung 6, blaue Kurve). Es wurde also gezeigt, dass eine eingesetzte Konzentration von 5 Mol-% im Vergleichsspektrum detektierbar ist. Jedoch entsprechen die Signale der β -Glucopyranose-Form bei 76.8 ppm und 77.0 ppm nicht 5 Mol-% D-Glucose (**1**), sondern nur die sich im Gleichgewicht befindlichen 64% β -Glucopyranose, entsprechend 3 Mol-% β -Glucopyranose der D-Glucose (**1**). Demzufolge kann die Detektionsgrenze von D-Glucose (**1**) neben Natrium-D-gluconat (**60**) mit dieser Methode auf $\geq 97\%$ bestimmt werden und entsprechend ein produktbezogener Umsatz $\geq 97\%$ für die Messung des Rohproduktes angegeben werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Umsatzbestimmung (produktbezogener Umsatz) der Oxidation von D-Glucose (**1**) zu Natrium-D-gluconat (**60**) mittels Protonen-Breitband-entkoppelter ^{13}C -NMR-Spektroskopie mit der Methode des „*inverse gated decoupling*“ oder durch Quantifizierung von Protonen-Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren. Für den Fall, dass kein Edukt im Protonen-Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert werden konnte, wurde entsprechend der oben bestimmten Nachweisgrenze ein produktbezogener Umsatz $\geq 97\%$ angenommen.

4.3 Spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase

In Vorarbeiten konnte MAID bereits anhand spektralphotometrischer Untersuchungen zeigen, dass es in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) zu einer Absorptionsabnahme der für die Cofaktoren NADH bzw. NADPH charakteristischen Bande bei 340 nm kommt

(Abbildung 7).^[189] Dies lässt sich auf die Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ zurückführen, welches keine Absorption bei 340 nm zeigt (Schema 44).



Schema 44. Oxidation von NAD(P)H mittels FeTSPP (8)^[201]

Die Bestimmung der „biomimetischen spezifischen Aktivität“ von FeTSPP (8) als künstliche NAD(P)H-Oxidase ermöglicht den direkten Vergleich dieses Regenerierungssystems mit bereits bekannten Systemen. Im Gegensatz zu präparativen Versuchen erfolgt die spektralphotometrische Messung in Abwesenheit von Enzym, Edukt und des während der Reaktion gebildeten Produktes. Dadurch kann der Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen auf das Regenerierungssystem beobachtet werden, unabhängig vom Verhalten des Enzyms bei den entsprechend gewählten Reaktionsbedingungen. Weiterhin können Effekte wie Substrat- oder Produktinhibierungen vermieden werden. Auf diese Weise können Informationen über das Verhalten der künstliche NAD(P)H-Oxidase 8 bei verschiedenen pH-Werten und Katalysatorbeladungen sowie über die Langzeitstabilität gesammelt werden.

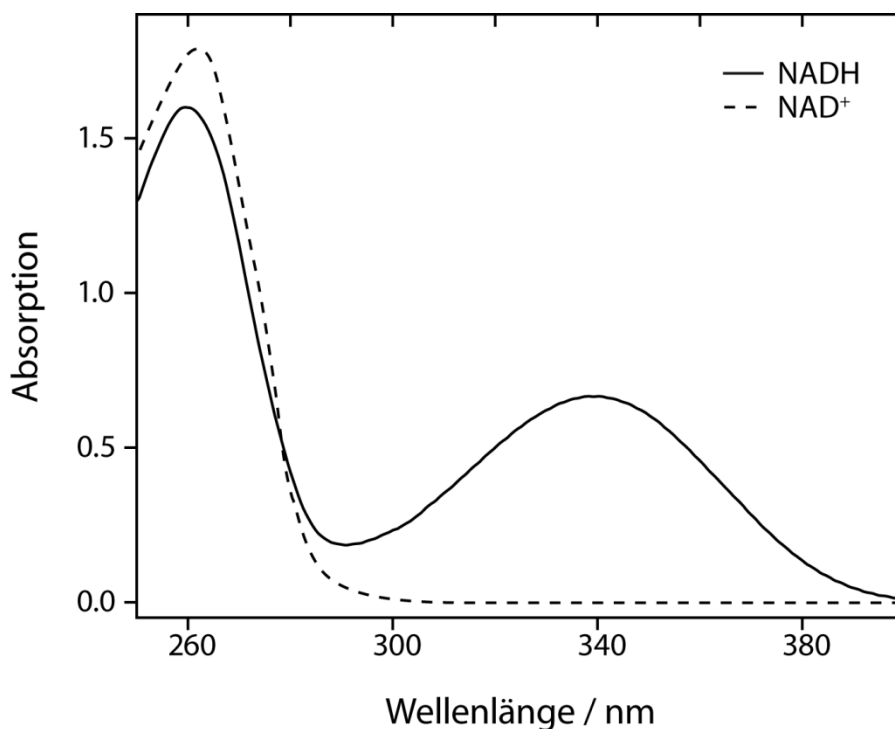


Abbildung 7. Absorptionsspektrum von NADH und NAD⁺

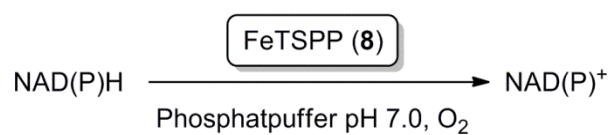
In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verwendet. Sie werden nachfolgend als Methode A und Methode B beschrieben (siehe 4.3.1 und 4.3.2).

4.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität: Methode A

Bei der Methode A wird mittels UV/Vis-Spektroskopie die Oxidation von NADH bzw. NADPH in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) und Luftsauerstoff bei einer Wellenlänge von 340 nm bei pH 7.0 zeitlich verfolgt. Aus der Anfangssteigung der erhaltenen Absorptionskurve wird anschließend die auf die Katalysatormenge (in mg) bezogene spezifische Aktivität bestimmt. Das Mischen der Reaktanden in der Messküvette geschieht bei dieser Methode außerhalb des Spektrometergerätes, sodass ein Zeitverlust von wenigen Sekunden bis zum Start der Messung nicht vermieden werden konnte. Da die Bestimmung der Aktivität aus der Anfangssteigung erfolgt, wird daher angenommen, dass die ermittelten Werte bei dieser Methode unter den tatsächlichen Werten liegen.

Bei einem fünffachen Überschuss von NADH zu FeTSPP (**8**) (125 μM : 25.0 μM) wurde eine spezifische Aktivität von 4.6 U mg^{-1} ermittelt (Tabelle 1, Eintrag 1).

Tabelle 1. Spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**



Eintrag	NAD(P)H / μM	FeTSPP / μM	NAD(P)H : FeTSPP	spezifische Aktivität / U mg^{-1}	TOF / s^{-1}
1	125 ^a	25	5 : 1	4.6	0.08
2	250 ^a	12.5	10 : 1	7.4	0.13
3	125 ^a	5	25 : 1	5.2	0.09
4	125 ^b	25	5 : 1	4.7	0.08

a) NADH; b) NADPH

Bei der entsprechenden Oxidation des phosphorylierten Cofaktors NADPH wurde unter gleichen Bedingungen ein ähnlicher Wert von 4.7 U mg^{-1} für die spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase bestimmt (Tabelle 1, Eintrag 4). Weiterhin seien exemplarisch die Umsetzung von NADH bei einem 20-fachen Überschuss von NADH zu Katalysator **8** mit einer spezifischen Aktivität von 7.4 U mg^{-1} (Tabelle 1, Eintrag 2) bzw. bei einem 25-fachen Überschuss von 5.2 U mg^{-1} genannt (Tabelle 1, Eintrag 3). Umgerechnet in die für Chemokatalysatoren gebräuchlicheren Umsatzfrequenzen (TOFs) wurden Werte von 0.08 s^{-1} bis 0.13 s^{-1} erhalten (Tabelle 1, Einträge 1 – 4).

4.3.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität: Methode B

Entsprechend der Methode A wird bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität nach der Methode B mittels UV/Vis-Spektroskopie die Oxidation von NADH in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) und Luftsauerstoff bei einer Wellenlänge von 340 nm bei pH 7.0 zeitlich verfolgt. Aus der Anfangssteigung der erhaltenen Absorptionskurve wird anschließend die auf die Katalysatormenge (in mg) bezogene spezifische Aktivität bestimmt. Bei der Methode B wird allerdings zunächst eine $5 \mu\text{M}$ FeTSPP-Lösung im Spektralphotometer vorgelegt und gerührt. Diese FeTSPP-Lösung zeigt eine leichte Absorption bei 340 nm (Abbildung 8, Startabsorption). Anschließend wird die Cofaktor-Lösung (Volumen $\leq 1\%$) mit einer Hamilton-Spritze zugegeben, während die Messung der Absorption bei 340 nm weiterläuft (Abbildung 8). Auf diese Weise kann die tatsächliche Anfangssteigung ohne Zeitverlust zwischen dem Mischen der Reaktanden und dem Start der Messung ermittelt werden. Bei pH 7.0 konnten bei Verwendung von NADH-Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ spezifische Aktivitäten von 14 U mg^{-1} , 20 U mg^{-1} , 52 U mg^{-1} und 94 U mg^{-1} aus den Anfangssteigungen der entsprechenden Kurven erhalten werden (Abbildung 8). Die Kurven zeigen auch nach der starken Anfangssteigung über den gesamten Messbereich eine deutliche Abnahme. Diese Abnahme könnte der Regenerierungsgeschwindigkeit des Eisen-Katalysators **8** entsprechen oder von einer schlechten Durchmischung der Reaktionslösung herrühren. Es ist erkennbar, dass die unterste Kurve (grüne Kurve, $10 \mu\text{M}$ NADH) die Startabsorption bereits wieder erreichte. Demensprechend wurde bei dieser NADH-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ bzw. einem molaren Verhältnis von NADH zu FeTSPP (**8**) von 2 : 1 der gesamte Cofaktor innerhalb der Messzeit oxidiert.

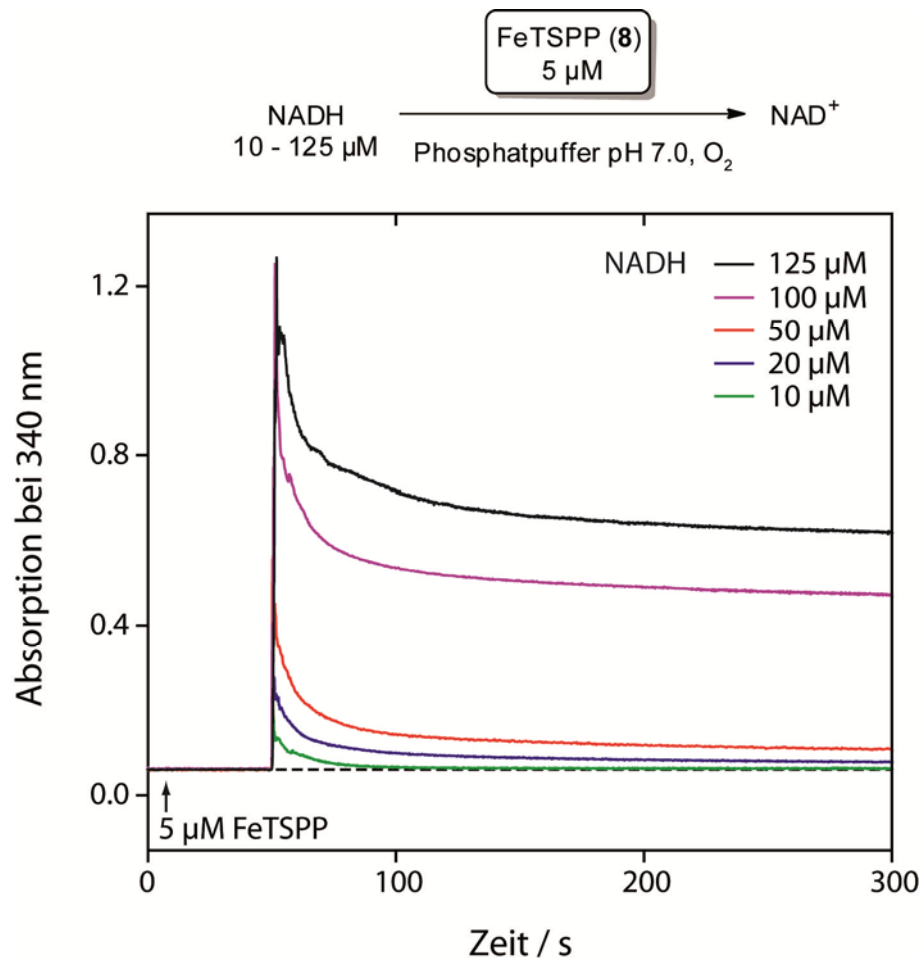


Abbildung 8. UV/Vis-Kinetik der Oxidation von NADH bei verschiedenen Konzentrationen

Bei Verwendung einer $5 \mu\text{M}$ FeTSPP-Lösung und einer $125 \mu\text{M}$ NADH-Lösung wurde mit einer spezifischen Aktivität von 112 U mg^{-1} die größte in dieser Arbeit gemessenen Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase erhalten (Abbildung 8). Diese Aktivität entspricht einer Umsatzfrequenz von 1.87 s^{-1} . Der entsprechende Wert bei Verwendung der Methode A (Kapitel 4.3.1) liegt hingegen bei 5.2 U mg^{-1} , also um einen Faktor von ca. 22 niedriger. Zum Vergleich liegen die Umsatzfrequenzen der meisten bedeutenden industriellen Anwendungen im Bereich von $10^{-2} - 10^2 \text{ s}^{-1}$, wobei enzymatische Prozesse oft sogar im Bereich von $10^3 - 10^7 \text{ s}^{-1}$ liegen.^[202]

Eine Auftragung der ermittelten spezifischen Aktivitäten der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** gegen die Substratkonzentration ($0 - 125 \mu\text{M}$ NADH), zeigt weitestgehend einen linearen Trend (Abbildung 9, schwarze Kurve). Werden die erhaltenen Werte an eine Michaelis-Menten-Funktion angepasst, wird eine gute Übereinstimmung erreicht (Abbildung 9, rote

Kurve). Die Analysesoftware Origin gibt sowohl für die lineare als auch für die nicht-lineare Anpassung (Michaelis-Menten-Funktion) ein Bestimmtheitsmaß (R^2 -Wert) von >0.996 an.^[203-206]

Bei der Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik befinden sich die Werte noch im linearen Bereich, weit entfernt von einer potentiellen Substratsättigung. Eine Aussage über eine Michaelis-Menten-Kinetik und eines daraus bestimmbaren K_M -Wertes ist nicht möglich, da die Substratkonzentration bei der Bestimmung dieses Wertes mindestens um das 10-fache höher sein muss als die Konzentration des zu bestimmenden K_M -Wertes.^[207]

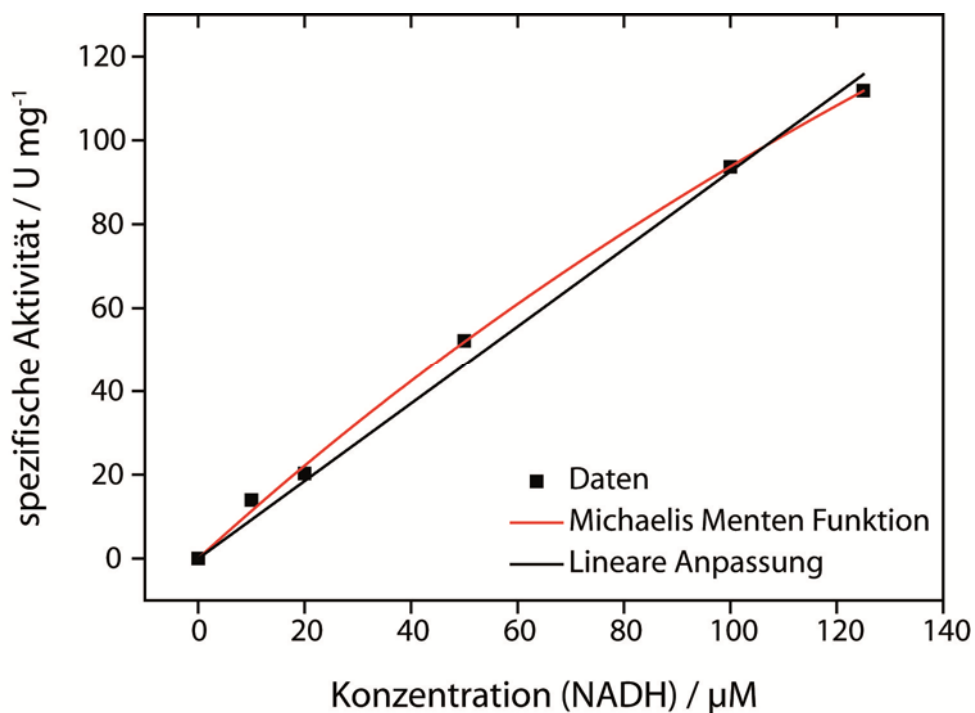


Abbildung 9. Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration

Eine höhere Cofaktorkonzentration konnte nicht eingesetzt werden, da bei einer NADH-Konzentration von $125 \mu\text{M}$ bereits eine Absorption von 1.2 erhalten wurde (Abbildung 8). Bei höherer Absorption kann der Messfehler für Kinetikmessungen zu groß werden, weshalb idealerweise in einem Absorptionsbereich von 0.3 – 1.2 gemessen wird.^[208-209] Eine niedrigere FeTSPP-Konzentration könnte gewählt werden, um so ein höheres Verhältnis von NADH zu FeTSPP (**8**) zu erreichen.

4.3.3 Spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Spektrophotometrische Untersuchungen zeigten, dass die Cofaktoren NADH und NADPH in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) und molekularem Sauerstoff in wässrigem Medium bei pH 7.0 oxidiert werden können (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Präparativ wurde die Einsatzmöglichkeit von **8** im Sinne einer künstlichen NAD(P)H-Oxidase anhand der Umsetzung von D-Glucose (**1**) bei pH 7.0 beschrieben (Kapitel 4.2). Da enzymkatalysierte Oxidationen meist bevorzugt in einem erhöhten pH-Bereich von pH 8.0 – 9.0 ablaufen,^[2,15,24,210] jedoch gerade in diesem pH-Bereich effiziente Methoden zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD(P)⁺ fehlen (Kapitel 3.1.2),^[15-16,24,96] wäre die Einsatzmöglichkeit der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** zur Cofaktorregenerierung bei diesen Bedingungen wünschenswert. Zur Untersuchung der generellen Einsatzmöglichkeit der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** in einem erweiterten pH-Bereich, wurde zunächst die spezifische Aktivität von **8** bezüglich NADH und NADPH mittels der beschriebenen „Methode A“ (Kapitel 4.3.1) bei pH 6.0, pH 7.5 und pH 8.0 bestimmt.

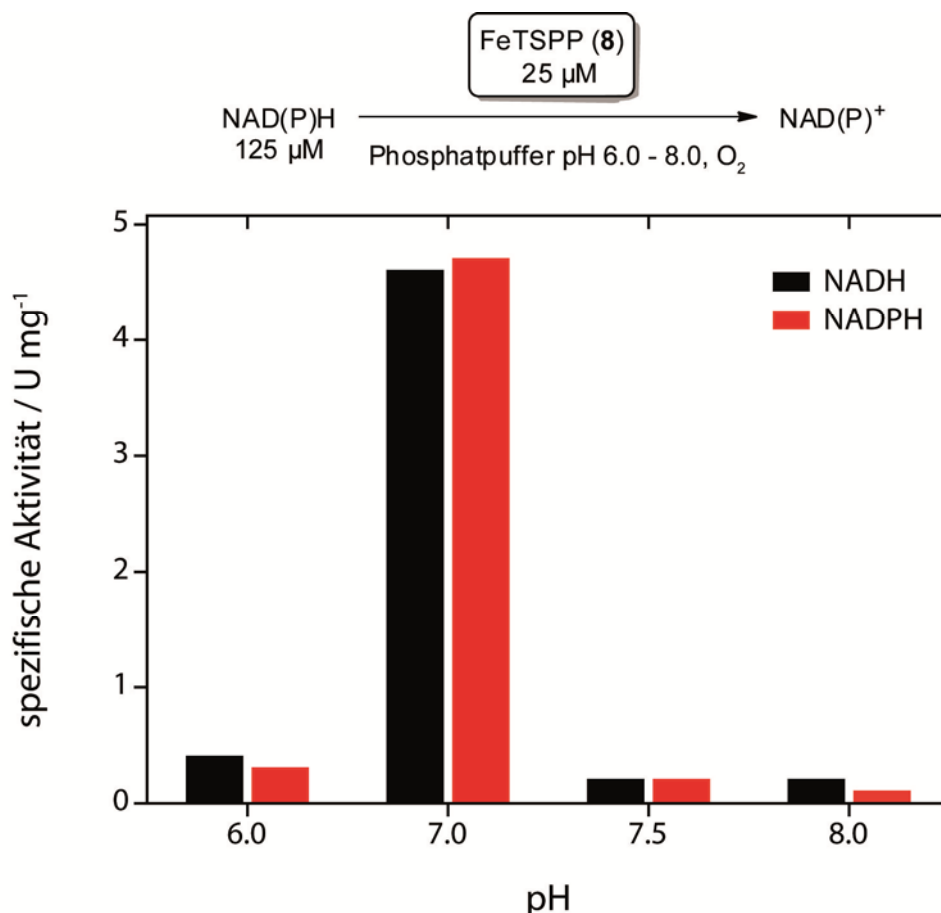


Abbildung 10. Spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert (Methode A)

Bei Verwendung einer 25.0 μM FeTSPP-Lösung sowie einer Cofaktorkonzentration von 125 μM wurde bei pH 6.0 eine spezifische Aktivität von 0.4 U mg^{-1} bzw. 0.3 U mg^{-1} bezüglich NADH bzw. NADPH bestimmt (Abbildung 10). Bei pH 7.5 wurden unter den gleichen Bedingungen spezifische Aktivitäten von 0.2 U mg^{-1} für die Regenerierung von NAD^+ sowie von NADP^+ gemessen und die entsprechenden Messungen bei pH 8.0 lieferten Aktivitäten von 0.2 U mg^{-1} bzw. 0.1 U mg^{-1} für die Regenerierung von NAD^+ bzw. NADP^+ (Abbildung 10). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen, wurden bei pH 7.0 deutlich höhere spezifische Aktivitäten von 4.6 U mg^{-1} bzw. 4.7 U mg^{-1} für die Cofaktoren NADH bzw. NADPH erhalten (Abbildung 10). Insgesamt zeigen die beiden Cofaktoren NADH und NADPH gleiche Aktivitäten, sodass keine Selektivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** gegenüber einer der beiden Cofaktorformen erkennbar ist. Anschließend wurde die pH-Abhängigkeit der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**, jedoch nun unter Verwendung der „Methode B“ zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (Kapitel 4.3.2), untersucht.

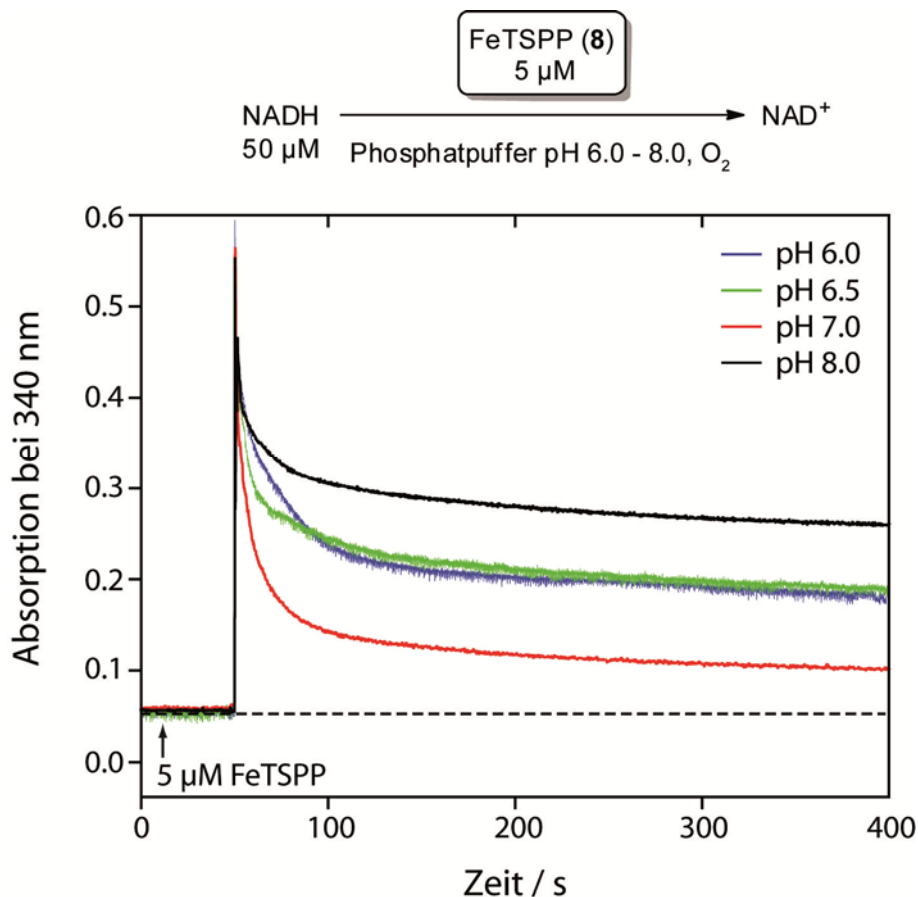


Abbildung 11. Messung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Hierzu wurde exemplarisch die Oxidation einer 50 μM NADH-Lösung in Gegenwart einer 5 μM FeTSPP-Lösung in einem pH-Bereich von pH 6.0 – 8.0 untersucht (Abbildung 11). Bei pH 7.0 wurde die höchste spezifische Aktivität von 52 U mg^{-1} gemessen. Bei leicht sauren pH-Werten nimmt die spezifische Aktivität bereits ab. So wurde bei pH 6.5 eine spezifische Aktivität von 29 U mg^{-1} und bei pH 6.0 von 16 U mg^{-1} erhalten (Abbildung 11). Im leicht basischen Milieu, bei pH 8.0 wurde eine spezifische Aktivität von 34 U mg^{-1} ermittelt (Abbildung 11). Entsprechend der Ergebnisse der „Methode A“ wurde mittels der „Methode B“ ebenfalls die höchste spezifische Aktivität bei pH 7.0 gemessen. Insgesamt wurden mit der „Methode B“ deutlich höhere Absolutwerte erhalten. Diese Methode wird als verlässlicher eingestuft. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** eine starke pH-Abhängigkeit zeigt. Eine Selektivität von **8** bezüglich einer der Nicotinamid-Cofaktoren NADH bzw. NADPH wurde nicht festgestellt.

Es stellt sich die Frage, weshalb **8** diese starke pH-Abhängigkeit zeigt. Wie bereits beschrieben, liegt FeTSPP (**8**) in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen Monomer- **8b** und Dimerform **8c** vor (Kapitel 3.2.1).^[166,168] Dies kann anhand von Absorptionsspektren von FeTSPP (**8**) in einem pH-Bereich von pH 4.0 – 10.0 veranschaulicht werden (Abbildung 12).^[166,168-169]

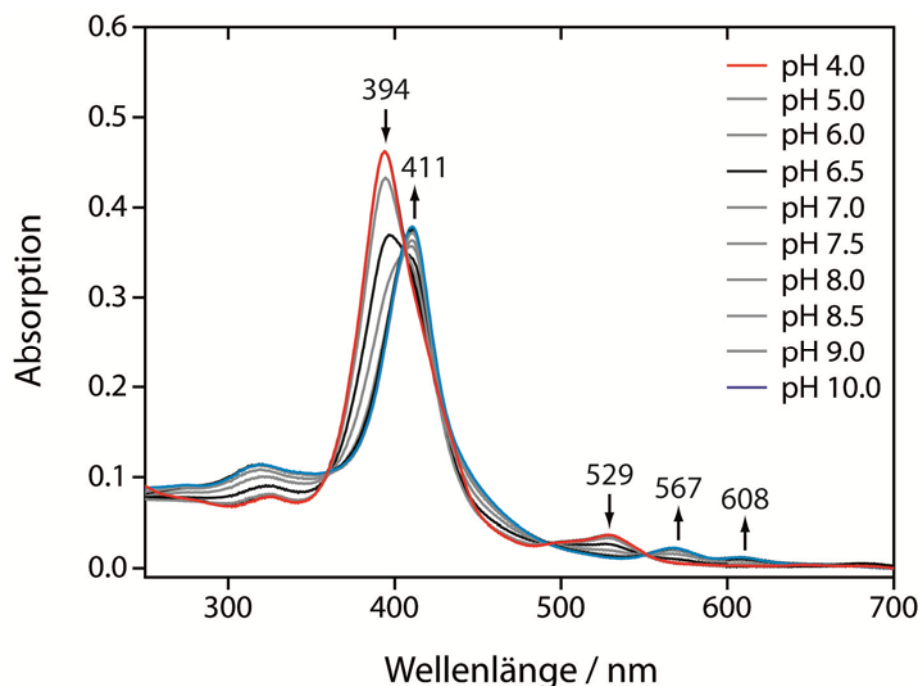


Abbildung 12. Absorptionsspektren von FeTSPP (**8**) in Abhängigkeit vom pH-Wert

Während die Soret-Bande des Monomers $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (**8b**) ein Absorptionsmaximum bei 394 nm zeigt, liegt die Soret-Bande des Dimers **8c** bei einer Wellenlänge von 411 nm (Abbildung 12, rote bzw. blaue Kurve). Bei pH 6.5 sieht man deutlich das Vorhandensein beider Formen (Abbildung 12, schwarze Kurve). Bei saureren pH-Werten verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des Monomers **8b** und bei basischeren pH-Werten in Richtung der Dimerform **8c**. Bei pH 7.0 liegt bereits hauptsächlich die Dimerform **8c** vor, während nur noch eine leichte Bande vom Monomer **8b** erkennbar ist. Außerdem verschwindet die charakteristische Q-Bande des Monomers **8b** bei 529 nm bei höheren pH-Werten, während zwei neue Q-Banden des Dimers **8c** bei 567 und 608 nm entstehen. Das Monomer $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{4-}$ (**8d**) ist aufgrund zu geringer Konzentrationen nicht im Absorptionsspektrum erkennbar (siehe Kapitel 3.2.1).^[169]

Die Auftragung der Absorption bei 394 nm gegen den pH-Wert ergibt eine Titrationskurve und zeigt die Abnahme des Monomers $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (**8b**) mit steigendem pH-Wert (Abbildung 13). Der gemessene pK_S -Wert liegt bei ca. 6.5 und stimmt mit der Literatur überein (siehe Kapitel 3.2.1).^[168-169,211]

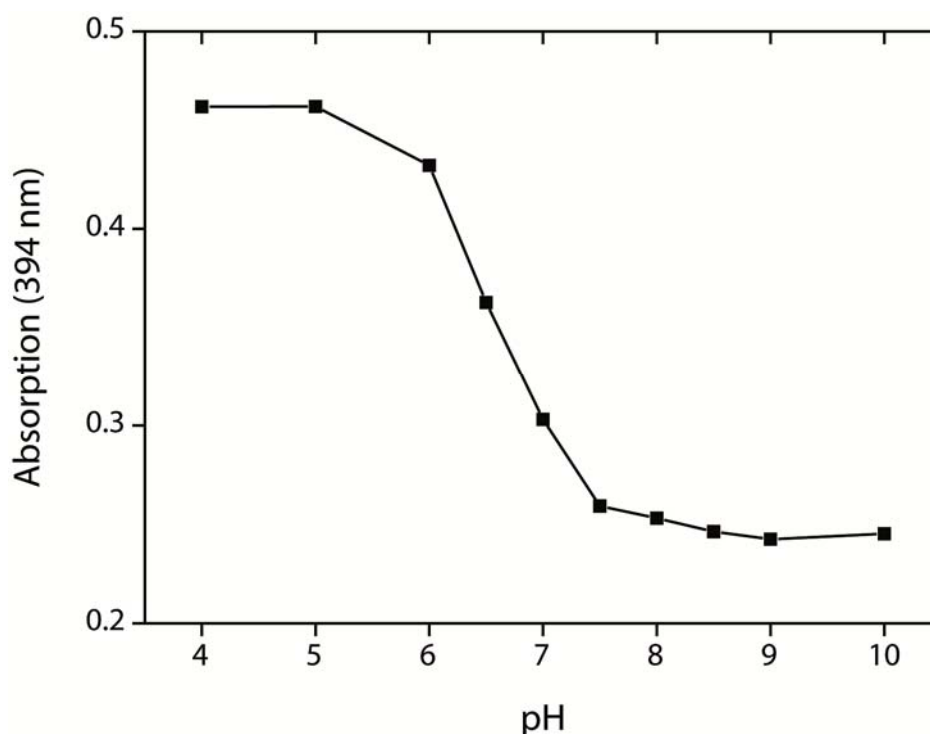


Abbildung 13. Absorption von FeTSPP (**8**) bei 394 nm in Abhängigkeit vom pH-Wert

Weshalb nun die spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** bei pH 7.0 am größten ist und sowohl zu saureren als auch zu basischeren pH-Werten deutlich abnimmt, ist noch nicht vollständig geklärt. Im sauren und neutralen pH-Bereich liegt FeTSPP (**8**), neben geringen Konzentrationen an Dimer **8c** überwiegend als Monomer $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (**8b**) und in geringen Konzentrationen als Monomer $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{4-}$ (**8d**) vor (Abbildung 12).^[168] Die hohe spezifische Aktivität bei pH 7.0 könnte von einer oder von beiden monomeren Formen von **8** ausgehen, allerdings wie IVANCA *et al.* das Monomer $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{4-}$ (**8d**) zwischen pH = 4.94 und 6.84 nach.^[168] Zu sauren pH-Werten nimmt die Konzentration an $[\text{FeTSPP}(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (**8b**) zu, wobei die gemessene spezifische Aktivität zu sauren pH-Werten abnimmt. Die spezifische Aktivität ist demnach nicht zur Konzentration an Monomer **8b** in der Lösung proportional. Das FeTSPP (**8**), welches wie oben gezeigt im Basischen hauptsächlich als Dimer **8c** vorliegt (Abbildung 12), besitzt vermutlich keine oder eine sehr geringe spezifische Aktivität als künstliche NAD(P)H-Oxidase. LENTE und ESPENSON beschrieben bereits eine Inaktivierung des katalytischen Verhaltens von **8** durch Dimerbildung bei einer anderen Anwendung (Kapitel 3.2.2).^[198] Die im Basischen gemessene niedrige spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** könnte von geringen Konzentrationen an Monomer **8b**, das sich mit dem Dimer **8c** im Gleichgewicht befindet, herrühren.

Die künstliche NAD(P)H-Oxidase **8** scheint im Basischen durch die Dimerbildung inaktiv zu werden. Gerade in diesem pH-Bereich wäre jedoch die Verfügbarkeit einer effizienten (künstlichen) NAD(P)H-Oxidase wünschenswert, da viele enzymatische Oxidationen im (schwach) Basischen bei pH-Werten von 8 – 9 bevorzugt ablaufen.^[2,15,24,210] Eine Möglichkeit zur Verhinderung der Dimerbildung und damit der Inaktivierung der NAD(P)H-Oxidase könnte der Einsatz eines sterisch gehinderten Eisen(III)-porphyrins sein. Ein solches Porphyrin, welches dem FeTSPP (**8**) sehr ähnlich ist, jedoch keinen μ -Oxo-Komplex im Basischen bildet, ist beispielsweise das 5,10,15,20-Tetrakis-(2,6-dimethyl-3-sulfonatophenyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**61**) (Abbildung 14).^[210,212] Alternativ kann die Dimerbildung der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** durch eine Immobilisierung verhindert werden, wodurch möglicherweise die Inaktivierung im Basischen ebenfalls vermieden werden könnte.^[175-176,194,213]

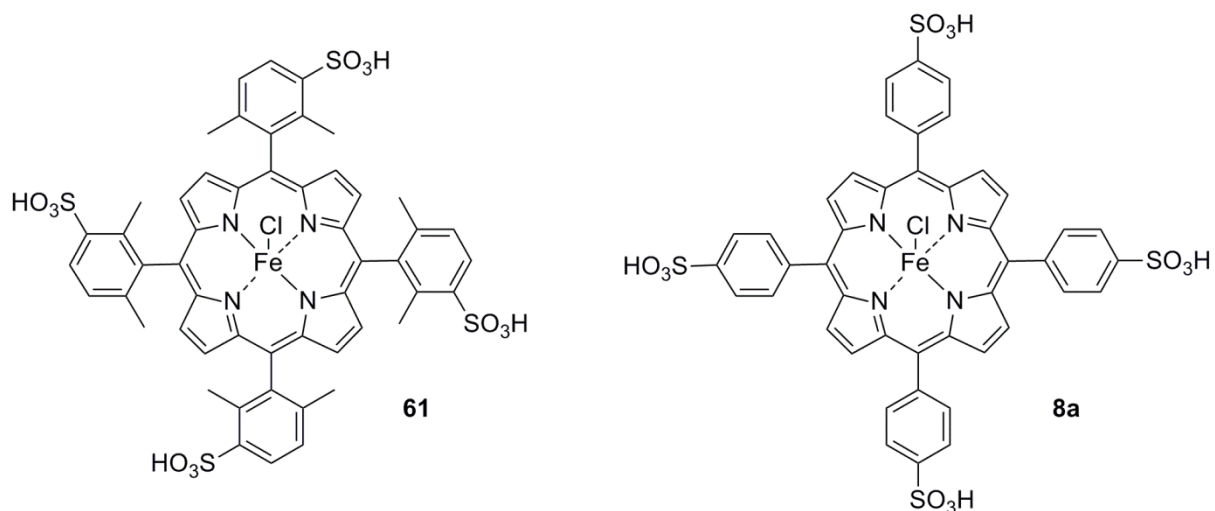
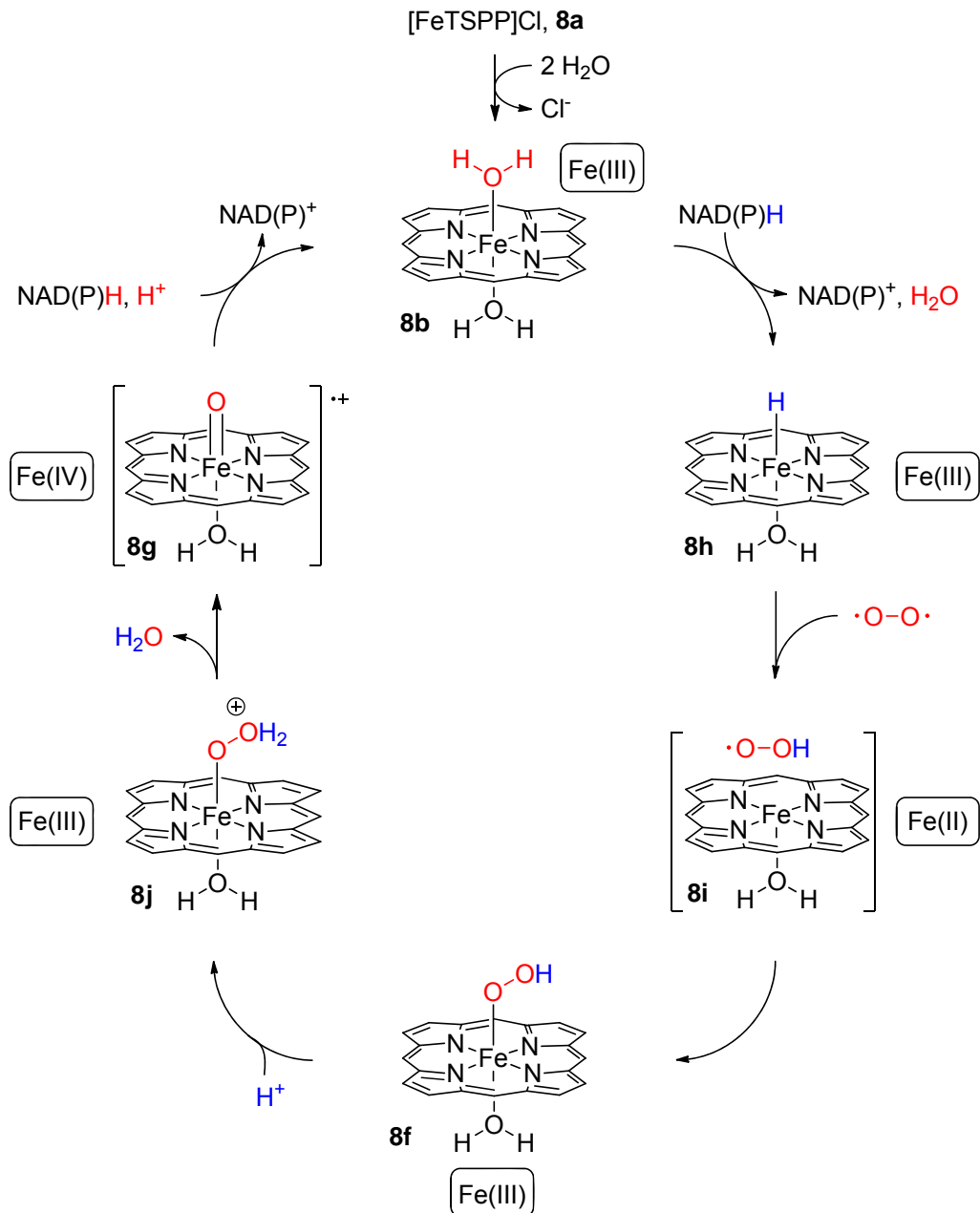
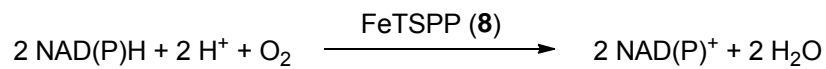


Abbildung 14. Das sterisch gehinderte Eisen(III)-porphyrin **61** im Vergleich zu FeTSPP (**8**) in der Form des fünffach koordinierten [FeTSPP]Cl (**8a**)

Insgesamt wurde anhand der spektroskopischen Bestimmung der spezifischen Aktivität gezeigt, dass die höchste Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** bei pH 7.0 liegt. Sowohl zu basischeren als auch zu saureren pH-Bereichen nimmt die spezifische Aktivität ab, was an den im jeweiligen pH-Bereich vorherrschenden Spezies von **8** liegen könnte. Allerdings liegen die ermittelten spezifischen Aktivitäten bei allen untersuchten pH-Werten in einem interessanten Bereich, sodass der Einsatz der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** in präparativen Umsetzungen bei verschiedenen pH-Werten untersucht wurde (Kapitel 4.4.1).

4.3.4 Katalysemechanismus

Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse (Notwendigkeit von Sauerstoff und Cofaktor (Kapitel 4.2.1) sowie eine starke pH-Abhängigkeit (Kapitel 4.3.3)) und der Literatur wird ein möglicher Katalysemechanismus des Eisen(III)-porphyrins **8** in der Funktion als biomimetische NAD(P)H-Oxidase wie folgt vorgeschlagen (Schema 45):



Schema 45. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der FeTSPP-katalysierten *in-situ*-Cofaktorregenerierung von NAD(P)⁺. (Die *meso*-ständigen Sulfonatophenylgruppen des Porphyrinliganden wurden für eine bessere Übersicht im Schema nicht berücksichtigt. Die vollständige Struktur von **8** ist in Abbildung 14 gezeigt.)

Das kommerziell erhältliche Eisen(III)-porphyrin **8** liegt zunächst als fünffach koordiniertes Eisen(III)-chlorid [FeTSPP]Cl (**8a**) vor (siehe 4.3.3, Abbildung 14) und bildet in Wasser den

sechsfach koordinierten Eisen(III)-Diaqua-Komplex **8b**. Ausgehend vom Eisen(III)-Diaqua-Komplex **8b** bildet sich vermutlich in Anwesenheit von NAD(P)H durch einen Hydridtransfer zunächst ein Eisen(III)-Hydrid-Komplex **8h**.^[214] Anschließend könnte über eine homolytische Fe-H-Bindungsspaltung der Komplexes **8i**, bestehend aus einer *high-spin*-Eisen(II)-Spezies und einem Hydroperoxyradikal, entstehen. Dieser high-spin-Komplex ist nun in der Lage Sauerstoff zu binden und wird unter Koordination und Reduktion von molekularem Sauerstoff in den Eisen-Hydroperoxo-Komplex **8f** überführt. **8f** wird nach Protonierung und Abspaltung von Wasser (analog dem Mechanismus der P450-Monooxygenasen) in eine Eisen(IV)-Oxo-Spezies **8g** überführt.^[2,215-218] Der abschließende Schritt besteht in der Regenerierung des Eisen(III)-porphyrins **8b**. Ähnliche Eisen(IV)-Oxo-Spezies wurden für die Oxidation von NADH-analogen Verbindungen beschrieben.^[219]

Alternativ kann die Bildung von Wasserstoffperoxid anstelle von Wasser als Koppelprodukt nicht ausgeschlossen werden. Die Bildung von Wasserstoffperoxid könnte entsprechend dem *peroxide-shunt* im Mechanismus der P450-Monooxygenasen ausgehend von einer Protonierung von **8f** und Bildung einer Eisen(II)-Spezies ablaufen. Anschließende Hydrierung durch NAD(P)H bildet den Eisen(III)-Hydrid-Komplex **8h**. Da kein Wasserstoffperoxid in der Reaktionslösung akkumuliert, müsste in diesem Fall ein anschließender Wasserstoffperoxidabbau stattfinden (Kapitel 3.2.2). Die Reaktion von FeTSPP (**8**) mit Wasserstoffperoxid ist in der Literatur beschrieben und verläuft vermutlich über die Bildung eines Eisen-Hydroperoxo-Komplexes **8f**, mit anschließender heterolytischer Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung des Wasserstoffperoxids zu **8g**.^[174] entsprechend Schema 45.^[185,198] Der parallele Abbau von Wasserstoffperoxid über eine homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung des Wasserstoffperoxids sowie durch Anlagerung eines zweiten Wasserstoffperoxidmoleküls an die Eisen(IV)-Oxo-Spezies **8g** wurden für Metalloporphyrine ebenfalls beschrieben.^[185]

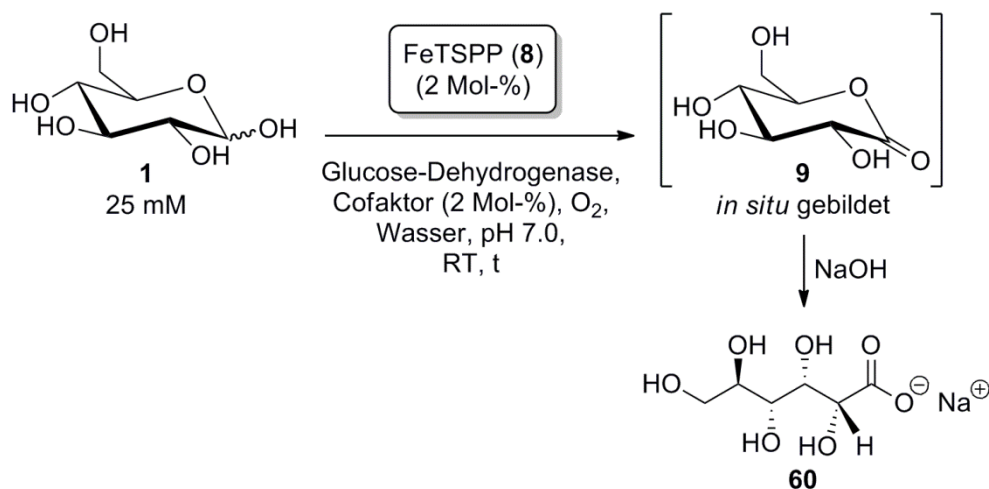
Gegenüber einer Reihe anderer Cofaktorregenerierungssysteme hat FeTSPP (**8**) den großen Vorteil, dass kein Wasserstoffperoxid akkumuliert. Besonders hervorzuheben ist außerdem, dass kein Cosubstrat zur Reaktionslösung zugegeben werden muss, sondern Luftsauerstoff als ein „grüner Redoxpartner“ fungiert.

4.4 Anwendungsbreite der künstlichen Cofaktorregenerierung mittels GDH

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Etablierung der Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) am Beispiel der Oxidation von D-Glucose (**1**) in Gegenwart einer Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. beschrieben (Benchmark-Versuch). Es wurde dabei auf die Notwendigkeit aller verwendeten Substanzen sowie das Koppelprodukt eingegangen. Nachdem eine solide Analytik etabliert werden konnte, wurde im nächsten Schritt die spezifische Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** ermittelt und Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit von **8** durchgeführt. Im Folgenden wird nun die Anwendungsbreite der künstlichen Cofaktorregenerierung im präparativen Maßstab diskutiert.

Zunächst wurde ausgehend vom Benchmark-Versuch (siehe Tabelle 2, Eintrag 2), der Cofaktor variiert. Während beim Benchmark-Versuch NAD⁺ verwendet wurde, wurden nun die reduzierte Cofaktor-Form NADH sowie die oxidierte und die reduzierte Form des phosphorylierten Nicotinamid-Cofaktors NADP⁺ bzw. NADPH eingesetzt. Bei allen Versuchen wurde ein vollständiger Umsatz erhalten (Tabelle 2, Einträge 1 – 4). Die Reaktionszeiten lagen hierbei im Bereich des Benchmark-Versuches von 17 – 24 Stunden. Dementsprechend kann FeTSPP (**8**) sowohl als Cofaktorregenerierungssystem für NAD⁺ als auch für NADP⁺ verwendet werden. Da insbesondere nur wenige geeignete Methoden zur Regenerierung von NADP⁺ bekannt sind,^[15] stellt dieses Konzept zur Cofaktorregenerierung eine wertvolle Ergänzung zu den bisher bekannten Methoden dar.

Als nächstes wurde analog zum Benchmark-Versuch mit Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. eine weitere Glucose-Dehydrogenase in Gegenwart des metallorganischen Eisenporphyrins **8** zur Cofaktorregenerierung verwendet. Die Oxidation von D-Glucose (**1**) durch die Glucose-Dehydrogenase aus *Thermoplasma acidophilum* in Anwesenheit von NADPH als Cofaktor verlief ebenfalls erfolgreich und lieferte bereits nach 7 Stunden einen quantitativen Umsatz (Tabelle 2, Eintrag 4). Die Wechselzahlen (TONs) der jeweiligen Versuche lagen für das FeTSPP (**8**) bei 48 – 50 (Tabelle 2, Versuche 1 – 4).

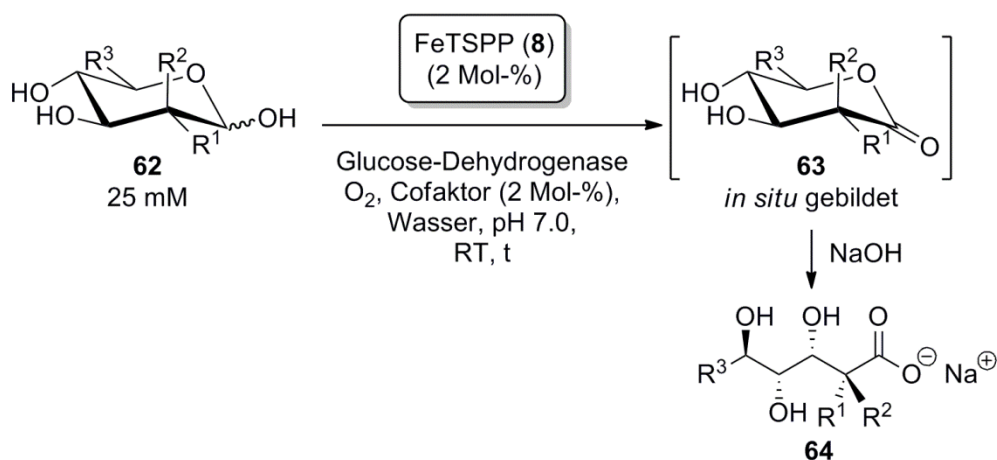
Tabelle 2. FeTSPP-katalysierte *in-situ*-Cofaktorregenerierung bei der enzymatischen Oxidation von D-Glucose (**1**)

Eintrag	Substrat	Biokatalysator	Cofaktor	t / h	Umsatz ^c / %
1 ^a	D-Glucose (1)	GDH aus <i>Bacillus</i> sp.	NADH	24	≥97
2 ^a	D-Glucose (1)	GDH aus <i>Bacillus</i> sp.	NAD ⁺	17 – 24	≥97
3 ^a	D-Glucose (1)	GDH aus <i>Bacillus</i> sp.	NADP ⁺	18	≥97
4 ^b	D-Glucose (1)	GDH aus <i>T. acidophilum</i>	NADPH	7	≥97

a) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥30 U mg⁻¹, ≥120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an Substrat **1**); b) Verwendung von GDH aus *Thermoplasma acidophilum* (1 mg, ≥30 U mg⁻¹, ≥120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an Substrat **1**); c) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **60** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **1** beobachtet wird und die Hydrolyse von **9** zu **60** quantitativ verläuft.

Die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. ist in der Lage, neben D-Glucose (**1**) auch weitere Monosaccharide als Substrate zu akzeptieren. Zur Untersuchung der Substratbreite wurden exemplarisch D-Mannose (**62a**) sowie D-Xylose (**62b**), analog der Umsetzung von D-Glucose (**1**), als Substrate in Anwesenheit des Cofaktorregenerierungssystems getestet. Die Oxidation von D-Mannose (**62a**) bzw. D-Xylose (**62b**) verlief quantitativ mit Umsätzen von ≥95% bzw. ≥98% (Tabelle 3, Einträge 1 und 2).

Tabelle 3. FeTSPP-katalysierte *in-situ*-Cofaktorregenerierung bei der enzymatischen Oxidation der Monosacchariden D-Mannose (**62a**) sowie D-Xylose (**62b**)



Eintrag	Substrat	R ¹	R ²	R ³	Cofaktor	t / h	Umsatz ^c / %
1 ^a	D-Mannose (62a)	H	OH	CH ₂ OH	NADP ⁺	264	≥95
2 ^b	D-Xylose (62b)	OH	H	H	NADP ⁺	24	≥98

a) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥30 U mg⁻¹, ≥120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an Substrat **62a**); b) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. (1.5 mg, ≥30 U mg⁻¹, ≥180 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an Substrat **62b**); c) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **64** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **62** beobachtet wird und die Hydrolyse von **63** zu **64** quantitativ verläuft.

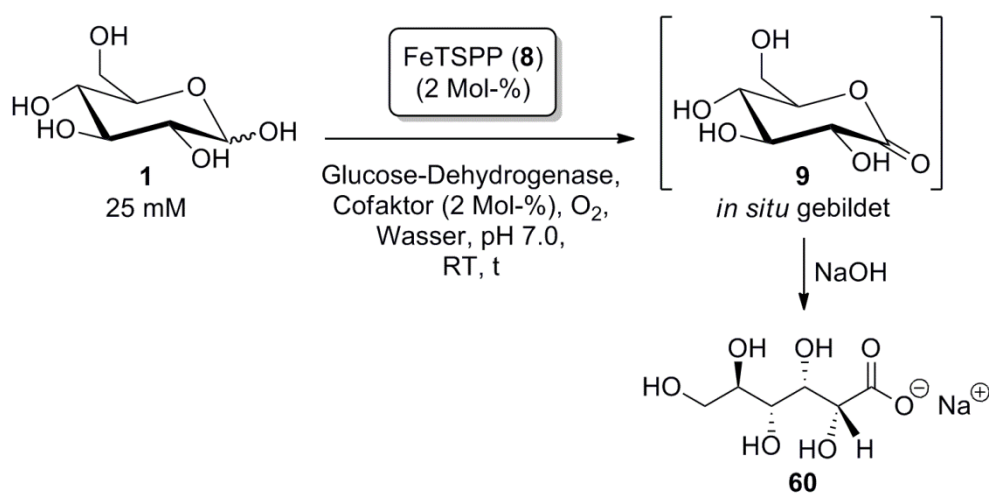
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FeTSPP (**8**) im präparativen Maßstab als künstliche NADH- und NADPH-Oxidase mit guten Wechselzahlen (TONs) eingesetzt werden kann. In Anwesenheit von **8** konnten alle drei getesteten Monosaccharide (**1**, **62a** und **62b**) quantitativ oxidiert werden, wobei außerdem zwei verschiedene Glucose-Dehydrogenasen zum Einsatz kamen.

4.4.1 Reaktionsbedingungen der Oxidation von D-Glucose (**1**) mittels GDH

Ausgehend vom Benchmark-Versuch (Oxidation von D-Glucose (**1**) mittels Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung) wurde zunächst die Enzymladung, sowie die Cofaktor- und Porphyrinkonzentration variiert. Anschließend wurde das Cofaktorregenerierungssystem bei

verschiedenen pH-Werten bzw. bei einer vergrößerten Reaktionstemperatur untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Beladung des Biokatalysators von 1 mg ($\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat **1**) auf bis zu 33 μg ($\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, ($\geq 12 \text{ U mmol}^{-1}$ bzw.) $\geq 4 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat **1**) verringert werden konnte, ohne dass sich die Reaktionszeit von 17 – 24 Stunden für einen vollständigen Umsatz verlängerte (Tabelle 4, Einträge 1 – 3).

Tabelle 4. Oxidation von D-Glucose (**1**) mittels unterschiedlicher Mengen Glucose-Dehydrogenase mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)



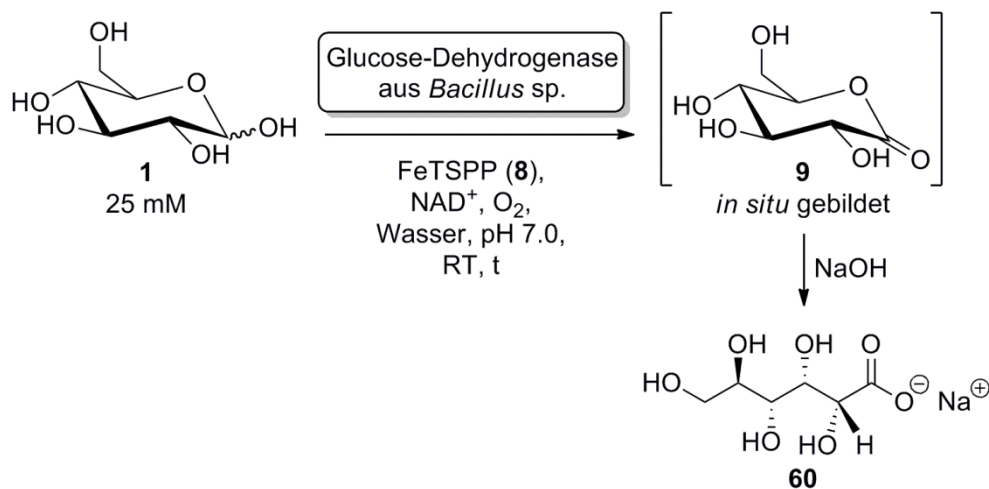
Eintrag	GDH	Cofaktor	t / h	Umsatz ^c / %
1 ^a	1 mg	NADP ⁺	17 – 24	≥ 97
2 ^a	100 μg	NADP ⁺	17	≥ 97
3 ^a	33 μg	NADP ⁺	22	≥ 97
4 ^a	10 μg	NADP ⁺	61	≥ 97
5 ^a	2 mg	NAD ⁺	11	≥ 97
6 ^b	1 mg	NADPH	7	≥ 97

a) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. ($\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$); b) Verwendung von GDH aus *Thermoplasma acidophilum* (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat **1**); c) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **60** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **1** beobachtet wird und die Hydrolyse von **9** zu **60** quantitativ verläuft.

Erst beim Einsatz von 10 μg ($\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 1.2 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat) Enzym verlängerte sich die Reaktionszeit auf 61 Stunden bis ein quantitativer Umsatz erhalten wurde (Tabelle 4, Eintrag 4). Eine Verdopplung der ursprünglichen Enzymbeladung auf 2 mg ($\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 240 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat) ging hingegen mit einer deutlichen Verkürzung der benötigten Reaktionszeit auf 11 Stunden einher (Tabelle 4, Eintrag 5). In Anwesenheit der Glucose-Dehydrogenase aus *Thermoplasma acidophilum* (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$ entsprechend $\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat) war die Reaktion sogar bereits nach 7 Stunden vollständig abgelaufen (Tabelle 4, Eintrag 6). Es ist also möglich, in Anwesenheit von 2 Mol-% FeTSP (**8**) einen quantitativen Umsatz nach 7 Stunden zu erreichen, was für den potentiellen Einsatz dieses Cofaktorregenerierungssystems in einem größeren Maßstab, bezüglich einer Raum-Zeit-Ausbeute, eine wesentliche Optimierung darstellt.

Darüber hinaus konnte die ursprünglich verwendete Menge an NAD^+ von 2 Mol-% auf 0.2 Mol-% verringert werden, ohne eine Verlangsamung der Reaktion oder einen Umsatzrückgang festzustellen (Tabelle 5, Einträge 1 – 2). Durch die Verringerung der Cofaktorkonzentration wurde entsprechend eine Wechselzahl (TON) von 485 – 500 für den Cofaktor erhalten. Für eine industrielle Anwendung sollte der TON-Wert ≥ 1000 sein.^[16] Niedrigere Cofaktorkonzentrationen wurden in dieser Arbeit nicht getestet. Gegebenenfalls könnte eine weitere Steigerung der Wechselzahl für dieses System erhalten werden. Im Gegensatz dazu resultierte die Verringerung der Eisen(III)-porphyrinmenge **8** von 2 Mol-% auf 1 Mol-% bzw. auf 0.1 Mol-% in einem deutlichen Umsatzverlust (Tabelle 5, Einträge 1, 3 und 4). Nach jeweils 24 Stunden Reaktionszeit konnten lediglich Umsätze von 47% bzw. 4% erhalten werden.

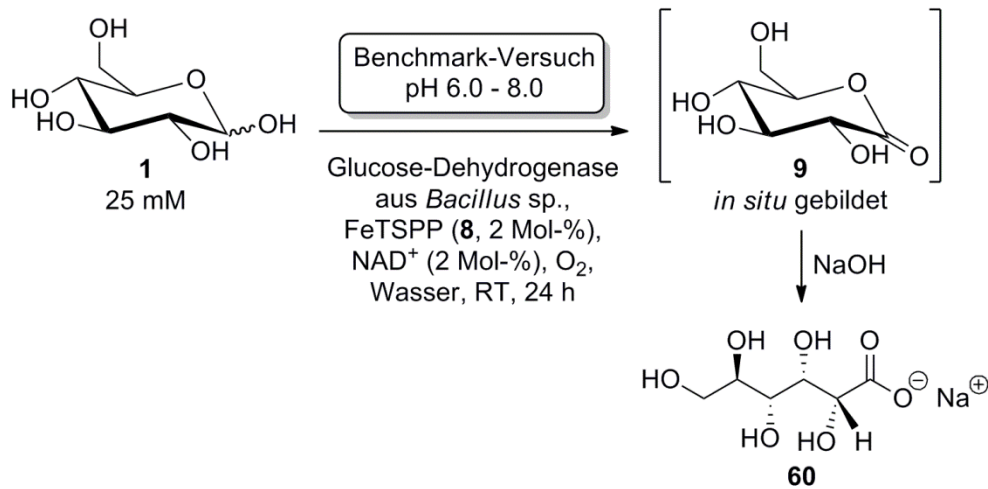
Tabelle 5. Oxidation von D-Glucose (**1**) mittels Glucose-Dehydrogenase mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung unter Variation der Cofaktor- und der FeTSPP-Konzentration



Eintrag	Cofaktor	FeTSPP (8)	t / h	Umsatz ^b / %
1 ^a	NAD ⁺ 2 Mol-%	2 Mol-%	17 – 24	≥97
2 ^a	NAD ⁺ 0.2 Mol-%	2 Mol-%	24	≥97
3 ^a	NAD ⁺ 2 Mol-%	1 Mol-%	24	47
4 ^a	NAD ⁺ 2 Mol-%	0.1 Mol-%	24	4

a) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥30 U mg⁻¹, ≥120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an Substrat **1**); b) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **60** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **1** beobachtet wird und die Hydrolyse von **9** zu **60** quantitativ verläuft.

Anschließend wurde die pH-Abhängigkeit des künstlichen Cofaktorregenerierungssystems **8** in präparativen Versuchen untersucht. Aktivitätsmessungen mittels UV/Vis-Spektroskopie zeigten bereits eine starke pH-Abhängigkeit der Oxidation von NADH mit FeTSPP (**8**), wobei im neutralen pH-Bereich bei pH 7.0 die höchste spezifische Aktivität (112 U mg⁻¹) erhalten wurde (siehe 4.3.2). Bei pH 6.0 bzw. bei pH 8.0 wurden spezifischen Aktivitäten von 16 U mg⁻¹ bzw. 34 U mg⁻¹ gemessenen (siehe 4.3.3). Diese spezifischen Aktivitäten liegen damit in einem präparativ interessanten Aktivitätsbereich.^[220-221] Nachdem die bisher beschriebenen präparativen Versuche alle bei neutralem pH-Wert durchgeführt worden waren, wurden nun analoge präparative Umsetzungen bei pH 6.0 und pH 8.0 durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6. Benchmark-Versuch bei variablem pH-Wert

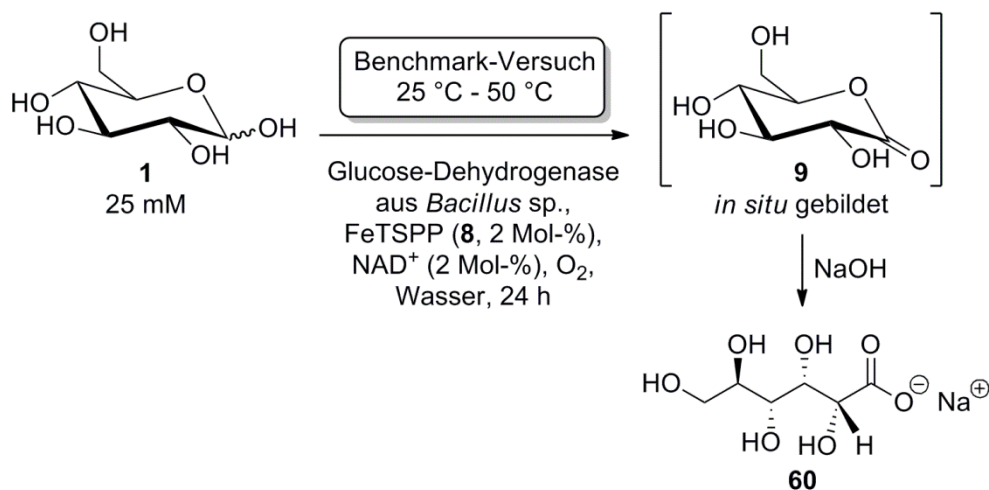
Versuch	Substrat	pH-Wert	t / h	Umsatz ^b / %
1 ^a	D-Glucose (1)	6.0	24	≥97
2 ^a	D-Glucose (1)	7.0	17 – 24	≥97
3 ^a	D-Glucose (1)	8.0	48	30

a) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥30 U mg⁻¹, ≥120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an Substrat **1**); b) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **60** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **1** beobachtet wird und die Hydrolyse von **9** zu **60** quantitativ verläuft.

Die Oxidation von D-Glucose (**1**) mittels Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung bei pH 8.0 kam nach 48 Stunden bei einem Umsatz von 30% zum Erliegen (Tabelle 4, Eintrag 3). Grundsätzlich ist bei pH 8.0 also eine gewisse Aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase vorhanden, jedoch fällt diese deutlich geringer aus, als von den photometrischen Voruntersuchungen zu erwarten war. Laut Herstellerangaben (Amano Enzyme AG) besitzt die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. ein pH-Optimum bei pH 8 – 9, sodass der Umsatzrückgang nicht auf das Enzym zurückzuführen sein sollte. Die hier verwendeten Cofaktoren NADH bzw. NAD⁺ besitzen unter den gewählten Bedingungen ausreichend große Halbwertszeiten und haben daher keinen Einfluss auf den Umsatzrückgang.^[32,111] Das Gleichgewicht von FeTSPP (**8**) liegt laut Literatur im basischen Milieu verstärkt auf der Dimerseite **8c**, weshalb vermutlich der Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit und der Umsatzrückgang hierdurch

erklärt werden können (siehe auch 4.3).^[166,168-169] Im leicht sauren Milieu bei pH 6.0, konnte hingegen, entsprechend dem Benchmark-Versuch bei pH 7.0, ebenfalls ein quantitativer Umsatz nach 24 Stunden Reaktionszeit erhalten werden (Tabelle 6, Einträge 1 – 2). Trotz der niedrigeren spezifischen Aktivität von FeTSPP (**8**) bei pH 6.0 von 16 U mg^{-1} (siehe 4.3), besitzt **8** immer noch ein ausreichendes Potential für eine attraktive Anwendung zur Cofaktorregenerierung. Bei pH 6.0 liegt FeTSPP (**8**) kaum als Dimer **8c** in Lösung vor, worin vermutlich die katalytische Aktivität begründet liegt.^[166,168-169]

Tabelle 7. Oxidation von D-Glucose (**1**) mittels Glucose-Dehydrogenase mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) bei variablen Reaktionstemperaturen



Eintrag	T / °C	t / h	Umsatz ^c / %
1 ^a	RT ^b	17 – 24	≥97
2 ^a	35	112	25
3 ^a	50	47	0

a) Verwendung von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg , $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat **1**); b) RT (Raumtemperatur ca. $25 \text{ }^\circ\text{C}$); c) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **60** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **1** beobachtet wird und die Hydrolyse von **9** zu **60** quantitativ verläuft.

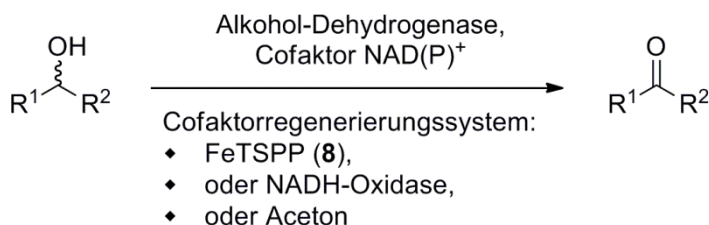
Des Weiteren wurde der Temperatureinfluss untersucht. Eine Temperaturerhöhung zeigte einen negativen Einfluß auf den Umsatz. Im Gegensatz zum Benchmarkversuch bei Raumtemperatur konnte bei einer Reaktionstemperatur von $35 \text{ }^\circ\text{C}$ nach 112 Stunden lediglich ein Umsatz von 25% erhalten werden (Tabelle 7, Eintrag 2). Die Reaktion stoppte

laut Reaktionskontrolle bereits nach 11 Stunden. Da sowohl die verwendete Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp., als auch der hier verwendete Cofaktor NAD⁺ über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 35 °C eingesetzt werden können, ist dieses Ergebnis ein Hinweis auf eine starke Temperaturabhängigkeit der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**. Bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C konnte nach 48 Stunden kein Produkt nachgewiesen werden (Tabelle 7, Eintrag 3).

Der Einsatz von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung ist also in einem pH-Bereich von pH 6.0 – 7.0 unter den beschriebenen Bedingungen eine gute Alternative zu den bereits etablierten Möglichkeiten. Eine Änderung des pH-Wertes auf pH 8.0, sowie eine Temperaturerhöhung oder eine niedrigere Porphyrinkonzentration zeichneten sich hingegen durch einen deutlichen Umsatzrückgang aus. Entsprechend den Ausführungen in Kapitel 4.3 könnte durch Verhinderung der Dimerbildung des verwendeten Eisen(III)-porphyrins **8** unter Umständen eine künstliche NAD(P)H-Oxidase erhalten werden, die im basischen Milieu eingesetzt werden kann.

4.5 Alkohol-Dehydrogenase-katalysierte Oxidation achiraler Alkohole

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Kopplung der künstlichen NAD(P)H-Oxidase FeTSPP (**8**) mit zwei Glucose-Dehydrogenasen beschrieben wurde, wird in den folgenden Kapiteln die Einsatzmöglichkeit von Alkohol-Dehydrogenasen (Rsp-ADH, Lk-ADH und ADH evo-200) zur Oxidation achiraler Alkohole zu den entsprechenden Ketonen in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung in wässrigem Medium diskutiert (Schema 46). Im Rahmen dieser Untersuchungen werden zusätzlich die Reaktionsbedingungen variiert und ein Vergleich mit bereits etablierten Cofaktorregenerierungssystemen (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* als Enzymgekoppelte Methode und Aceton als Substrat-gekoppelte Methode) durchgeführt.



Schema 46. Konzept der Biooxidation achiraler Alkohole in Kombination mit verschiedenen Cofaktorregenerierungssystemen

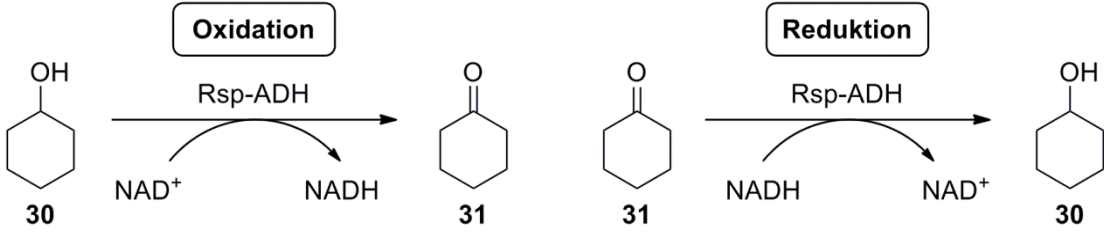
Mit jedem Substrat werden zunächst spektralphotometrische Untersuchungen zur Bestimmung von Enzymkinetiken durchgeführt. Für einen Vergleich der Enzymaktivität der Oxidationsrichtung mit der Reduktionsrichtung werden die jeweiligen Aktivitäten zunächst spektralphotometrisch bestimmt und in Relation zum Standardsubstrat des jeweiligen Enzyms gesetzt. Anschließend wird auf Basis der gefundenen Erkenntnisse aus den spektralphotometrischen Untersuchungen die Einsatzmöglichkeit der biomimetischen NAD(P)H-Oxidase **8** anhand präparativer enzymatischer Oxidationen untersucht. Die verwendeten Edukte und Produkte in diesem Kapitel sind – im Gegensatz zu FeTSPP (**8**) – mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar, weshalb die Analytik anhand von $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt werden konnte.

4.5.1 Oxidation von Cyclohexanol (**30**) zu Cyclohexanon (**31**)

4.5.1.1 Spektralphotometrische Untersuchung der Reaktionsrichtung

Als Vorversuche für die nachfolgenden präparativen Umsetzungen wurden Enzymkinetiken der Alkohol-Dehydrogenasen (Rsp-ADH, Lk-ADH und ADH evo-200) für die Reduktion von Cyclohexanon (**31**) sowie für die Oxidation von Cyclohexanol (**30**) bei pH 7.0 aufgenommen und in Relation zum jeweiligen Standardsubstrat gesetzt (Tabellen 8 – 10). Zunächst wurde die NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. untersucht. Das Standardsubstrat dieser Alkohol-Dehydrogenase ist *p*-Chloracetophenon (**65**) und es wurde eine volumetrische Aktivität von 62 U mL^{-1} bestimmt (Tabelle 8, Eintrag 1). Dieser Wert wurde als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 8, Eintrag 1).

Tabelle 8. Bestimmung der volumetrischen und der relativen Aktivität der Rsp-ADH

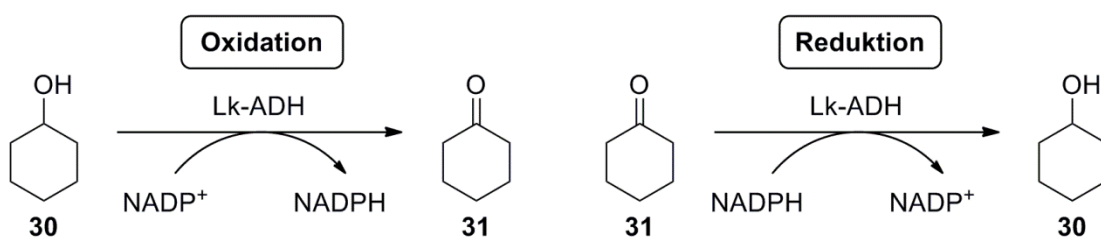


Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL^{-1}	rel. Aktivität / %
1	<i>p</i> -Chloracetophenon (65)	62	100
2	Cyclohexanon (31)	30	48
3	Cyclohexanol (30)	1	2

Aus Tabelle 8 wird ersichtlich, dass die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. sowohl Cyclohexanon (**31**) als auch Cyclohexanol (**30**) als Substrat akzeptiert (Tabelle 8, Einträge 2 – 3). Für Cyclohexanon (**31**) liegt die ermittelte relative Aktivität von 48% in einem interessanten Bereich für präparative Umsetzungen. Im Vergleich dazu wurde für die Oxidation von Cyclohexanol (**30**) eine wesentlich geringere relative Aktivität von 2% gemessen.

Anschließend wurde die NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* untersucht. Das Standardsubstrat dieser Alkohol-Dehydrogenase ist Acetophenon (**27**) für das eine volumetrische Aktivität von 1544 U mL^{-1} bestimmt wurde (Tabelle 9, Eintrag 1). Dieser Wert wurde als relative Aktivität als 100% definiert (Tabelle 9, Eintrag 1). Alle Messungen wurden bei pH 7.0 durchgeführt.

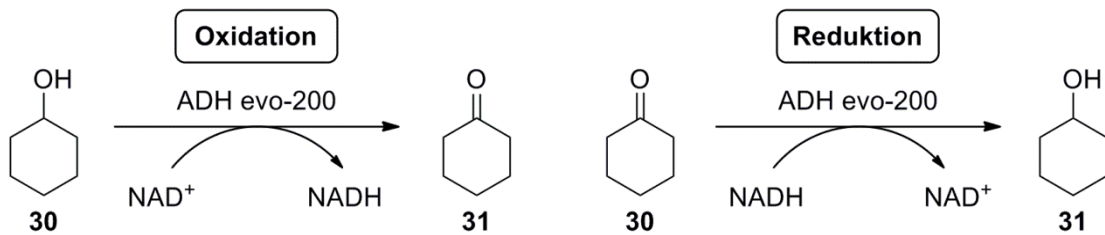
Tabelle 9. Bestimmung der volumetrischen und der relativen Aktivität der Lk-ADH



Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL^{-1}	rel. Aktivität / %
1	Acetophenon (27)	1544	100
2	Cyclohexanon (31)	1690	109
3	Cyclohexanol (30)	108	7

Für die Reduktion von Cyclohexanon (**31**) wurde eine vergleichbar hohe volumetrische Aktivität wie für die Reduktion des Standardsubstrates gemessen (Tabelle 9, Einträge 1 – 2). Die Oxidation ergab hingegen eine wesentlich niedrigere Aktivität und liegt bei 7% im Vergleich zur Aktivität des Standardsubstrates (Tabelle 9, Eintrag 3). Wie auch beim Einsatz der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. wurde unter den verwendeten Bedingungen eine deutlich höhere Aktivität für die Reduktion als für die Oxidation erhalten.

Schließlich wurde die NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase evo-200 untersucht. Das Standardsubstrat dieser Alkohol-Dehydrogenase ist Acetessigester (**66**). Die spezifische Aktivität bezüglich des Standardsubstrates wurde auf 4.4 U mg^{-1} bestimmt und als relative Aktivität auf 100% definiert (Tabelle 10, Eintrag 1). Alle Messungen wurden bei pH 7.0 durchgeführt.

Tabelle 10. Bestimmung der spezifischen und der relativen Aktivität der ADH evo-200

Eintrag	Substrat	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	Acetessigester (66)	4.4	100
2	Cyclohexanon (31)	4.7	106
3	Cyclohexanol (30)	0.6	14

Die Alkohol-Dehydrogenase evo-200 besitzt eine hohe Aktivität bezüglich Cyclohexanon (**31**) und es wurde eine relative Aktivität von 106% gemessen (Tabelle 10, Eintrag 2). Für die Oxidation von Cyclohexanol (**30**) wurde eine relative Aktivität von 14% bestimmt (Tabelle 10, Eintrag 3).

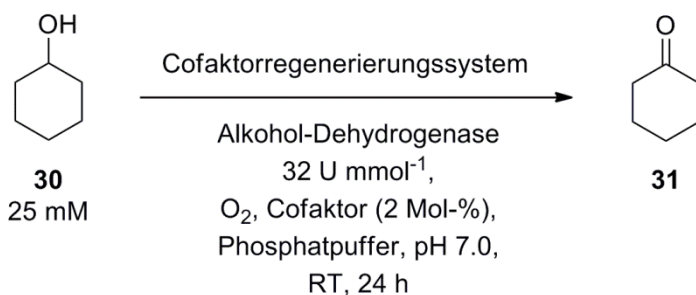
Die drei verwendeten Alkohol-Dehydrogenasen akzeptieren alle Cyclohexanon (**31**) und Cyclohexanol (**30**) als Substrat, wobei jeweils beim verwendeten pH-Wert von 7.0 die relativen Aktivitäten für die Reduktion deutlich höher sind als die Aktivitäten der Oxidation.

4.5.1.2 Präparative Umsetzungen

Aufgrund der positiven Vorversuche, werden im Folgenden präparative Untersuchungen unter Einsatz der getesteten Enzyme (Rsp-ADH, Lk-ADH und ADH evo-200) durchgeführt. Hierbei wird die Oxidation von Cyclohexanol (**30**) in wässrigem Medium in Kombination mit der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** sowie zum Vergleich in Kombination mit bereits etablierten Cofaktorregenerierungssystemen (NADH-Oxidase bzw. Aceton als Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung) durchgeführt. Zunächst wurde die Oxidation von Cyclohexanol (**30**) zu Cyclohexanon (**31**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. untersucht. Bei Verwendung von 2 Mol-% FeTSP (**8**) zur Cofaktorregenerierung sowie 2 Mol-% des Cofaktors NAD⁺ wurde nach einer Reaktionszeit

von 24 Stunden ein produktbezogener Umsatz von 35% und eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute (Erklärung zu „berechnete Ausbeute“ siehe AAV 4, Kapitel 7.2.4) von 20% bzw. 37% erhalten (Tabelle 11, Eintrag 1). Dieses Ergebnis zeigt, dass FeTSPP (**8**) prinzipiell für die Cofaktorregenerierung bei Oxidationsreaktionen unter Einsatz einer Alkohol-Dehydrogenase, im Sinne einer biomimetischen NADH-Oxidase geeignet ist.

Tabelle 11. Oxidation von Cyclohexanol (**30**) mit *in-situ*-Cofaktorregenerierung



Eintrag	Enzym	Cofaktor	Cofaktor- regenerierung ^a	produktbezogener Umsatz / %	Ausbeute ^b / % Produkt / Edukt
1	Rsp-ADH	NAD ⁺	FeTSPP (8)	35	20 / 37
2	Lk-ADH	NADP ⁺	FeTSPP (8)	26	22 / 61
3	ADH evo-200	NAD ⁺	FeTSPP (8)	<1	<1 / 80
4	Rsp-ADH	NAD ⁺	NADH-Oxidase	36	32 / 56
5	Rsp-ADH	NAD ⁺	Aceton	16	16 / 83
6 ^c	Rsp-ADH	NAD ⁺	FeTSPP (8)	35	22 / 41

a) FeTSPP (**8**): 2 Mol-% bezogen auf 0.25 mmol Substrat **30**; NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*: 32 U mmol⁻¹; Aceton: 25 Vol.-%; b) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4, Kapitel 7.2.4; c) Dieser Versuch wurde bei pH 8.0 durchgeführt.

Beim Einsatz der NADPH-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* konnte bei gleichen Reaktionsbedingungen ein produktbezogener Umsatz von 26% und eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 22% bzw. 61% erzielt werden (Tabelle 11, Eintrag 2). Entsprechend der Funktionsweise als biomimetische NADH-Oxidase ist FeTSPP (**8**) demnach ebenfalls für die Cofaktorregenerierung bei Oxidationsreaktionen unter Einsatz einer NADPH-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase, im Sinne einer biomimetischen NADPH-Oxidase geeignet. Als nächstes Enzym wurde die Alkohol-Dehydrogenase evo-200

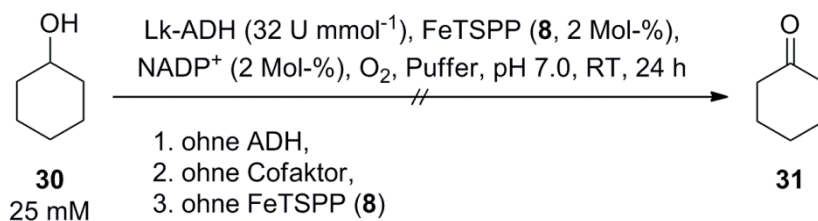
untersucht. Die Synthese von Cyclohexanon (**31**) in Anwesenheit dieses Enzyms lieferte allerdings keinen Umsatz (Tabelle 11, Eintrag 3). Die Umsetzung von Cyclohexanol (**30**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. (Tabelle 11, Eintrag 1) wurde alternativ zur Cofaktorregenerierung mit FeTSPP (**8**) mit zwei weiteren Regenerierungssystemen durchgeführt. Bei Verwendung der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* konnte nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden ein produktbezogener Umsatz von 36% und eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 32% bzw. 56% erhalten werden (Tabelle 11, Eintrag 4). Die beiden Cofaktorregenerierungssysteme FeTSPP (**8**) und die NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* lieferten unter analogen Reaktionsbedingungen vergleichbare Ergebnisse mit produktbezogenen Umsätzen von 35 bzw. 36% (Tabelle 11, Einträge 1 und 4). Im Vergleich dazu wurde bei Verwendung einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung, bei der Aceton im Überschuss (25 Vol.-%) zum Reaktionsgemisch gegeben wurde, lediglich ein produktbezogener Umsatz von 16% erhalten (Tabelle 11, Eintrag 5). Außerdem wurde die Umsetzung von Cyclohexanol (**30**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 7.0 (Tabelle x, Eintrag 6), zusätzlich bei pH 8.0 durchgeführt, wobei ebenfalls ein produktbezogener Umsatz von 35% erhalten wurde. Die berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute lag bei 22% bzw. 41% (Tabelle 11, Eintrag 6).

Die Summe der berechneten Produkt- und Eduktausbeute weicht teilweise deutlich von der theoretischen Maximalausbeute von 100% ab (Tabelle 11, Einträge 1 – 6). Dies liegt an Substanzverlusten der relativ leicht flüchtigen Substanzen insbesondere beim Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei der Aufarbeitung.

4.5.1.3 Kontrollversuche

Zur Untersuchung, ob alle beteiligten Komponenten (Alkohol-Dehydrogenase, Cofaktor und FeTSPP (**8**), für die Oxidation von Cyclohexanol (**30**) zu Cyclohexanon (**31**) notwendig sind, wurden entsprechende Kontrollversuche unter Ausschluss jeweils einer dieser Komponenten durchgeführt. Bei keinem der Kontrollversuche konnte eine Umsetzung beobachtet werden. Nebenprodukte wurden weder bei den Kontrollversuchen noch bei den enzymatischen Umsetzungen beobachtet.

Tabelle 12. Kontrollversuche



Eintrag	Enzym	Cofaktor	FeTSPP (8) ^a	produktbezogener	berechnete Ausbeute ^b / %
				Umsatz / %	Produkt / Edukt
1	–	NADP ⁺	2 Mol-%	<1	1 / 80
2	Lk-ADH	–	2 Mol-%	<1	<1 / 65
3	Lk-ADH	NADP ⁺	–	<1	<1 / 81

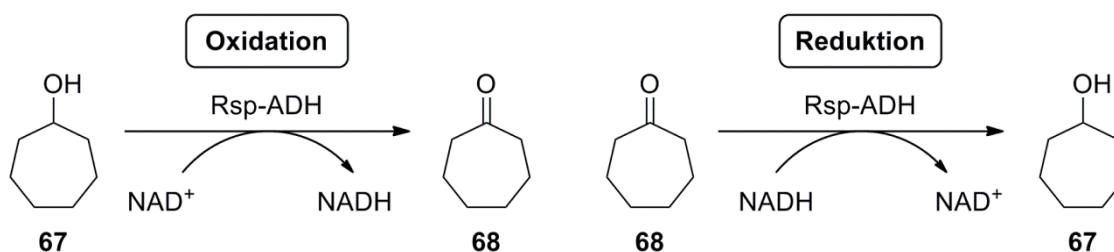
a) FeTSPP (8): 2 Mol-% bezogen auf 0.25 mmol Substrat **30**; b) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4.

4.5.2 Oxidation von Cycloheptanol (**67**) zu Cycloheptanon (**68**)

4.5.2.1 Spektralphotometrische Untersuchung der Reaktionsrichtung

Zunächst wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. untersucht. Für das Standardsubstrat *p*-Chloracetophenon (**65**) wurde bei pH 7.0 eine volumetrische Aktivität von 62 U mL⁻¹ bestimmt.

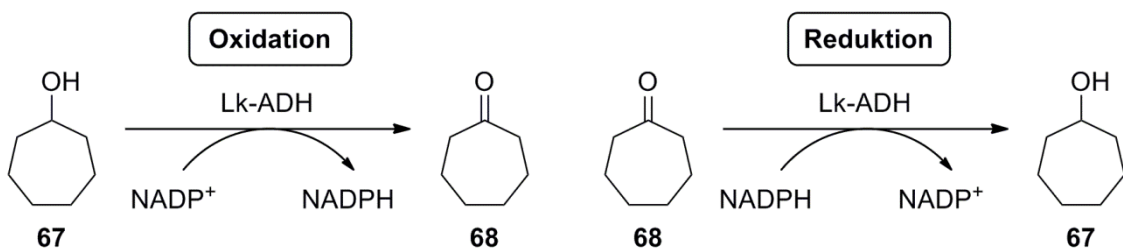
Tabelle 13. Aktivität der Rsp-ADH bezüglich Cycloheptanol (**67**) und Cycloheptanon (**68**)



Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	62	100
2	Cycloheptanon (68)	5	8
3	Cycloheptanol (67)	2	3

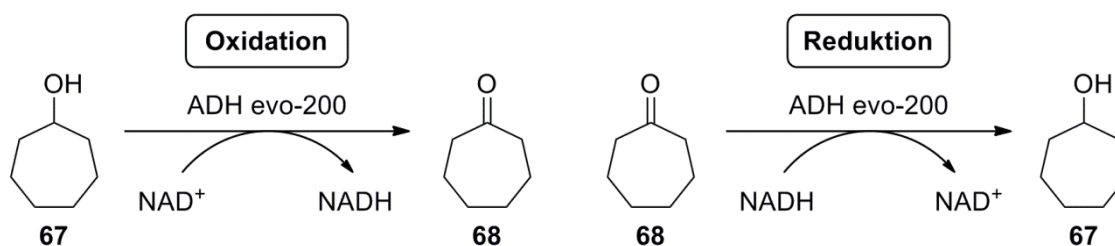
Dieser Wert wurde als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 13, Eintrag 1). Im Vergleich zum Standardsubstrat (**65**) wurden Cycloheptanon (**68**) und Cycloheptanol (**67**) bei pH 7.0 mit relativen Aktivitäten von 8% bzw. 3% umgesetzt (Tabelle 13, Einträge 2 – 3). Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. akzeptiert demnach die Verbindungen Cycloheptanon (**68**) und Cycloheptanol (**67**) als Substrat. Als nächstes Enzym wurde die NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* untersucht. Bezogen auf das Standardsubstrat Acetophenon (**27**) wurde eine volumetrische Aktivität von 1544 U mL^{-1} bestimmt und als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 14, Eintrag 1). Auch die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* akzeptiert Cycloheptanon (**68**) und Cycloheptanol (**67**) als Substrat mit relativen Aktivitäten von 31% bzw. 13% bezüglich **68** bzw. **67** (Tabelle 14, Einträge 2 – 3). Alle Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt.

Tabelle 14. Aktivität der Lk-ADH bezüglich Cycloheptanol (**67**) und Cycloheptanon (**68**)



Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL^{-1}	rel. Aktivität / %
1	Acetophenon (27)	1544	100
2	Cycloheptanon (68)	472	31
3	Cycloheptanol (67)	197	13

Als letztes Enzym dieser Messreihe wurde die Alkohol-Dehydrogenase evo-200 untersucht. Bezüglich des Standardsubstrates Acetessigester (**66**) wurde eine spezifische Aktivität von 4.7 U mg^{-1} ermittelt und als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 15, Eintrag 1). Relativ dazu wurde eine Aktivität von 28% für das Substrat Cycloheptanon (**68**) gemessen (Tabelle 15, Eintrag 2). Für eine andere Enzymcharge der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 wurde für das Standardsubstrat **66** eine spezifische Aktivität von 4.4 U mg^{-1} ermittelt und als relative Aktivität auf 100% definiert (Tabelle 15, Eintrag 3).

Tabelle 15. Aktivität der ADH evo-200 bezüglich Cycloheptanol (**67**) und Cycloheptanon (**68**)

Eintrag	Substrat	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	Acetessigester (66)	4.7	100
2	Cycloheptanon (68)	1.3	28
3	Acetessigester (66)	4.4	100
4	Cycloheptanol (67)	1.1	24

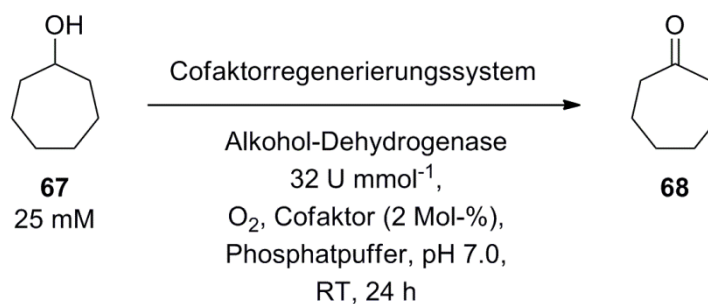
Bezogen auf diese Aktivität wurde anschließend für die Oxidation von Cycloheptanol (**67**) eine relative Aktivität von 24% erhalten (Tabelle 15, Eintrag 4). Interessanterweise liegen die relativen Aktivitäten für Cycloheptanon (**68**) und Cycloheptanol (**67**), also für die reduktive und die oxidative Richtung, sehr nahe beieinander, was auf ein gutes Ergebnis bei präparativen Umsetzungen hoffen lässt (28% bzw. 24%, Tabelle 15, Einträge 2 und 4). Alle Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt.

4.5.2.2 Präparative Umsetzungen

Es wurde gezeigt, dass das Substrat Cycloheptanol (**67**) von den drei getesteten Alkohol-Dehydrogenasen (Rsp-ADH, Lk-ADH und ADH evo-200) akzeptiert wird, weshalb Untersuchungen im präparativen Maßstab mit diesen Enzymen durchgeführt wurden. In Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. und NADH wurde Cycloheptanol (**67**), unter Einsatz von FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung, in wässrigem Medium bei pH 7.0 in 24 Stunden Reaktionszeit quantitativ zu Cycloheptanon (**68**) oxidiert (Tabelle 16, Eintrag 1). Die vollständige Umsetzung lief in Gegenwart von 2 Mol-% Cofaktor NADH sowie 2 Mol-% FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung ab und die berechnete Produktausbeute wurde auf 80% bestimmt (Tabelle 16, Eintrag 1). Entsprechend wurde bei Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase

aus *Lactobacillus kefir* und NADP^+ als Cofaktor ein produktbezogener Umsatz von >99% und eine berechnete Produktausbeute von 89% erhalten (Tabelle 16, Eintrag 2). In einem Wiederholungsversuch wurde hingegen ein Umsatz von 95% und eine berechnete Ausbeute von 85% ermittelt. Eine schlechtere Durchmischung des Reaktionsgemisches oder eine geringere Qualität des verwendeten Cofaktors könnten für die unvollständige Umsetzung verantwortlich sein. Im Gegensatz dazu, wurde beim Einsatz der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 kein Umsatz beobachtet, obwohl die spektralphotometrischen Vorversuche (4.5.2.1) gerade für diese Enzym-Substrat-Kombination eine hohe relative Aktivität ergeben hatte (Tabelle 16, Eintrag 3).

Tabelle 16. Enzymatische Oxidation von Cycloheptanol (**67**) mit *in-situ*-Cofaktorregenerierung



Versuch	Enzym	Cofaktor	Cofaktor-regenerierung ^a	produktbezogener Umsatz / %	Ausbeute ^b / % Produkt / Edukt
1	Rsp-ADH	NADH	FeTSPP (8)	>99	80 / 0
2	Lk-ADH	NADP^+	FeTSPP (8)	>99 (95) ^c	89 (85) ^c / 0 (5) ^c
3	evo-200	NAD^+	FeTSPP (8)	<1	<1 / 89
5	Rsp-ADH	NAD^+	NADH-Oxidase	92	70 / 6
6	Rsp-ADH	NAD^+	Aceton	14	13 / 77

a) FeTSPP (**8**): 2 Mol-% bezogen auf 0.25 mmol Substrat (**67**); NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*: 32 U mmol⁻¹; Aceton: 25 Vol.-%; b) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4; c) Unter analogen Bedingungen in einem Wiederholungsversuch erhaltene Werte.

Die Oxidation von Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. wurde zudem unter Verwendung der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* anstelle von FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung durchgeführt (Tabelle 16, Eintrag 5). Unter identischen Reaktionsbedingungen wurde ein produktbezogener Umsatz

von 92% und eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 70% bzw. 6% erhalten (Tabelle 16, Eintrag 5). Damit liegt der produktbezogene Umsatz leicht niedriger als bei Verwendung von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung (92% statt >99%, Tabelle 16, Einträge 1 und 5). Anschließend wurde der gleiche Versuch mit einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung durchgeführt. In Anwesenheit von Aceton (25 Vol.-%) wurde ein produktbezogener Umsatz von 14% und eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 13% bzw. 77% erhalten (Tabelle 16, Eintrag 6). Beim Vergleich der Reaktionen mit den unterschiedlichen Cofaktorregenerierungssystemen, zeigt sich, dass mit der NADH-Oxidase sowie mit FeTSPP (**8**) sehr gute Umsätze erhalten wurden, allerdings wurden nur bei Verwendung von FeTSPP (**8**) quantitative Umsätze erreicht. In Anwesenheit von Aceton wurde hingegen ein deutlich schlechteres Ergebnis erzielt. Unter diesen Reaktionsbedingungen ist die Verwendung der biomimetischen NAD(H)-Oxidase **8** überlegen gegenüber den beiden anderen untersuchten Regenerierungssystemen, da nur in Anwesenheit von **8** ein vollständiger Umsatz erhalten wurde. Somit stellt die Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) eine nützliche Ergänzung zu etablierten Möglichkeiten der Cofaktorregenerierung dar.

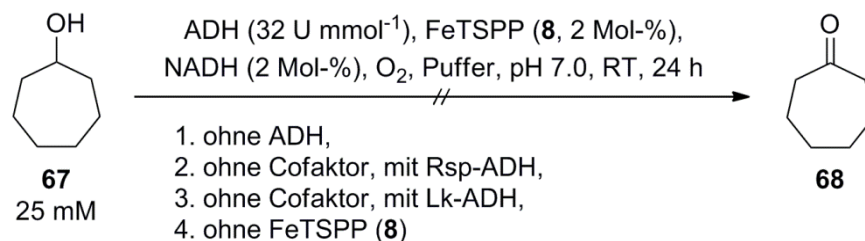
Die Summe der berechneten Produkt- und Eduktausbeute weicht teilweise deutlich von der theoretischen Maximalausbeute von 100% ab und schwankt zwischen 76 und 90% (Tabelle 16, Einträge 1 – 6). Dies liegt an Substanzverlusten der relativ leicht flüchtigen Substanzen insbesondere beim Entfernen des Lösungsmittels bei der Aufarbeitung. Teilweise wurden die einzelnen Rohproduktmischungen unterschiedlich lang am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeeengt.

4.5.2.3 Kontrollversuche

Zur Untersuchung, ob alle beteiligten Komponenten (Alkohol-Dehydrogenase, Cofaktor und FeTSPP (**8**)) für die Oxidation von Cycloheptanol (**67**) zu Cycloheptanon (**68**) notwendig sind, wurden entsprechende Kontrollversuche unter Ausschluss jeweils einer dieser Komponenten durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass im Rohextrakt der Enzymformulierung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. Cofaktor (NADH oder NAD⁺) vorhanden ist, da beim Kontrollversuch ohne Cofaktor in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus

Rhodococcus sp. ein produktbezogener Umsatz von 12% erhalten wurde (Tabelle 17, Eintrag 2). Im Gegensatz dazu wurde beim gleichen Kontrollversuch, jedoch in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*, kein Umsatz erhalten (Tabelle 17, Eintrag 3). Die Kontrollversuche ohne Enzymzugabe bzw. ohne Cofaktorregenerierungssystem lieferten in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. 0% bzw. 2% Umsatz (Tabelle 17, Einträge 1 und 4). Der Umsatz von 2% ist auf Verunreinigungen im Rohextrakt der Enzymformulierung und auf Messungenauigkeiten zurückzuführen und kann vernachlässigt werden. Nebenprodukte wurden weder bei den Kontrollversuchen noch bei den enzymatischen Umsetzungen beobachtet.

Tabelle 17. Kontrollversuche



Eintrag	Enzym	Cofaktor	FeTSPP (8) ^a	produktbezogener Umsatz / %	berechnete Ausbeute ^b / % Produkt / Edukt
1	–	NADH	2 Mol-%	0	0 / 75
2	Rsp-ADH	–	2 Mol-%	12	11 / 84
3	Lk-ADH	–	2 Mol-%	0	0 / 78
4	Rsp-ADH	NADH	–	2	1 / 60

a) FeTSPP (8): 2 Mol-% bezogen auf 0.25 mmol Substrat **67**; b) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4.

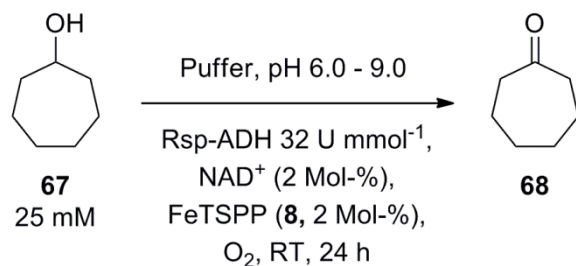
4.5.2.4 Reaktionsbreite

Die Oxidation von Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit von Alkohol-Dehydrogenasen wurde im Folgenden für Untersuchungen zur Reaktionsbreite der Cofaktorregenerierung unter Verwendung von FeTSPP (**8**) verwendet.

4.5.2.4.1 Variation des pH-Wertes

In präparativen Versuchen wurde die pH-Abhängigkeit der Oxidation von Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. und FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung untersucht. Im Gegensatz zu der quantitativen Umsetzung bei pH 7.0, wurde bei entsprechenden Versuchen bei pH 6.0 bzw. pH 8.0, lediglich ein Umsatz von 32% bzw. 39% erhalten (Tabelle 18, Einträge 1 – 3). Im Vergleich dazu, konnte D-Glucose (**1**) in Anwesenheit einer Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. bei einem pH-Wert von 6.0 mit einem Umsatz von $\geq 97\%$ umgesetzt werden (Kapitel 4.4.1, Tabelle 6, Eintrag 1). Es wird daraus gefolgert, dass FeTSPP (**8**) grundsätzlich bei einem pH-Wert von 6.0 eingesetzt werden kann. Für den niedrigen Umsatz der Oxidation von Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 6.0 ist daher das Enzym oder das Substrat verantwortlich. Bei pH 9.0 wurde nur noch ein Umsatz von 8% beobachtet (Tabelle 18, Eintrag 4). Letzterer liegt damit im Bereich des Kontrollversuchs (Tabelle 17, Eintrag 2, 12% Umsatz), bei der kein Cofaktor zum Reaktionsgemisch gegeben wurde.

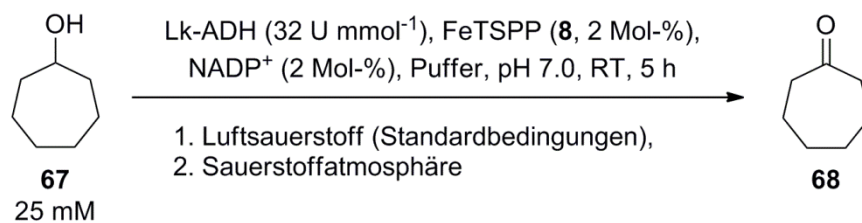
Tabelle 18. Oxidation von Cycloheptanol (**67**) bei verschiedenen pH-Werten



Eintrag	pH-Wert	produktbezogener Umsatz / %
1	6.0	32
2	7.0	>99
3	8.0	39
4	9.0	8

4.5.2.4.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Sauerstoff

Der Einfluss von Sauerstoff auf die Reaktion von FeTSPP (**8**) mit NADH wurde anhand von spektralphotometrischen Untersuchungen gezeigt (siehe 4.2.1). In einem präparativen Versuch wurde der Sauerstoffeinfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit am Beispiel der Oxidation von Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* und FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung untersucht (Schema 47). Hierzu wurde zunächst ein Vergleichsversuch (entsprechend 4.5.2.2) in Anwesenheit von Luftsauerstoff durchgeführt. Nach einer Reaktionslaufzeit von 5 Stunden wurde ein Umsatz von 48% und eine Produkt- bzw. Eduktausbeute von 43% bzw. 47% erhalten.



Schema 47. Oxidation von Cycloheptanol (**67**) unter Standardbedingungen bzw. unter Sauerstoffatmosphäre

Anschließend wurde ein Versuch unter analogen Bedingungen, allerdings in einer mit Sauerstoff gesättigten Pufferlösung unter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt. Nach 5 Stunden Reaktionszeit wurde ein Umsatz von 50% und eine Produkt- bzw. Eduktausbeute von 41% bzw. 40% erhalten. Eine signifikante Steigerung des Umsatzes wurde nicht beobachtet. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass die in der Luft vorhandene Sauerstoffkonzentration für eine optimale Reaktionsdurchführung (unter den verwendeten Reaktionsbedingungen) ausreicht und damit keinen limitierenden Faktor für die Reaktionsgeschwindigkeit darstellt.

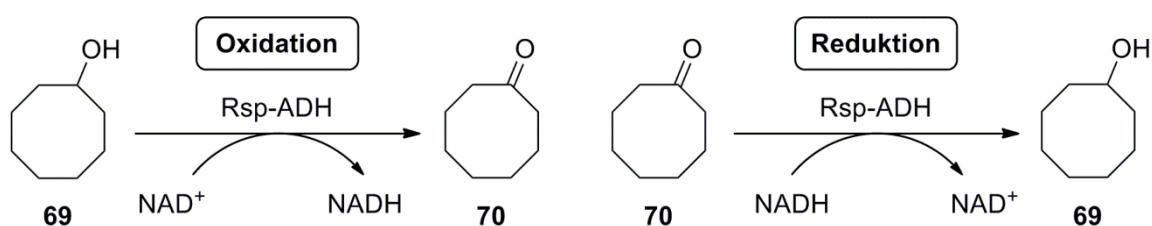
4.5.3 Oxidation von Cyclooctanol (**69**) zu Cyclooctanon (**70**)

4.5.3.1 Spektralphotometrische Untersuchungen

Zunächst wurden spektralphotometrische Untersuchungen mit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 7.0 durchgeführt. Für das Standardsubstrat

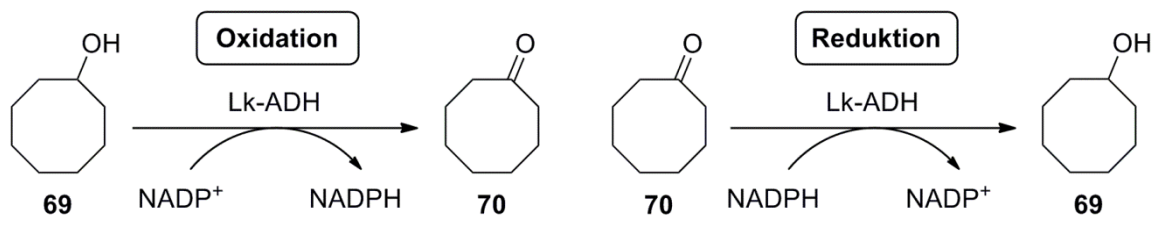
p-Chloracetophenon (**65**) wurde eine volumetrische Aktivität von 60 U mL⁻¹ bestimmt. Dieser Wert wurde als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 15, Eintrag 1). Im Vergleich zum Standardsubstrat **65** wurden Cyclooctanon (**70**) und Cyclooctanol (**69**) mit relativen Aktivitäten von 8% bzw. 0% umgesetzt (Tabelle 19, Einträge 2 – 3). Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. akzeptiert demnach die Verbindung Cyclooctanon (**70**) als Substrat. Aus diesem Ergebnis wird geschlossen, dass Cyclooctanol (**69**) grundsätzlich ebenfalls in die Enzymtasche der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. hineinpasst.

Tabelle 19. Aktivität von Rsp-ADH bezüglich Cyclooctanon (**70**) und Cyclooctanol (**69**)



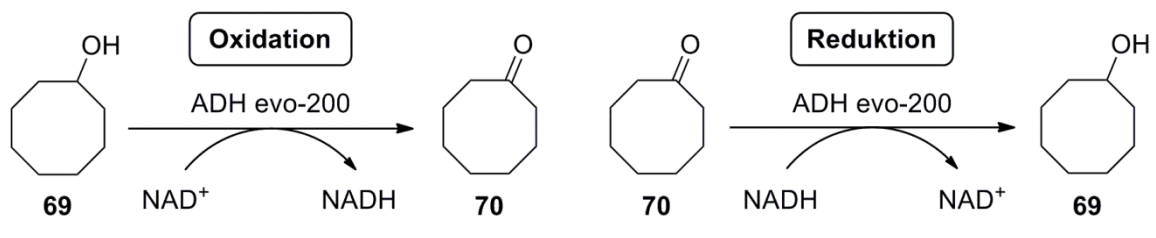
Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	60	100
2	Cyclooctanon (70)	5	8
3	Cyclooctanol (69)	0	0

Als nächstes Enzym wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* untersucht. Bezogen auf das Standardsubstrat Acetophenon (**27**) wurde eine volumetrische Aktivität von 1544 U mL⁻¹ bestimmt und als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 20, Eintrag 1). Cyclooctanon (**70**) und Cyclooctanol (**69**) werden als Substrat von der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* mit relativen Aktivitäten von 13% bzw. 14% akzeptiert (Tabelle 20, Einträge 2 – 3). Alle Messungen wurden bei pH 7.0 durchgeführt.

Tabelle 20. Aktivität der Lk-ADH bezüglich Cyclooctanon (**70**) und Cyclooctanol (**69**)

Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	Acetophenon (27)	1544	100
2	Cyclooctanon (70)	195	13
3	Cyclooctanol (69)	223	14

Schließlich wurde die Alkohol-Dehydrogenase evo-200 untersucht. Bezüglich des Standardsubstrates Acetessigester (**66**) wurde eine spezifische Aktivität von 4.7 U mg⁻¹ ermittelt und als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 21, Eintrag 1).

Tabelle 21. Aktivität der ADH evo-200 bezüglich Cyclooctanon (**70**) und Cyclooctanol (**69**)

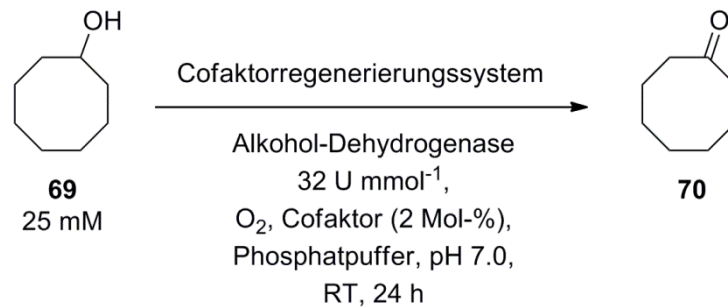
Eintrag	Substrat	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	Acetessigester (66)	4.7	100
2	Cyclooctanon (70)	0.1	3
3	Acetessigester (66)	4.4	100
4	Cyclooctanol (69)	1.0	24

Relativ dazu wurde eine Aktivität von 3% für das Substrat Cyclooctanon (**70**) gemessen (Tabelle 21, Eintrag 2). Für eine andere Enzymcharge der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 wurde für das Standardsubstrat **66** eine spezifische Aktivität von 4.4 U mg⁻¹ ermittelt und als

relative Aktivität auf 100% definiert (Tabelle 21, Eintrag 3). Bezogen auf diese Aktivität wurde anschließend für die Oxidation von Cyclooctanol (**69**) eine relative Aktivität von 24% erhalten (Tabelle 21, Eintrag 4). Die relative Aktivität für die Oxidation von Cyclooctanol (**69**) ist hier deutlich größer als die relative Aktivität für die Reduktion von Cyclooctanon (**70**) (24% bzw. 3%, Tabelle 21, Einträge 4 und 2). Daher wird ein hoher Umsatz für präparative Umsetzungen von Cyclooctanol (**69**) durch die Alkohol-Dehydrogenase evo-200 vermutet. Alle Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt.

4.5.3.2 Präparative Umsetzungen

Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. konnte erfolgreich für die Oxidation von Cyclooctanol (**69**) zu Cyclooctanon (**70**) in Anwesenheit von NADH und FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung eingesetzt werden. Dabei wurde ein produktbezogener Umsatz von 75% sowie eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 65% bzw. 22% erhalten (Tabelle 22, Eintrag 1). Ein fast quantitativer Umsatz von 99%, mit einer berechneten Produkt- bzw. Eduktausbeute von 73% bzw. <1%, wurde bei Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* und NADPH sowie FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung erhalten (Tabelle 22, Eintrag 2). In Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 wurde Cyclooctanol (**69**) quantitativ zu Cyclooctanon (**70**) oxidiert (Tabelle 22, Eintrag 3). Die berechnete Ausbeute beträgt 97% (Tabelle 22, Eintrag 3). Außerdem konnte die NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase evo-210 aus Pferdeleber erstmals erfolgreich in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung eingesetzt werden. Cyclooctanon (**70**) wurde hierbei mit einem produktbezogenen Umsatz von 48% sowie einer berechneten Produkt- bzw. Eduktausbeute von 34% bzw. 36% aus Cyclooctanol (**69**) erhalten (Tabelle 22, Eintrag 4). Wie bereits bei Cyclohexanol (**30**) und Cycloheptanol (**67**) wurde auch hier ein Vergleich der künstlichen Cofaktorregenerierung mit etablierten Cofaktorregenerierungssystemen durchgeführt. Entsprechend der quantitativen Oxidation von Cyclooctanol (**69**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 und FeTSPP (**8**) (Tabelle 22, Eintrag 3), wurde in Kombination mit einer NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* zur Cofaktorregenerierung ein produktbezogener Umsatz von 99% sowie eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 83% bzw. 1% erhalten werden (Tabelle 22, Eintrag 5).

Tabelle 22. Oxidation von Cyclooctanol (**69**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung

Versuch	Enzym	Cofaktor	Cofaktor- regenerierung ^a	produktbezogener Umsatz / %	Ausbeute ^b / % Produkt / Edukt
1	Rsp-ADH	NADH	FeTSPP (8)	75	65 / 22
2	Lk-ADH	NADPH	FeTSPP (8)	99	73 / <1
3	ADH evo-200	NAD ⁺	FeTSPP (8)	>99	97 / 0
4	ADH evo-210 ^c	NAD ⁺	FeTSPP (8)	48	34 / 36
5	ADH evo-200	NAD ⁺	NADH-Oxidase	99	83 / 1
6	ADH evo-200	NAD ⁺	Aceton	62	55 / 34

a) FeTSPP (**8**): 2 Mol-% bezogen auf 0.25mmol Substrat **69**; NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*: 32 U mmol⁻¹; Aceton: 25 Vol.-%; b) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4; c) HL-ADH evo-210: >0.5 U mg⁻¹, 16 mg; Reaktionszeit 66 Stunden.

Dagegen konnte die Oxidation mit einem Überschuss an Aceton (25 Vol.-%), entsprechend einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung, nur ein Umsatz von 62% und eine berechnete Produkt- bzw. Eduktausbeute von 55% bzw. 34% erreichen (Tabelle 22, Eintrag 6). Im Vergleich dazu erhielt BURDA in früheren Arbeiten für die Oxidation von Cyclooctanol (**69**) (10 mM) bei der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (200 U mmol⁻¹) unter analogen Reaktionsbedingungen einen Umsatz von >95%.^[222]

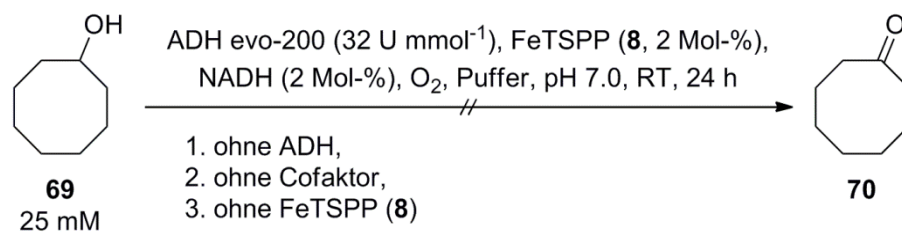
Die Summe der berechneten Produkt- und Eduktausbeute weicht teilweise deutlich von der theoretischen Maximalausbeute von 100% ab und schwankt zwischen 73 und 97% (Tabelle 22, Einträge 1 – 6). Dies liegt an Substanzverlusten der relativ leicht flüchtigen Substanzen insbesondere beim Entfernen des Lösungsmittels bei der Aufarbeitung. Teilweise

wurden die einzelnen Rohproduktmischungen unterschiedlich lang am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt.

4.5.3.3 Kontrollversuche

Zur Untersuchung, ob alle beteiligten Komponenten (Alkohol-Dehydrogenase, Cofaktor und FeTSPP (**8**)) für die Oxidation von Cyclooctanol (**69**) zu Cyclooctanon (**70**) notwendig sind, wurden entsprechende Kontrollversuche unter Ausschluss jeweils einer dieser Komponenten durchgeführt. Nur beim Kontrollversuch „ohne Cofaktorregenerierungssystem“ wurde in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 ein geringer Umsatz von 4% festgestellt.

Tabelle 23. Kontrollversuche



Eintrag	Enzym	Cofaktor	FeTSPP (8) ^a	produktbezogener Umsatz / %
1	–	NAD ⁺	2 Mol-%	0
2	ADH evo-200	–	2 Mol-%	0
3	ADH evo-200	NAD ⁺	–	4

a) FeTSPP (**8**): 2 Mol-% bezogen auf 0.25 mmol Substrat **69**.

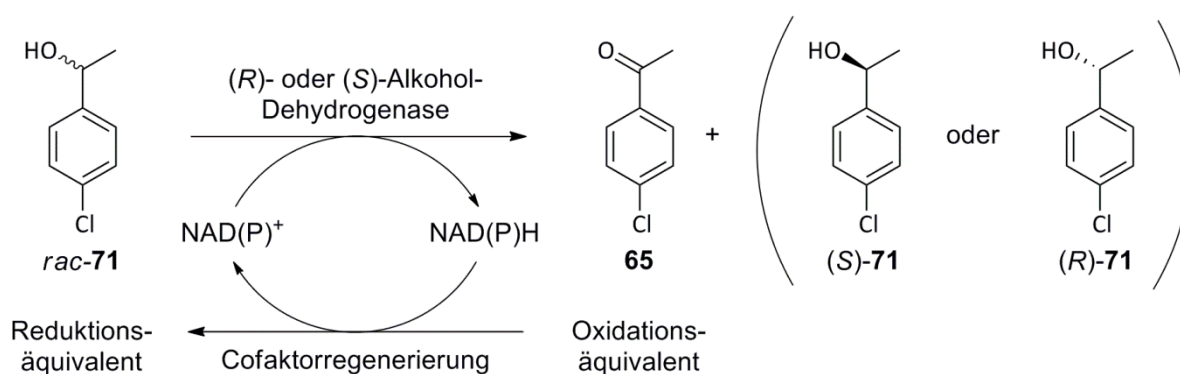
Jedoch wurden bei diesem Kontrollversuch 2 Mol-% NAD⁺ verwendet, sodass ein Umsatz von $\geq 2\%$ zu erwarten war. Die weiteren 2% Umsatz können vernachlässigt werden, da sie die Versuchsergebnisse nicht wesentlich beeinflussen und wahrscheinlich auf Wägefehler, Messungenauigkeiten und Edukt- sowie Enzymverunreinigungen zurückzuführen sind. Nebenprodukte wurden weder bei den Kontrollversuchen noch bei den enzymatischen Umsetzungen beobachtet.

4.5.4 Zusammenfassung

Die Oxidationsreaktionen von Cyclohexanol (**30**), Cycloheptanol (**67**) und Cyclooctanol (**69**) durch die Alkohol-Dehydrogenasen Rsp-ADH, Lk-ADH und ADH evo-200 (sowie ADH evo-210 für die Oxidation von Cyclooctanol (**69**)) wurden erfolgreich mit der biomimetischen Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) kombiniert, wobei teilweise quantitative Umsätze erhalten wurden. Nur die Alkohol-Dehydrogenase evo-200 oxidierte die Substrate Cyclohexanol (**30**) und Cycloheptanol (**67**) nicht. Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass die Oxidationsreaktionen in Kombination mit FeTSPP (**8**) stets bessere oder vergleichbare Umsätze als in Kombination mit alternativen Cofaktorregenerierungssystemen (NADH-Oxidase als Enzym-gekoppelte oder Aceton als Substrat-gekoppelte Regenerierungsmethode) lieferten. Es ist hiermit erstmals gelungen, die biomimetische NAD(P)H-Oxidase **8** mit verschiedenen Alkohol-Dehydrogenasen in präparativen Oxidationsreaktionen zu kombinieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) eine nützliche und teilweise überlegene Alternative zu bereits etablierten Cofaktorregenerierungssystemen bei enzymatischen Oxidationen von Alkoholen darstellt.

4.6 Enzymatische Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) durch biokatalytische Oxidation mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung

Im Anschluss an die zuvor untersuchten achiralen Alkohole wird im Folgenden die enantioselektive Oxidation des chiralen Alkohols *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch die biomimetische NAD(P)H-Oxidase **8** untersucht. Das Konzept dieser enzymatischen Racematspaltung ist in Schema 48 dargestellt.



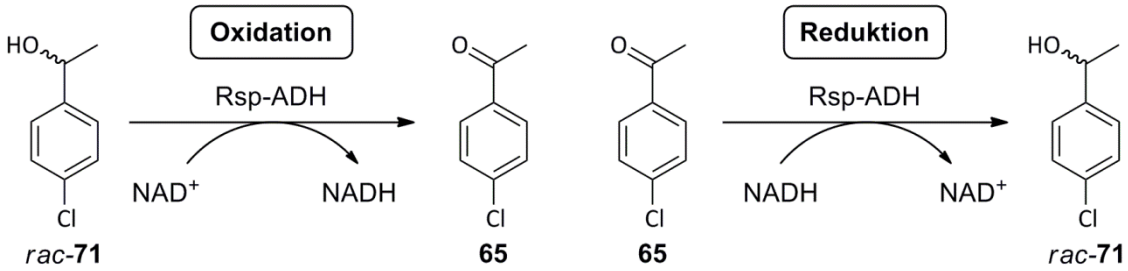
Schema 48. Konzept der enzymatischen Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung

Als Vorversuche werden zunächst spektrophotometrische Untersuchungen mit den Alkohol-Dehydrogenasen (Rsp-ADH, Lk-ADH und ADH evo-200) durchgeführt (4.6.1) sowie eine Analytik mit entsprechenden Fehlergrenzen etabliert (4.6.2). Anschließend wird die enzymatische Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung in Anwesenheit der zuvor überprüften Alkohol-Dehydrogenasen durchgeführt (4.6.3). Die Cofaktorregenerierung erfolgt hierbei durch FeTSPP (**8**) sowie – zum Vergleich – durch die NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* und eine Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung in Anwesenheit eines Überschusses an Aceton. Außerdem werden die Reaktionsbedingungen (pH-Wert, FeTSPP-Konzentration, Reaktionszeit, Enzymmenge) im Rahmen von Optimierungsversuchen variiert.

4.6.1 Spektrophotometrische Untersuchungen zum Screening relevanter Biokatalysatoren

Zunächst wurden spektralphotometrische Untersuchungen mit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. durchgeführt. Für das Standardsubstrat *p*-Chloracetophenon (**65**) wurde eine volumetrische Aktivität von 62 U mL^{-1} bestimmt (Tabelle 24, Eintrag 1). Dieser Wert wurde als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 24, Eintrag 1). In diesem Fall ist das Standardsubstrat **65** gleichzeitig das Substrat für die reduktive Richtung. Im Vergleich dazu wurde für *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) eine relative Aktivität von 6% erhalten (Tabelle 24, Eintrag 2).

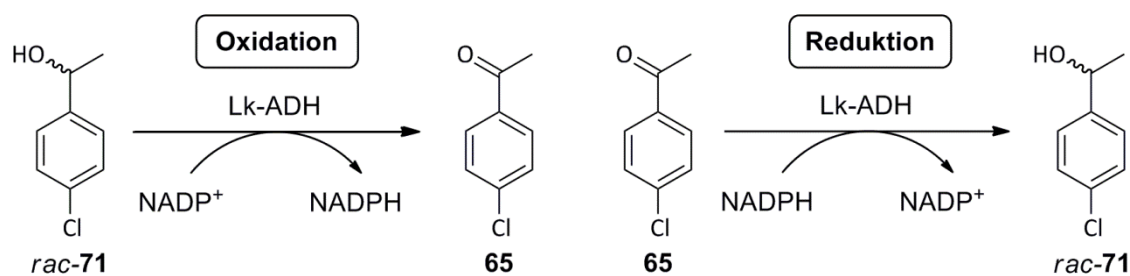
Tabelle 24. Aktivität von Rsp-ADH



Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL^{-1}	rel. Aktivität / %
1	<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	62	100
2	<i>rac-p</i> -Cl-Phenylethanol (<i>rac</i> - 71)	4	6

Als nächstes Enzym wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* verwendet. Bezogen auf das Standardsubstrat Acetophenon (**27**) wurde eine volumetrische Aktivität von 2390 U mL^{-1} bestimmt und als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 25, Eintrag 1). Relativ dazu wurde eine Aktivität von 96% für das Substrat *p*-Chloracetophenon (**65**) gemessen (Tabelle 25, Eintrag 2). Für eine andere Enzymcharge der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* wurde für das Standardsubstrat **65** eine volumetrische Aktivität von 1544 U mL^{-1} ermittelt und als relative Aktivität auf 100% definiert. (Tabelle 25, Eintrag 3). Bezogen auf diese Aktivität wurde anschließend für die Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) eine relative Aktivität von 17% erhalten (Tabelle 25, Eintrag 4).

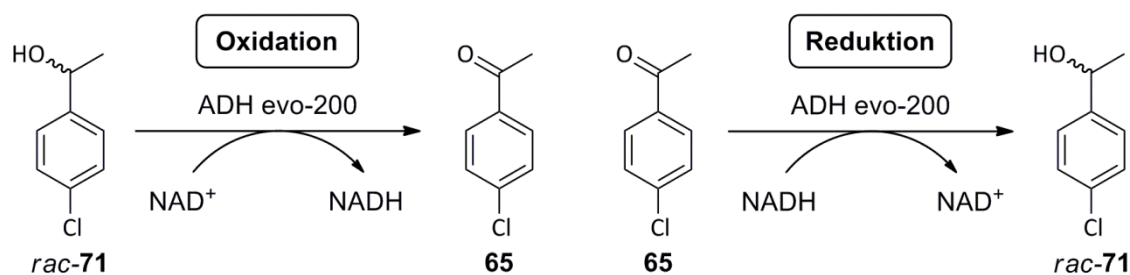
Tabelle 25. Aktivität der Lk-ADH



Eintrag	Substrat	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	Acetophenon (27)	2390	100
2	<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	2292	96
3	Acetophenon (27)	1544	100
4	<i>rac-p</i> -Cl-Phenylethanol (<i>rac-71</i>)	269	17

Schließlich wurde die Alkohol-Dehydrogenase evo-200 untersucht. Bezüglich des Standardsubstrates Acetessigester (**66**) wurde eine spezifische Aktivität von 4.7 U mg⁻¹ ermittelt und als relative Aktivität auf 100% gesetzt (Tabelle 26, Eintrag 1).

Tabelle 26. Aktivität der ADH evo-200



Eintrag	Substrat	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
1	Acetessigester (66)	4.7	100
2	<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	1.6	33
3	Acetessigester (66)	4.4	100
4	<i>rac-p</i> -Cl-Phenylethanol (<i>rac-71</i>)	0.6	13

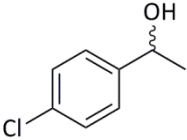
Bezogen darauf wurde eine relative Aktivität von 33% für das Substrat *p*-Chloracetophenon (**65**) gemessen (Tabelle 26, Eintrag 2). Für eine andere Enzymcharge der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 wurde für das Standardsubstrat Acetessigester (**66**) eine spezifische Aktivität von 4.4 U mg⁻¹ ermittelt und als relative Aktivität auf 100% definiert. (Tabelle 26, Eintrag 3). Bezogen auf diese Aktivität wurde anschließend für die Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) eine relative Aktivität von 13% erhalten (Tabelle 26, Eintrag 4). Alle untersuchten Alkohol-Dehydrogenasen akzeptieren die Substrate *p*-Chloracetophenon (**65**) und *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) und werden daher im Anschluss (4.6.3) in präparativen Umsetzungen eingesetzt.

4.6.2 Analytik zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (ee-Wert) und des produktbezogenen Umsatzes

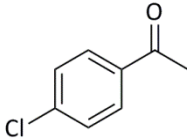
Die Analytik erfolgt *via* ¹H-NMR-Spektroskopie (¹H-NMR) sowie mittels Gaschromatographie (GC). Zur Etablierung der Analytik werden zunächst die Fehlergrenzen der Umsatzbestimmung und der Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (ee-Wert) ermittelt.

Zur Bestimmung der Fehlergrenzen wurde eine Vergleichsprobe mit einem Verhältnis von (*rac-p*-Chlorphenylethanol : *p*-Chloracetophenon, *rac*-**71** : **65**, 48 : 52) eingewogen und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie sowie mittels Gaschromatographie gemessen (Tabelle 27).

Tabelle 27. Eingewogenes und gemessenes Verhältnis und ee-Wert der Vergleichsprobe



rac-**71**
125 μmol



65
136 μmol

Verhältnis <i>rac</i> - 71 : 65			ee-Wert / %
eingewogen	¹ H-NMR	GC	
48 : 52	(50 : 50) ±1	51 : 49	6

Laut Einwaage liegt das Verhältnis bei 48 : 52 (*rac*-**71** : **65**). Das mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie gemessene Verhältnis liegt bei $(50 : 50) \pm 1$ (*rac*-**71** : **65**). Der angegebene Fehler ergibt sich durch eine leichte Abweichung einzelner normierter Integrationsflächen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Das Gaschromatogramm der Vergleichsprobe ist in Abbildung 15 zu sehen. Bei einer Retentionszeit von 17.759 Minuten liegt das Signal von *p*-Chloracetophenon (**65**).

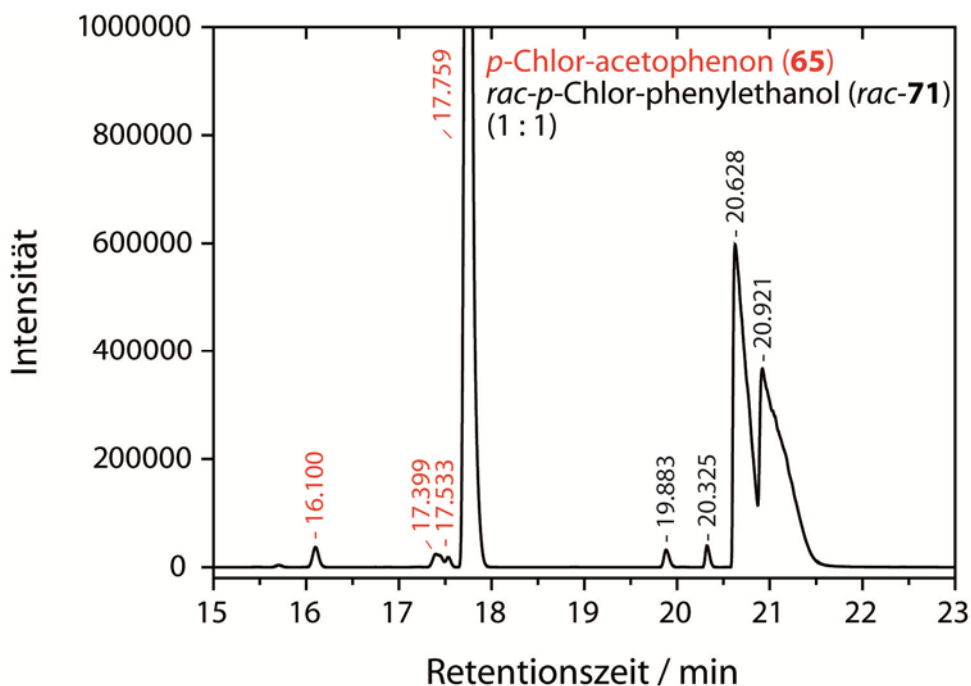


Abbildung 15. Gaschromatogramm von **65** und *rac*-**71**

Die beiden Enantiomere (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*R*)-**71**) und (*S*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*S*)-**71**) wurden bei Retentionszeiten von 20.628 und 20.921 Minuten detektiert. Alle übrigen Signale sind Verunreinigungen der eingewogenen Verbindungen **65** und *rac*-**71**. Das mittels Gaschromatographie gemessene Verhältnis liegt bei 51 : 49 (*rac*-**71** : **65**) und liegt im Bereich des *via* $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelten Verhältnisses von $(50 : 50) \pm 1$ (*rac*-**71** : **65**). Diese beiden gemessenen Verhältnisse weichen etwas von dem eingewogenen Verhältnis ab. Die Abweichung von der Einwaage ist auf Wägefehler sowie auf die Reinheit der verwendeten Chemikalien zurückzuführen. Laut Herstellerangaben besitzt das verwendete *rac*-*p*-Chlor-phenylethanol (*rac*-**71**) eine Reinheit von 97% und mittels Gaschromatographie wurden Verunreinigungen von 2% detektiert (Abbildung 15, Signale bei 19.883 und 20.325 Minuten). Das verwendete *p*-Chloracetophenon (**65**) hat laut

Herstellerangaben ebenfalls eine Reinheit von 97% und im Gaschromatogramm wurden Verunreinigungen von 2% detektiert (Abbildung 15, Signale bei 16.100 bis 17.533).

Der gemessene ee-Wert des eingewogenen Racemats *rac-71* liegt bei 6%. Dieser hohe Fehler ist damit zu begründen, dass keine vollständige Trennung der Signale der beiden Enantiomere (*R*)-**71** und (*S*)-**71** mit dieser Methode erreicht werden konnte (Abbildung 15, Signale bei 20.628 und 20.921 Minuten). Aufgrund dieses großen Fehlers wurde die Genauigkeit der Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler Gaschromatographie in einer Versuchsreihe für verschiedene simulierte ee-Werte bestimmt (Tabellen 28 – 30). Um Wägefehler zu minimieren, wurden alle Lösungen über Verdünnungsreihen hergestellt. Außerdem wurden die Ergebnisse durch eine zweite Messreihe mit neu angesetzten Lösungen wiederholt.

Zunächst wurden racemische Mischungen aus kommerziell erworbenem und enantiomerenreinem (*S*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*S*)-**71**) und (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol (*R*)-(**71**) ((*S*)-**71** : (*R*)-**71**, 1 : 1) hergestellt und mittels GC gemessen (Tabelle 28, Einträge 1 – 5). Hierbei wurden ee-Werte zwischen 2.4 und 6.4% erhalten.

Tabelle 28. Bestimmung des Fehlers der ee-Wert-Messung bei racemischen Gemischen

Eintrag	ee-Wert / % eingewogen	ee-Wert / % GC	Abweichung
1	0.0	2.4 (<i>S</i>)	2.4
2	0.0	2.5 (<i>S</i>)	2.5
3	0.0	6.4 (<i>S</i>)	6.4
4 ^a	0.0	1.8 (<i>S</i>)	1.8
5 ^a	0.0	5.0 (<i>S</i>)	5.0

a) Wiederholungsversuch

Damit liegen die erhaltenen ee-Werte im Bereich des zuvor gemessenen kommerziellen Racemats *rac-71* der Vergleichsprobe (Tabelle 27). Die Abweichungen sind die Summe aus Wägefehlern und Messungenauigkeiten resultierend aus der unvollständigen Trennung der

Signale. Aufgrund dieser Ergebnisse wird im Folgenden ein Fehler von 7% für die ee-Wert-Bestimmung racemischer Mischungen aus (*S*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*S*)-**71**) und (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*R*)-**71**) angenommen.

Anschließend wurden simulierte ee-Werte von 80% ((*S*) und (*R*)) eingewogen und gemessen (Tabelle 29, Einträge 1 – 2). Hier lag der Fehler bei 0.0 – 1.3%. Der simulierte ee-Wert von 98% ((*S*) und (*R*)) wurde mit einer Abweichung von 0.2 – 1.1% gemessen (Tabelle 29, Einträge 3 – 6). Im Vergleich zu den Messungen der Racemate wurden hier ausnahmslos geringere Abweichungen zwischen den simulierten und den tatsächlich gemessenen ee-Werten erhalten. Der Fehler für diesen Bereich wird im Folgenden mit 2% angegeben.

Tabelle 29. Bestimmung des Fehlers der ee-Wert-Messung für ee-Werte von 80 – 98%

Eintrag	ee-Wert / % eingewogen	ee-Wert / % GC	Abweichung
1	80.0 (<i>S</i>)	80.0 (<i>S</i>)	0.0
2	80.0 (<i>R</i>)	81.3 (<i>R</i>)	1.3
3	98.0 (<i>S</i>)	98.2 (<i>S</i>)	0.2
4	98.0 (<i>R</i>)	99.1 (<i>R</i>)	1.1
5 ^a	98.0 (<i>S</i>)	98.4 (<i>S</i>)	0.4
6 ^a	98.0 (<i>R</i>)	98.9 (<i>R</i>)	0.9

a) Wiederholungsversuch

Zuletzt wurden ee-Werte von 99% ((*S*) und (*R*)) eingewogen und gemessen (Tabelle 30, Einträge 1 – 6). Hier lag die Abweichung bei 0.2 – 0.5%, sodass für diesen Bereich ein Fehler von 1% angegeben wird. Es ist erkennbar, dass die Abweichung des gemessenen zum simulierten ee-Wert zu höheren ee-Werten abnimmt (Tabellen 28 – 30). Das liegt an der geringeren Überlappung der beiden Signale der Enantiomere (*S*)-**71** und (*R*)-**71** (Abbildung 16 und 17).

Tabelle 30. Bestimmung des Fehlers der ee-Wert-Messung für ee-Werte von 99%

Eintrag	ee-Wert / % eingewogen	ee-Wert / % GC	Abweichung
1	99.0 (S)	99.2 (S)	0.2
2	99.0 (R)	99.5 (R)	0.5
3	99.0 (S)	99.2 (S)	0.2
4	99.0 (R)	99.4 (R)	0.4
5 ^a	99.0 (S)	99.3 (S)	0.3
6 ^a	99.0 (R)	99.5 (R)	0.5

a) Wiederholungsversuch

Zusätzlich wurde die Detektionsgrenze des Gaschromatographen bestimmt. Hierfür wurden definierte Mischungen (entsprechend einem ee-Wert von 99%) aus (*R*)-**71** und (*S*)-**71** (62.5 nmol : 12.5 µmol, (*R*)-**71** : (*S*)-**71**, 1 : 200) (Tabelle 30, Eintrag 5) bzw. (62.5 nmol : 12.5 µmol, (*S*)-**71** : (*R*)-**71**, 1 : 200) (Tabelle 30, Eintrag 6) in Aceton als Vergleichsproben gemessen. Die jeweiligen Enantiomere im Unterschuss wurden hierbei eindeutig detektiert (Abbildungen 16 und 17). Mengen von 62.5 nmol (*S*)-*p*-Chlorphenylethanol (*S*)-**71** und (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol (*R*)-**71** können demnach mittels GC detektiert werden. Eine Menge von 62.5 nmol (*S*)-**71** bzw. (*R*)-**71** entspricht im Gaschromatogramm einem Flächenintegral (*Area*) von 2500. Um einen ee-Wert von 99% angeben zu können muss ein Verhältnis der beiden Enantiomere von 1 : 199 vorliegen. Daher muss nun das zweite Enantiomer im 199-fachen Überschuss zum Flächenintegral von 2500, also mit einem Flächenintegral von 497500 vorliegen. Bei Abwesenheit eines Enantiomers ((*S*)-**71** oder (*R*)-**71**) im Gaschromatogramm kann demnach ein ee-Wert >99% angegeben werden, sofern das Signal des detektierten Enantiomers mindestens ein Flächenintegral von 497500 aufweist, also dem 199-fachen von 2500, dem Flächenintegral von 62.5 nmol (*S*)-**71** bzw. (*R*)-**71**, entspricht. Diese Bedingung muss erfüllt sein, um auszuschließen, dass eine zu geringe Konzentration im Gaschromatographen gemessen und dadurch die Detektionsgrenze unterschritten wird.

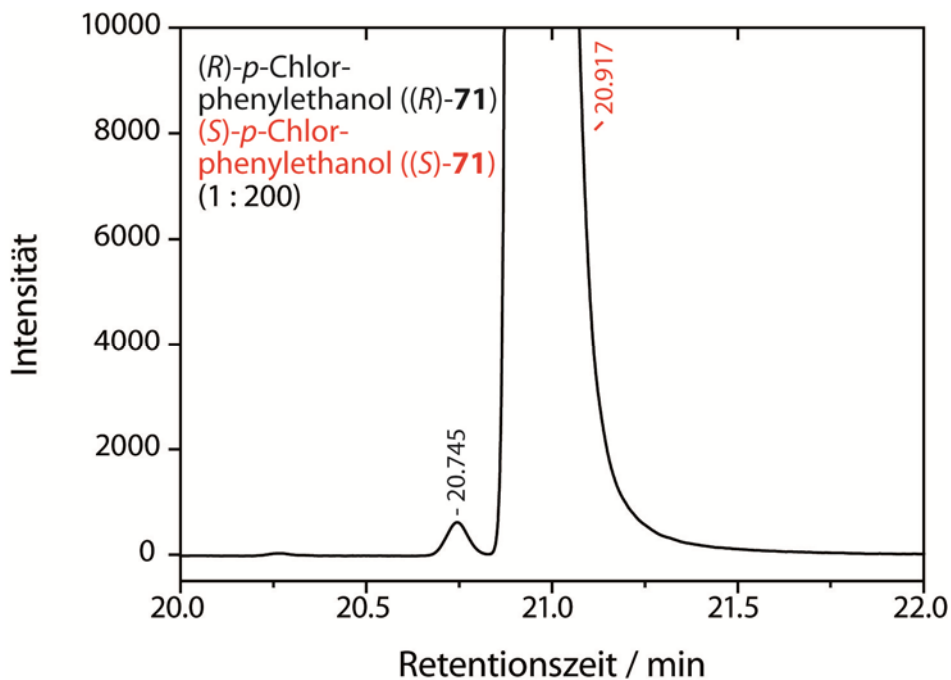


Abbildung 16. Ausschnitt des Gaschromatogramms einer (1 : 200)-Mischung aus (R)-71 und (S)-71

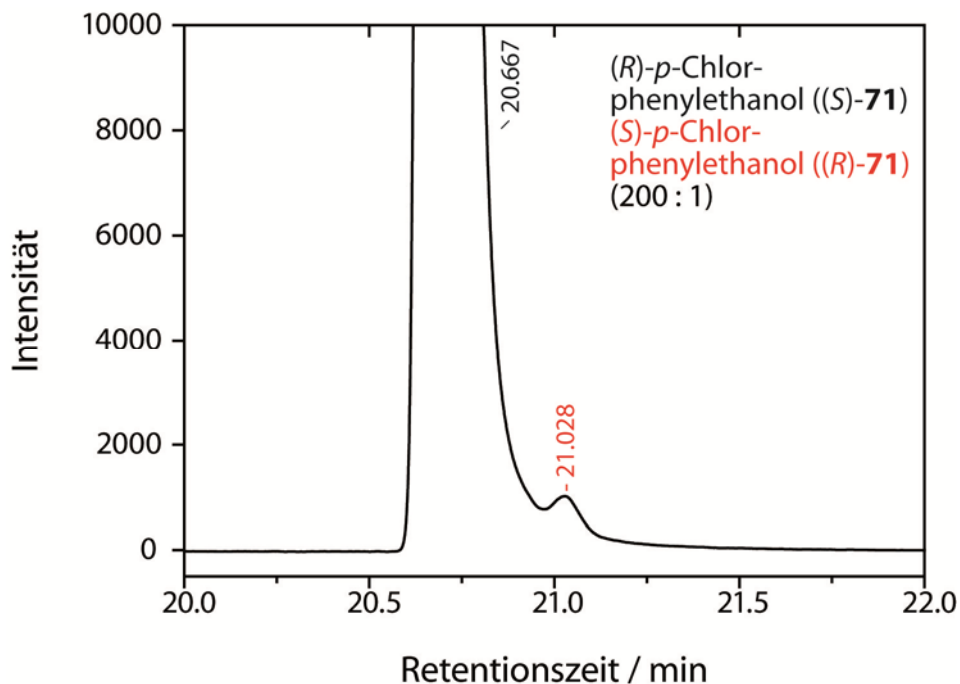
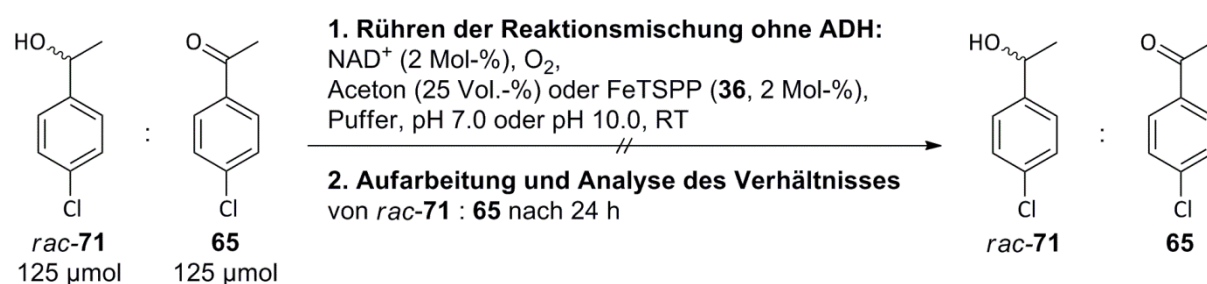


Abbildung 17. Ausschnitt des Gaschromatogramms einer (200 : 1)-Mischung aus (R)-71 und (S)-71

Anschließend wurde die Aufarbeitung simuliert. Hierfür wurden definierte Verhältnisse von (*rac*-*p*-Chlorphenylethanol : *p*-Chloracetophenon, *rac*-71 : 65, 1 : 1) eingewogen (Tabelle 31,

Einträge 1–4). Um typische Reaktionsbedingungen zu erhalten wurden zusätzlich NAD⁺, Aceton bzw. FeTSPP (**8**) und Puffer (pH 7.0 bzw. 10.0) zu den Substanzgemischen gegeben (Tabelle 31, Einträge 1–4). Allerdings wurde kein Enzym in die Reaktionslösung gegeben, sodass keine (enzymkatalysierte) Reaktion stattfindet. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze aufgearbeitet und analysiert, um die Wiederfindungsrate zu bestimmen sowie gegebenenfalls systematische Fehler der verwendeten Analytik zu erkennen.

Tabelle 31. Simulierte Aufarbeitung



Eintrag	Cofaktor- regenerierung	pH-Wert	Verhältnis <i>rac-71</i> : 65			ee-Wert / %
			eingewogen	¹ H-NMR	GC	
1	Aceton	7.0	46 : 54	(49 : 51) ±1	50 : 50	2
2	Aceton	10.0	43 : 57	(45 : 55) ±1	46 : 54	2
3	FeTSPP (8)	7.0	41 : 59	(43 : 57) ±1	43 : 57	3
4	FeTSPP (8)	10.0	47 : 53	(45 : 55) ±1	45 : 55	2

Die mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bzw. *via* Gaschromatographie bestimmten Umsätze weichen maximal 2% voneinander ab (Tabelle 31, Einträge 1–4). Dieses Ergebnis ist konsistent zu dem beim Vergleichsversuch (Tabelle 27) ermittelten Fehler von maximal 2%. Der angegebene Fehler des *via* ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelten Umsatzes (Tabelle 31) ergibt sich durch eine leichte Abweichung einzelner normierter Integrationsflächen im ¹H-NMR-Spektrum.

Die mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bzw. Gaschromatographie gemessenen Umsätze weichen zudem maximal um 4% von den erwarteten (eingewogenen) Umsätzen ab. Im Vergleich dazu wurde zuvor eine maximale Abweichung von 3% im Vergleichsversuch (Tabelle 27)

bestimmt. Die Abweichung von der Einwaage ist auf Wägefehler sowie auf die Reinheit der verwendeten Chemikalien zurückzuführen. Zusätzlich kommen hier Substanzverluste bei der Aufarbeitung in Betracht. Während der Aufarbeitung treten demnach keine wesentlichen Substanzverluste von Edukt *rac*-**71** oder Produkt **65** auf. Die Umsatzbestimmung wird im Folgenden mit einem Fehler von 4% angegeben. Die gemessenen ee-Werte des Racemates *rac*-**71** liegen mit 2 – 3% im zuvor bestimmten Fehlerbereich für racemisches *p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) (Tabelle 31, Einträge 1 – 4).

4.6.3 Enzymatische Racematspaltung von *rac*-*p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Substrat-gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung

Im Folgenden wird eine Modellreaktion etabliert und die Reproduzierbarkeit der Reaktion untersucht. Als Modellreaktion wird *rac*-*p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. und NAD⁺ als Cofaktor in Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0) oxidiert (Tabelle 32). Der Cofaktor wird entsprechend einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung durch die Reaktion von Aceton (25 Vol.%) zu Isopropanol regeneriert. Soweit nicht anders angegeben, entspricht der Umsatz im Folgenden immer einem produktbezogenen Umsatz.^[192]

Tabelle 32. Oxidation von *rac*-*p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mittels Rsp-ADH

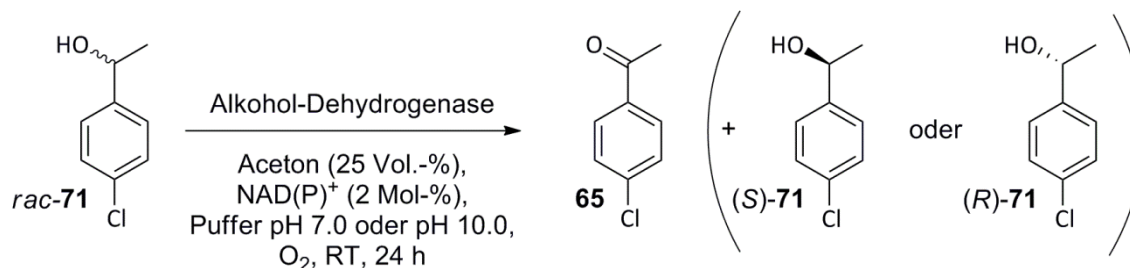
Reaction scheme: *rac*-**71** (1-(4-chlorophenyl)ethanol) is oxidized to **65** (1-(4-chlorophenyl)ethanone) and (*R*)-**71** (1-(4-chlorophenyl)ethanol, *R*-enantiomer). Conditions: Rsp-ADH (33 U mmol⁻¹), Aceton (25 Vol.-%), NAD⁺ (2 Mol-%), Carbonatpuffer, pH 10.0, O₂, RT, 24 h.

Eintrag	<i>rac</i> - <i>p</i> -Cl-Phenylethanol (<i>rac</i> - 71) / mmol	ee-Wert / %	Umsatz / % ¹ H-NMR / GC
1	0.249	>99 (<i>R</i>)	48 ±4 / 47 ±4
2	0.231	>99 (<i>R</i>)	47 ±4 / 48 ±4
3	0.233	>99 (<i>R</i>)	46 ±4 / 47 ±4

Dieser Versuch wurde auf analoge Weise dreimal durchgeführt, wobei jeweils ein ee-Wert >99% ermittelt wurde, da im Gaschromatogramm nur ein einziges Enantiomer ((*R*)-**71**) detektiert wurde (Tabelle 32, Einträge 1 – 3). Die entsprechenden Umsätze wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie sowie *via* Gaschromatographie auf 44 – 48 bestimmt und zeigen, dass nur geringe Abweichungen zwischen den beiden Methoden auftreten (Tabelle 32, Einträge 1 – 3). Hierbei fällt auf, dass die gemessenen Umsätze nicht zu den hohen ee-Werten passen. Rechnerisch muss, bei einer perfekten Selektivität des Biokatalysators, der Umsatz für einen ee-Wert >99% mindestens 49.75% betragen. Wie im Abschnitt 4.6.2 gezeigt, ist die Bestimmung des ee-Wertes bei sehr hohen ee-Werten sehr solide, insbesondere wurde eine Detektionsgrenze von 62.5 nmol für (*S*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*S*)-**71**) bzw. (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*R*)-**71**) ermittelt. Es wird daraus gefolgert, dass sich in den gemessenen Proben neben dem detektierten (*S*)-Enantiomer (*S*)-**71** eine geringere Menge als 62.5 nmol des (*R*)-Enantiomers (*R*)-**71** befindet und daher ein ee-Wert >99% angenommen werden kann. Der zu niedrige Umsatz ist auf Substanzverluste bei der Aufarbeitung und Messschwankungen im Rahmen der ermittelten Grenzen (siehe Abschnitt 4.6.2) zurückzuführen, allerdings liegen alle Umsätze bei Angabe der entsprechenden Fehler im geforderten Bereich von mindestens 49.75% für ee-Werte >99%. Analog der Oxidationen von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) durch die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 10.0, wurden anschließend Oxidationen mit den Alkohol-Dehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* sowie evo-200 durchgeführt (Tabelle 33, Einträge 1, 3 und 5). Außerdem wurden diese Umsetzungen zusätzlich bei pH 7.0 durchgeführt (Tabelle 33, Einträge 2, 4 und 6). Entsprechend dem Ergebnis bei pH 10.0 wurde bei Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 7.0 ein vollständiger Umsatz des (*S*)-Enantiomers (*S*)-**71** mit einem sehr guten ee-Wert von >99% erzielt (Tabelle 33, Einträge 1 – 2). Der Umsatz wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie auf 48% und *via* GC auf 49% bestimmt (Tabelle 33, Eintrag 2). Im Vergleich dazu wurden bei Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 nur moderate ee-Werte von 61% bzw. 86% (pH 10.0 bzw. 7.0) und unvollständige Umsätze von 45% erhalten (Tabelle 33, Einträge 3 – 4). Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* eignet sich nicht für den Einsatz bei pH 10.0. Bei diesem pH-Wert wurde kein Umsatz bei der Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) detektiert (Tabelle 33, Eintrag 5). Bei pH 7.0 wurde

hingegen ein vollständiger Umsatz des (*R*)-Enantiomers (*R*)-**71** mit einem sehr guten ee-Wert von >99% erzielt (Tabelle 33, Eintrag 6).

Tabelle 33. Enzymatische Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Substratgekoppelter Cofaktorregenerierung



Eintrag	<i>rac</i> - 71 / mmol	Enzym (U mmol ⁻¹)	pH-Wert	ee-Wert / %	Umsatz / % ¹ H-NMR / GC
1	0.249	Rsp-ADH (33)	10.0	>99 (<i>R</i>)	48 ± 4 / 47 ± 4
2	0.268	Rsp-ADH (33)	7.0	>99 (<i>R</i>)	48 ± 4 / 49 ± 4
3	0.230	ADH evo-200 (200)	10.0	61 ± 7 (<i>S</i>)	45 ± 4 / (36 ± 4) ^a
4	0.236	ADH evo-200 (200)	7.0	86 ± 2 (<i>S</i>)	45 ± 4 / 45 ± 4
5	0.275	Lk-ADH (30)	10.0	<5 ± 7	<5 ± 4 / <5 ± 4
6	0.281	Lk-ADH (30)	7.0	>99 (<i>S</i>)	49 ± 4 / 50 ± 4

a) GC-Messung nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel.

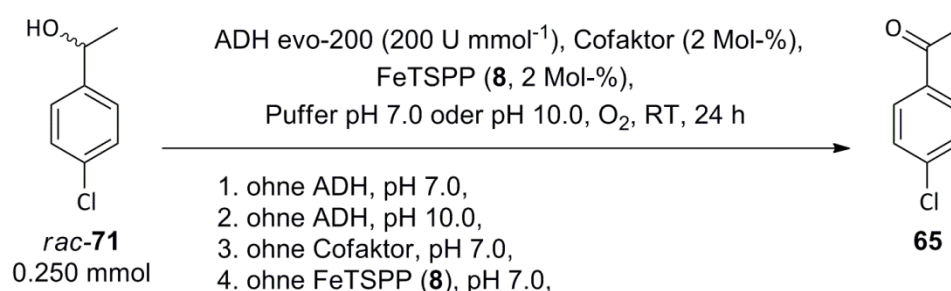
4.6.4 Enzymatische Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

Im Folgenden wird die enzymatische Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch die biomimetische NAD(P)H-Oxidase FeTSPP (**8**) beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, entspricht der Umsatz im Folgenden immer einem produktbezogenen Umsatz.^[192]

4.6.4.1 Kontrollversuche

Um die Notwendigkeit der beteiligten Komponenten (Alkohol-Dehydrogenase, Cofaktor, Cofaktorregenerierungssystem) für die Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) zu *p*-Chloracetophenon (**65**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) zu untersuchen, wurden, ausgehend vom Benchmark-Versuch, entsprechende Kontrollversuche unter Ausschluss jeweils einer Komponente durchgeführt (Tabelle 34).

Tabelle 34. Kontrollversuche zur Ermittlung von Hintergrundreaktionen



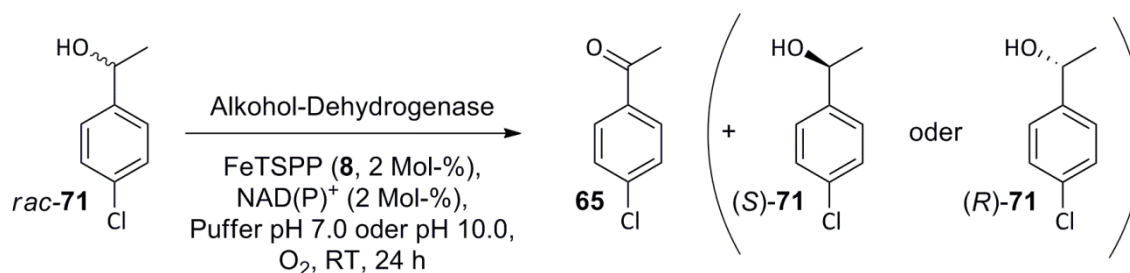
Eintrag	pH-Wert	Enzym (U mmol ⁻¹)	Cofaktor	Cofaktor- regenerierung	ee-Wert / %	Umsatz / % ¹ H-NMR / GC
1	7	–	NAD ⁺	FeTSPP (8)	<1 ±7	<1 ±4 / <1 ±4
2	10	–	NAD ⁺	FeTSPP (8)	1 ±7	<1 ±4 / <1 ±4
3	7	ADH evo-200 (200)	–	FeTSPP (8)	n.b.	0 ±4 / n.b.
4	7	ADH evo-200 (200)	NADH	–	n.b.	10 ±4 / n.b.

Bei den Kontrollversuchen wurde in Abwesenheit von Alkohol-Dehydrogenase oder Cofaktor kein signifikanter Umsatz festgestellt (Tabelle 34, Einträge 1 – 3). Allerdings wurde trotz Abwesenheit eines Cofaktorregenerierungssystems in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 ein Umsatz von 10% erhalten. Eine Erklärung hierfür könnte eine Verunreinigung des Biokatalysators durch eine in der Enzymformulierung enthaltene NADH-Oxidase sein. Dieser Umsatz wird im Folgenden als Hintergrundreaktion berücksichtigt.

4.6.4.2 Enzymatische Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71)

Nachfolgend wurde die enzymatische Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch die biomimetische NAD(P)H-Oxidase FeTSPP (**8**) untersucht (Tabelle 35). In Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 7.0 wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ein Umsatz von 31% erhalten. *Via* Gaschromatographie wurde ein Umsatz von 32% und ein ee-Wert von 50% bestimmt (Tabelle 35, Eintrag 1). Mit diesem Versuch ist der *proof of concept* für eine enzymatische Racematspaltung in Kombination mit der künstlichen Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) gelungen.

Tabelle 35. Enzymatische Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit gekoppelter biomimetischer Cofaktorregenerierung



Eintrag	<i>rac</i> -71 / mmol	Enzym (U mmol ⁻¹)	pH-Wert	ee-Wert / %	Umsatz / % ¹ H-NMR / GC
1	0.236	Rsp-ADH (55)	7.0	50 ± 7 (R)	31 ± 4 / 32 ± 4
2	0.255	Rsp-ADH (55)	10.0	n.b.	<5 ± 4 / n.b.
3	0.275	ADH evo-200 (200)	7.0	13 ± 7 (S)	11 ± 4 / 12 ± 4
4	0.262	ADH evo-200 (200)	10.0	<5 ± 7 (S)	<5 ± 4 / n.b.
5	0.266	Lk-ADH (32)	7.0	n.b.	11 ± 4 / n.b.

Im Gegensatz zu dem Versuch bei pH 7.0 wurde bei pH 10.0 für die gleiche Reaktion kein Produkt detektiert (Tabelle 35, Eintrag 2). Das liegt vermutlich hauptsächlich an der Dimerbildung von FeTSPP (**8**) im Basischen, wodurch das Cofaktorregenerierungssystem inaktiv wird. Bei Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 oder der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* liegen die gemessenen Umsätze im Bereich der Hintergrundreaktion (Tabelle 35, Einträge 3 – 5). Bei diesen Versuchen wird angenommen,

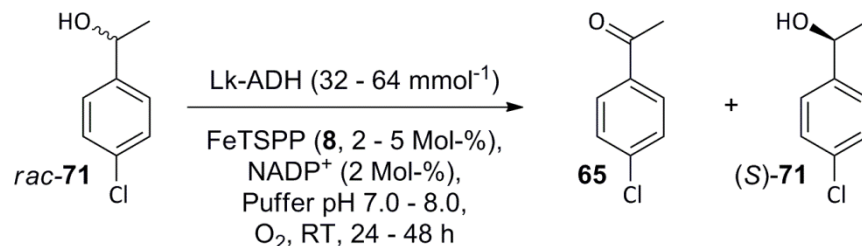
dass keine wesentliche enzymkatalysierte Oxidation in Kombination mit der gekoppelten Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) stattfand.

Dies ist das erste (und einzige) Beispiel, bei dem FeTSPP (**8**) als Cofaktorregenerierungssystem niedrigere bzw. keine Umsätze im Gegensatz zu einer anderen (hier: Substrat-gekoppelten) Cofaktorregenerierung liefert. Möglicherweise ist die bessere Löslichkeit des aromatischen Substrates *rac*-**71** durch die Anwesenheit von Aceton eine Erklärung hierfür.

4.6.4.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Im Folgenden wird untersucht, ob durch Optimierung der Reaktionsbedingungen, ein höherer Umsatz erzielt werden kann.

Tabelle 36. Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)



Eintrag	<i>rac</i> - 71 / mmol	Enzym (U mmol ⁻¹)	pH-Wert	FeTSPP (8) / Mol-%	Reaktionszeit / h	Umsatz / % ¹ H-NMR
1	0.266	Lk-ADH (32)	7.0	2	24	11 ±4
2	0.244	Lk-ADH (64)	7.0	2	24	11 ±4
3	0.259	Lk-ADH (64)	7.0	2	48	11 ±4
4	0.261	Lk-ADH (64)	7.0	5	24	8 ±4
5	0.259	Lk-ADH (64)	8.0	2	24	5 ±4

Zu diesem Zweck wurde die Oxidation von *rac*-*p*-Chlor-phenylethanol (*rac*-**71**) bei pH 7.0 mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch die biomimetische NAD(P)H-Oxidase FeTSPP (**8**), in

Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (Tabelle 35, Eintrag 5 und Tabelle 36, Eintrag 1), als Vergleichsversuch herangezogen. Im Rahmen dieser Optimierungsversuche wurde zunächst die Enzymmenge von 32 U mmol⁻¹ auf 64 U mmol⁻¹ verdoppelt (Tabelle 36, Eintrag 2). Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde, wie im Vergleichsversuch, ein Umsatz von 11% erhalten (Tabelle 36, Eintrag 2). Bei dem gleichen Versuch wurde nach der doppelten Reaktionszeit (48 Stunden) ebenfalls ein Umsatz von 11% erhalten (Tabelle 36, Eintrag 3). Eine Erhöhung der FeTSPP-Konzentration von 2 Mol-% auf 5 Mol-% erbrachte ebenfalls keine Umsatzsteigerung (Tabelle 36, Eintrag 4). Schließlich wurde der Vergleichsversuch bei pH 8.0 durchgeführt, wobei abermals keine Umsatzsteigerung festgestellt wurde (Tabelle 36, Eintrag 5). Damit liegen alle Umsätze dieser Versuchereihe im Bereich typischer Hintergrundreaktionen (Tabelle 34, Eintrag 4). Es wird daher angenommen, dass die gemessenen Umsätze nicht durch die Anwesenheit von FeTSPP (**8**) erhalten wurden.

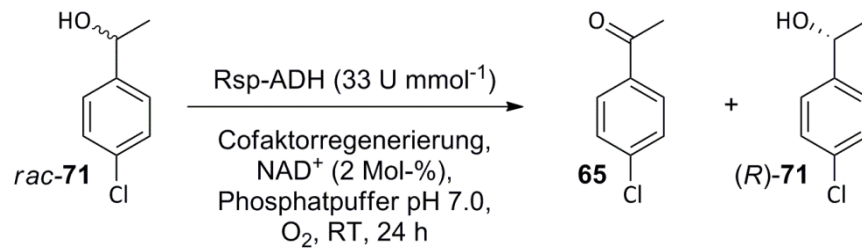
Die Oxidationsreaktion von racemischem *p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) scheint eine ungünstige Gleichgewichtslage zu haben, die durch die Verwendung von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung nicht in Richtung des Produktes verschoben werden kann. Möglicherweise ist auch die schlechte Löslichkeit des Substrats *rac*-**71** im Wässrigen eine Erklärung für die unvollständigen Umsätze.

4.6.5 Enzymatische Racematspaltung von *rac*-*p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch NADH-Oxidase

Die Oxidation von *rac*-*p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. bei pH 7.0 wurde mittels enzymatischer *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch die NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* durchgeführt. Dabei wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie ein Umsatz von 13% erhalten. Laut gaschromatographischer Messung wurde ein produktbezogener Umsatz von 12% und ein ee-Wert von 13% gemessen (Tabelle 37, Eintrag 1). Damit liegt der Umsatz im Bereich typischer Hintergrundreaktionen. Es wird daher angenommen, dass die gemessenen Umsätze möglicherweise nicht durch die Anwesenheit der NADH-Oxidase zustande kamen. Im direkten Vergleich wurden durch Verwendung der Cofaktorregenerierung durch Aceton

bzw. durch FeTSPP (**8**) deutlich bessere Umsätze erhalten (Tabelle 37, Eintrag 2 – 3). Dieses Ergebnis zeigt erneut den großen Wert der künstlichen Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) als Ergänzung und teilweise als Verbesserung der bereits etablierten Regenerierungsmethoden.

Tabelle 37. Vergleich verschiedener Cofaktorregenerierungssysteme



Eintrag	Cofaktor- regenerierung	<i>rac</i> - 71 / mmol	Enzym (U mmol ⁻¹)	ee-Wert / %	Umsatz / % ¹ H-NMR / GC
1	NADH-Oxidase ^a	0.262	Rsp-ADH (55)	13 ±7 (<i>R</i>)	13 ±4 / 12 ±4
2	Aceton (25 Vol.%)	0.268	Rsp-ADH (33)	>99 (<i>R</i>)	48 ±4 / 49 ±4
3	FeTSPP (2 Mol-%)	0.236	Rsp-ADH (55)	50 ±7 (<i>R</i>)	31 ±4 / 32 ±4

a) NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (28 U mmol⁻¹).

4.7 Untersuchung weiterer Metalloporphyrine als potentielle künstliche NAD(P)H-Oxidasen

4.7.1 Vorarbeiten mit hydrophilen Eisen(III)-porphyrinen **72 – 74**

Auf der Suche nach niedermolekularen Metalloporphyrinen, die den natürlichen Cofaktor NAD(P)H als Hydridonor zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff akzeptieren und damit zugleich die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser ermöglichen, testete MAID bereits eine Reihe hoch wasserlöslicher Eisen(III)-porphyrine **72 – 74**, die kürzlich im Arbeitskreis Jux (Universität Erlangen-Nürnberg) entwickelt wurden (Abbildung 18).^[223]

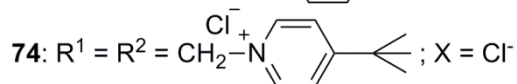
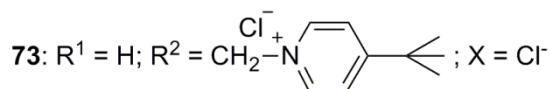
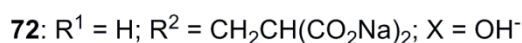
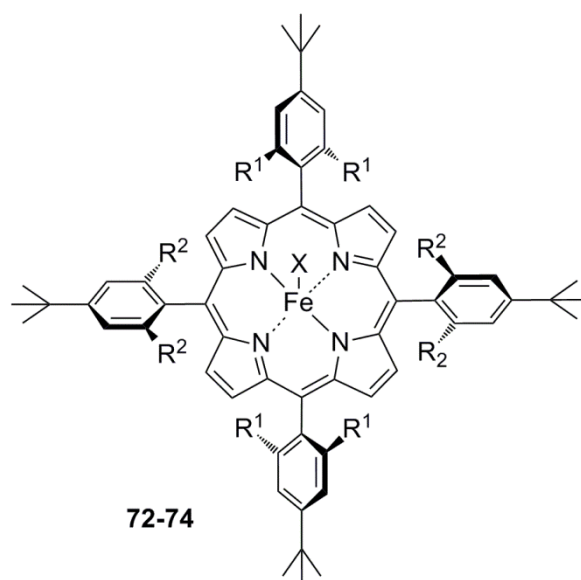


Abbildung 18. Wasserlösliche Eisen(III)-porphyrine **72 – 74**

Die Fe(III)-Komplexe **72 – 74** basieren auf Porphyrinderivaten mit entweder vierfach oder achtfach positiv oder achtfach negativ geladenem Substitutionsmuster und wurden spektralphotometrisch auf ihre Eignung als Katalysatoren für die Oxidation des Cofaktors NADH in Gegenwart von molekularem Sauerstoff unter Generierung der oxidierten Form NAD^+ (und Wasser oder Wasserstoffperoxid als Koppelprodukt) untersucht. Allerdings erwies

sich keiner dieser Komplexe im wässrigen Reaktionsmedium als geeignet für die oxidative Umsetzung des Cofaktors NADH zu NAD⁺. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass der Zugang des ebenfalls geladenen Cofaktors zum Eisenzentrum erschwert ist, da dieses durch die sterisch anspruchsvollen (geladenen) Substituenten in den Eisen-Porphyrin-Komplexen **72** – **74** abgeschirmt wird.

4.7.2 Untersuchung des hydrophoben Eisen(III)-porphyrins **75**

In dieser Arbeit wurde zusätzlich der hydrophobe Fe(III)-Komplex **75**, der vom Arbeitskreis SPECK (Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt wurde, auf dessen Eignung als Katalysator für die Oxidation des Cofaktors NAD(P)H in Gegenwart von molekularem Sauerstoff unter Generierung der oxidierten Form NAD(P)⁺ (und Wasser oder Wasserstoffperoxid als Koppelprodukt) untersucht (Abbildung 19).^[224]

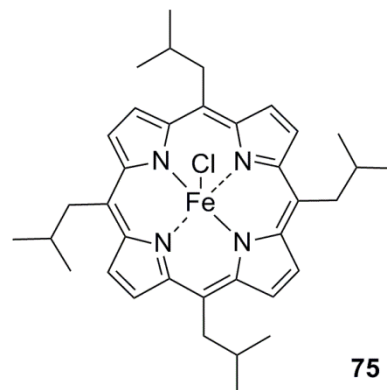
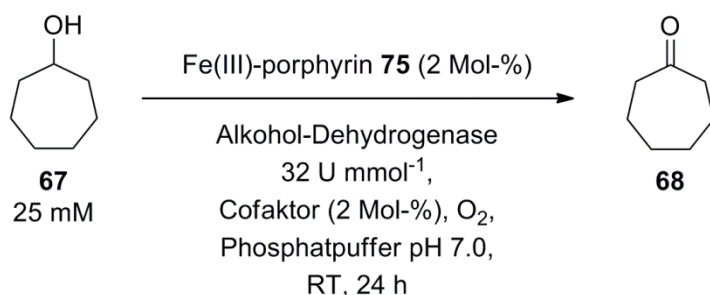


Abbildung 19. 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**)

Die Überprüfung der NADH-Oxidase-Aktivität von **75** wurde anhand präparativer Untersuchungen durchgeführt. Als Modellreaktion wurde die bereits oben beschriebene (4.5.2.2, Tabelle 16, Einträge 1 – 2) Oxidation von Cycloheptanol (**67**) zu Cycloheptanon (**68**) durch die Alkoholdehydrogenasen aus *Rhodococcus* sp. bzw. aus *Lactobacillus kefir* herangezogen. Im Gegensatz zur Modellreaktion mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**), wurde in analogen Experimenten in Gegenwart des Fe(III)-Komplexes **75** anstelle von **8** kein Umsatz festgestellt, der auf eine katalytische Cofaktorregenerierung zurückzuführen wäre. In Anwesenheit der Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. wurde zwar ein produktbezogener Umsatz von 11% bestimmt (Tabelle 38,

Eintrag 1), allerdings liegt dieser Umsatz im Bereich einer Hintergrundreaktion, bei der ohne zugegebenem Fe(III)-porphyrin **75** ein Umsatz von 10% ermittelt wurde (Tabelle 38, Eintrag 2). Vermutlich stammt dieser Umsatz aus Verunreinigungen der Enzymformulierungen. Möglicherweise enthält das verwendete Rohextrakt der Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. eine geringe NADH-Oxidase-Aktivität. Zum Vergleich wurde in Abwesenheit des Biokatalysators kein Umsatz erhalten (Tabelle 38, Eintrag 3).

Tabelle 38. Synthese von Cycloheptanon (**68**) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch Fe(III)-porphyrin **75**



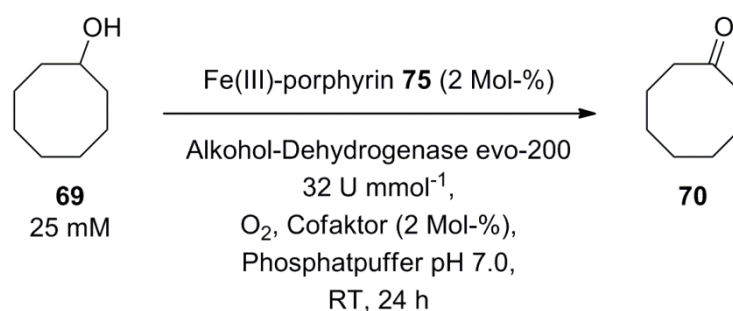
Eintrag	Enzym	Cofaktor	Fe(III)-porphyrin 75	produktbezogener Umsatz / %	berechnete Ausbeute ^a / % Produkt / Edukt
1	Rsp-ADH	NAD ⁺	2 Mol-%	11	9 / 76
2	Rsp-ADH	NADH	–	10	6 / 57
3	–	NAD ⁺	2 Mol-%	0	0 / 94
4	Lk-ADH	NADPH	2 Mol-%	0	0 / 87

a) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4.

In Gegenwart der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* wurde ebenfalls kein Umsatz festgestellt (Tabelle 38, Eintrag 4). Die Substitution von FeTSPP (**8**) durch das Fe(III)-porphyrin **75** erbrachte unter diesen Bedingungen keinen Umsatz. Es wurde keine NAD(P)H-Oxidase-Aktivität für **75** gefunden. Zusätzlich wurde Fe(III)-porphyrin **75** anhand der Oxidation von Cyclooctanol (**69**) in Gegenwart der Alkoholdehydrogenase evo-200 auf eine mögliche NADH-Oxidase-Aktivität untersucht. Während diese Reaktion in Anwesenheit von FeTSPP (**8**) quantitativ abläuft (4.5.3.2, Tabelle 22, Eintrag 3), wurde bei Verwendung des Fe(III)-porphyrins **75** nur ein Umsatz von 2% ermittelt (Tabelle 39, Eintrag 1). Allerdings liegt

dieser Umsatz im Bereich des Vergleichsversuches, bei dem in Abwesenheit eines Regenerierungssystems ein Umsatz von 4% ermittelt wurde. Dabei ist ein Umsatz von 2% auf die Verwendung der oxidierten Cofaktorform NAD^+ zurückzuführen. In Gegenwart der Alkoholdehydrogenase evo-200 wurde unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen ebenfalls keine NAD(P)H-Oxidase-Aktivität für **75** gefunden.

Tabelle 39. Synthese von Cyclooctanon (**70**) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch Fe(III)-porphyrin **75**



Eintrag	Cofaktor	Fe(III)-porphyrin 75	produktbezogener Umsatz / %	berechnete Ausbeute ^a / % Produkt / Edukt
1	NADH	2 Mol-%	2	2 / 78
2	NAD^+	–	4	n.b. / n.b.

a) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4.

4.7.3 Untersuchung von MnTSPP (**76**), PdTSPP (**77**) und des freien TSPP-Liganden (**78**)

Des Weiteren wurden anstelle von FeTSPP (**8**) die Metalloporphyrine MnTSPP (**76**) und PdTSPP (**77**) sowie der freie TSPP-Liganden (**78**) auf eine mögliche NADH-Oxidase-Aktivität hin untersucht (Abbildung 20).

Der freie Ligand TSPP (**78**) und PdTSPP (**77**) wurden anhand der Oxidation von Cyclooctanol (**69**) in Gegenwart der Alkohol-Dehydrogenase evo-200 auf eine mögliche NADH-Oxidase-Aktivität untersucht (Tabelle 40, Einträge 1–2). In beiden Fällen wurden produktbezogene Umsätze von 2% ermittelt, die auf die Verwendung der oxidierten

Cofaktorform NAD^+ zurückzuführen sind. Eine Cofaktorregenerierung bzw. eine NADH-Oxidase-Aktivität wurde nicht festgestellt.

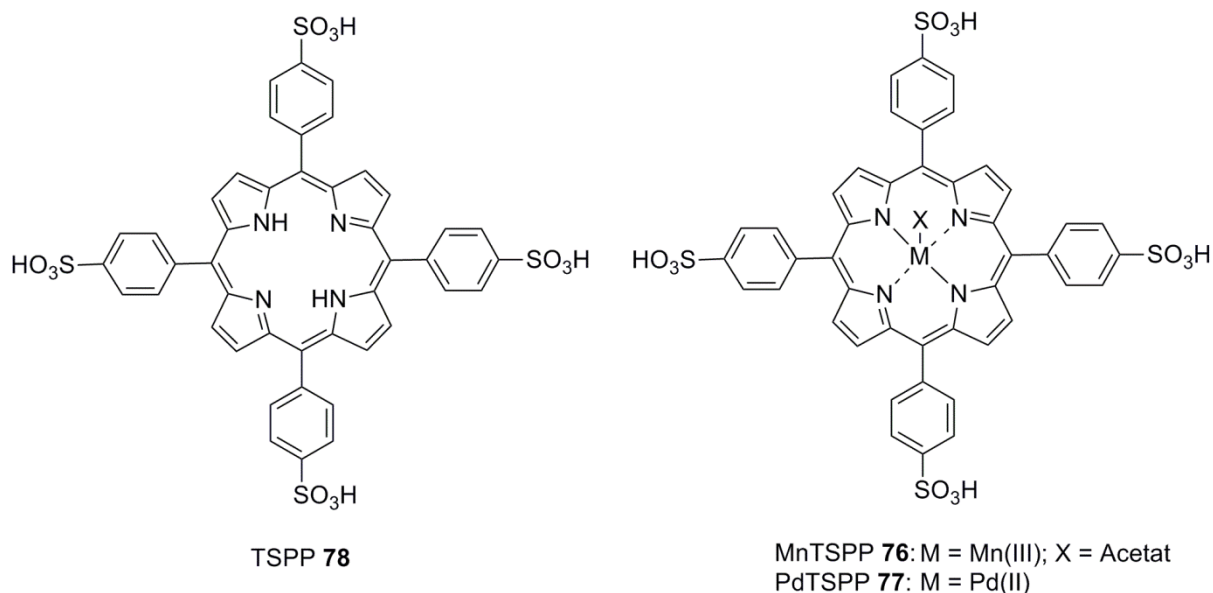
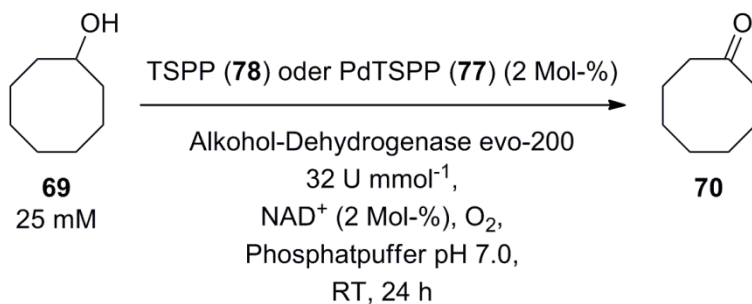


Abbildung 20. MnTSPP (**76**), PdTSPP (**77**) und TSPP (**78**)

Tabelle 40. Synthese von Cyclooctanon (**70**) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch TSPP (**78**) und PdTSPP (**77**)

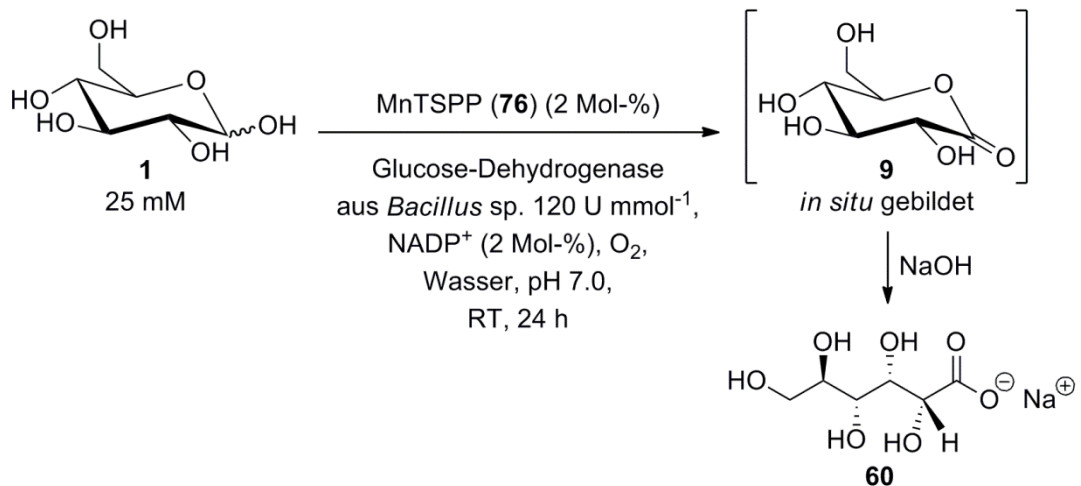


Eintrag	Cofaktor	Fe(III)-porphyrin	produktbezogener Umsatz / %	berechnete Ausbeute ^a / % Produkt / Edukt
1	NAD^+	78 (2 Mol-%)	2	n.b. / n.b.
2	NAD^+	77 (2 Mol-%)	2	n.b. / n.b.

a) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4.

Schließlich wurde MnTSPP (**76**) auf eine NADPH-Oxidase-Aktivität untersucht (Abbildung 20). Als Modellreaktion wurde hierfür die in Kapitel 4.2 als Benchmarkversuch etablierte Oxidation von D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) in Anwesenheit einer Glucose-

Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) verwendet. Anstelle von **8** wurde das Metalloporphyrin MnTSPP (**76**) verwendet (Schema 49). Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde kein Umsatz mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie festgestellt. Für MnTSPP (**76**) wurde somit keine NADPH-Oxidase-Aktivität nachgewiesen.



Schema 49. Synthese von D-Glucono- δ -lacton (**9**) mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch MnTSPP (**76**)

Bislang ist FeTSPP (**8**) das einzige Beispiel für die Eignung eines metallhaltigen Porphyrinkomplexes als Katalysator zur Oxidation der Cofaktoren NADH sowie NADPH mit molekularem Sauerstoff in wässrigem Reaktionsmedium.

4.8 Eisen(III)-porphyrin-katalysierte *in-situ*-Cofaktorregenerierung – Prozessentwicklung und Recycling

Für eine breite und effiziente Syntheseanwendung mit industrieller Perspektive von FeTSPP (**8**) zur Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD(P)⁺, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Beispielsweise muss die Skalierbarkeit der Cofaktorregenerierung gewährleistet sein und die Kosten für FeTSPP (**8**) und NAD(P)⁺ müssen reduziert werden.

Derzeit belaufen sich die Kosten für die Cofaktoren NAD(P)⁺ auf 2655 € mol⁻¹ bzw. 11 417 € mol⁻¹ (NAD⁺ bzw. NADP⁺, Jülich Fine Chemicals (2003)).^[39] In dieser Arbeit wurde eine *total turnover number* (TTN-Wert) von 500 erreicht, wodurch sich ein Kostenfaktor von 5.3 € mol⁻¹ Produkt für NAD⁺ bzw. 22.8 € mol⁻¹ Produkt für NADP⁺ errechnet. Für einen kommerziellen Einsatz sollten die TTN-Werte des Oxidationsprozesses hingegen, je nach Wert des Produktes, bei mindestens 1000 liegen.^[16] Die Kosten für FeTSPP (**8**) belaufen sich derzeit auf ca. 210 € g⁻¹ (TriPorTech GmbH). Laut Schätzung des Herstellers (TriPorTech GmbH) könnten sich die Kosten für Bulk-Mengen auf ca. 10.000 € kg⁻¹ (10 € g⁻¹) reduzieren. In dieser Arbeit wurden für FeTSPP (**8**) Wechselzahlen (TONs) von 50 erhalten, woraus sich für **8** ein Kostenfaktor von 204 € mol⁻¹ Produkt errechnet. Für den effizienten Einsatz von FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung ist eine Kostenreduktion bezüglich des Porphyrins wünschenswert.

Im Rahmen einer Prozessoptimierung wird im Folgenden zunächst die Substratkonzentration eines Modellversuchs verdoppelt, um das relative Verhältnis von Substrat zu Cofaktor bzw. Substrat zu FeTSPP (**8**) zu optimieren und damit verbesserte TON-Werte zu bewirken. Als Modellreaktion wird die Oxidation von Cycloheptanol (**67**) durch die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) (aus Kapitel 4.5.2.2, Tabelle 16, Eintrag 2) verwendet. Anschließend wird die Skalierbarkeit der künstlichen Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) vom Milligramm- auf den Gramm-Maßstab beschrieben. Zusätzlich wird anhand eines Langzeitversuches die Stabilität und Aktivität von FeTSPP (**8**) untersucht. Zur Steigerung der Wechselzahl (TON-Wert) von FeTSPP (**8**) wird außerdem eine Methode zum Recycling des Katalysators **8** vorgestellt.

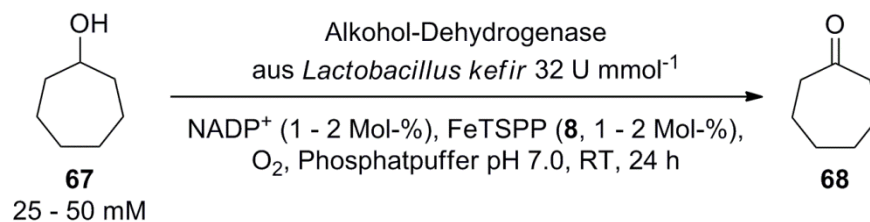
4.8.1 Prozessoptimierung

Wie bereits beschrieben (4.5.2.2, Tabelle 16, Eintrag 2), lässt sich Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* und NADP^+ (2 Mol-%) als Cofaktor unter Einsatz von FeTSPP (**8**) (2 Mol-%) zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung in wässrigem Medium (10 mL) oxidieren. Bei pH 7.0 und einer Reaktionszeit von 24 Stunden wird hierbei das Produkt Cycloheptanon (**68**) mit Umsätzen zwischen 95 und >99% erhalten (Tabelle 41, Eintrag 1). In diesem Kapitel wird diese Umsetzung als Modellreaktion verwendet.

4.8.1.1 Erhöhung der Substratkonzentration

Ausgehend von der Modellreaktion (Tabelle 41, Eintrag 1) wurde die Erhöhung der Substratkonzentration untersucht. Hierfür wurde sowohl die Substratkonzentration als auch die Enzymmenge verdoppelt während alle anderen Komponenten konstant gehalten wurden (Tabelle 41, Eintrag 2).

Tabelle 41. Oxidation von Cycloheptanol (**67**) mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen



Versuch	Cycloheptanol (67) / mmol	Enzymmenge / U mmol^{-1}	produktbezogener Umsatz / %	Ausbeute ^c / % Produkt / Edukt
1 ^a	0.27	32	>99 (95) ^d	89 (85) ^d / 0 (5) ^d
2 ^b	0.50	32	68	52 / 24

a) FeTSPP (**8**) und NADP^+ : 2 Mol-% bezogen auf 0.25 mmol Substrat; b) FeTSPP (**8**) und NADP^+ : 1 Mol-% bezogen auf 0.50 mmol Substrat **67**; c) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4; d) Unter analogen Bedingungen in einem Wiederholungsversuch erhaltene Werte.

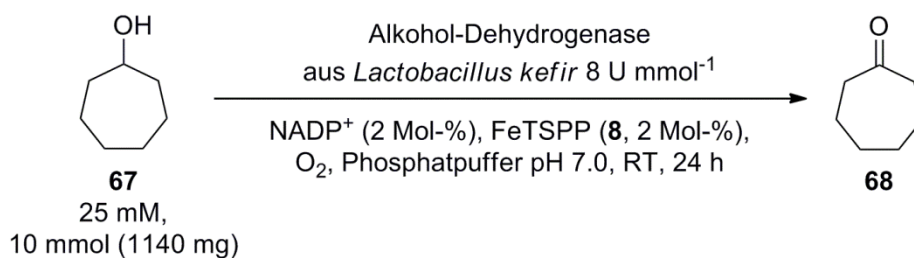
Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde nach 24 Stunden ein produktbezogener Umsatz von 68% und eine berechnete Produktausbeute von 52% erhalten. Eine Produktinhibierung oder eine zu langsam verlaufende Cofaktorregenerierung könnten dafür verantwortlich sein,

dass unter diesen Reaktionsbedingungen kein quantitativer Umsatz erhalten wurde. Eine Prozessoptimierung erscheint auf diese Weise als weniger gut geeignet.

4.8.1.2 Scale-up

Die im Milligramm-Maßstab quantitativ verlaufende Modellreaktion (Tabelle 42, Eintrag 1) wurde hinsichtlich ihrer Skalierbarkeit auf den Gramm-Maßstab untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Stoffmengen aller benötigten Komponenten in einem 40-fachen Maßstab eingesetzt, wobei die verwendete Menge an Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* dabei nur verzehnfacht wurde (Tabelle 42, Eintrag 2).

Tabelle 42. Oxidation von Cycloheptanol (**67**) im Gramm-Maßstab



Versuch	Cycloheptanol (67) / mmol	Enzymmenge / U mmol ⁻¹	produktbezogener Umsatz / %	Ausbeute ^a / % Produkt / Edukt
1	0.27	32	>99 (95) ^c	89 (85) ^c / 0 (5) ^c
2	9.98	8	96	93 / 4

a) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4; b) Durchschnittswert aus zwei analog durchgeführten Versuchen; c) Unter analogen Bedingungen in einem Wiederholungsversuch erhaltene Werte.

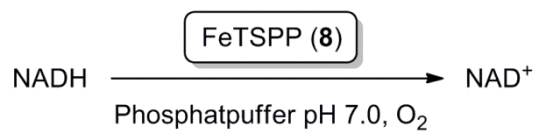
Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde ein produktbezogener Umsatz von 96% und eine berechnete Produktausbeute von 93% erzielt. Damit liegt das Ergebnis des *Scale-up*-Versuches im Bereich der Modellreaktion. Die Skalierbarkeit auf den Gramm-Maßstab ist damit gelungen, wobei gleichzeitig die Enzymmenge reduziert werden konnte.

4.8.2 Langzeitstabilität und -aktivität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**

Die Aktivitätsabnahme in Lösung sowie die Eignung von FeTSPP (**8**) über einen längeren Zeitraum als Katalysator eingesetzt zu werden, wurde anhand der Langzeitstabilität

untersucht. Zur Bestimmung der Langzeitstabilität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**, wurde hierfür eine Stammlösung aus FeTSPP (**8**) (0.1 mM) in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) 58 Tage lang in einem verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur gerührt. Die spezifische Aktivität (Methode A, siehe 4.3.1) wurde direkt nach dem Ansetzen der Lösung sowie nach 14, 21 und 58 Tagen unter jeweils identischen Bedingungen (Cofaktor 25.0 μM und FeTSPP (**8**) 125 μM), bestimmt. Die Verfolgung der Aktivität wurde exemplarisch mit NADH durchgeführt, wobei für jede Messung eine frische Lösung des Cofaktors verwendet wurde.

Tabelle 43. Langzeitstabilität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**



Eintrag	Zeit / d	NADH / μM	FeTSPP 8 / μM	spezifische Aktivität / U mg^{-1}	TOF / s^{-1}
1	0	125	25.0	4.6	0.08
2	14	125	25.0	4.5	0.08
3	21	125	25.0	4.2	0.07
4	28	125	25.0	3.0	0.05
5	58	125	25.0	3.3	0.06

Während die spezifische Aktivität der frisch angesetzten FeTSPP-Lösung bei 4.6 U mg^{-1} lag, wurde nach 14 Tagen eine Aktivität von 4.5 U mg^{-1} und nach 21 Tagen von 4.2 U mg^{-1} , entsprechend 91% der Anfangsaktivität gemessen (Tabelle 43, Einträge 1 – 3). Nach 58 Tagen betrug die spezifische Aktivität 3.3 U mg^{-1} , entsprechend 71% der Anfangsaktivität für die künstliche NAD(P)H-Oxidase **8** (Tabelle 43, Eintrag 5). Der durchschnittliche Aktivitätsverlust liegt damit bei 0.5% pro Tag über einen Zeitraum von 58 Tagen.

Von der 58-Tage alten FeTSPP-Lösung wurde außerdem ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Dieses wurde mit dem Absorptionsspektrum einer frischen FeTSPP-Lösung und mit dem des freien Porphyrinliganden (TSPP (**78**)) verglichen (Abbildung 21). FeTSPP (**8**)

und der freie Ligand TSPP (**78**) lassen sich aufgrund der deutlichen Unterschiede der Absorptionsspektren leicht unterscheiden. Entsprechend der Literatur^[166,169] zeigt das Absorptionsspektrum von FeTSPP (**8**) bei pH 7.0 eine Soret-Bande bei 409 nm und jeweils zwei (teilweise sehr schwache) Q-Banden für die Monomer- und die Dimerform bei 528 nm, 565 nm, 606 nm und 680 nm (Abbildung 21, blaue Markierung). Der freie TSPP-Ligand besitzt eine sehr ausgeprägte Soret-Bande bei 413.5 nm, mit einer wesentlich höheren Intensität als die Soret-Bande des komplexierten Liganden, sowie vier Q-Banden bei 515.5 nm, 551 nm, 577.5 nm und 634.5 nm (Abbildung 21, graue Markierung).^[225]

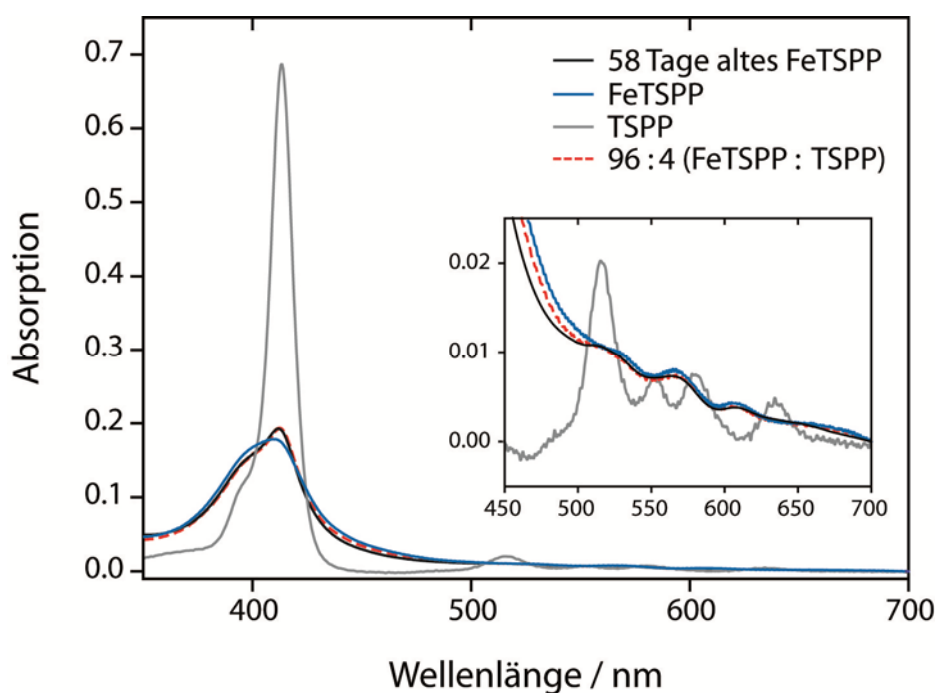


Abbildung 21. Absorptionsspektren von FeTSPP (**8**), TSPP (**78**) und einer 58 Tage alten FeTSPP-Lösung (jeweils 2.5 μM)

Im Vergleich dazu zeigt das FeTSPP-Spektrum der 58 Tage alten Lösung nur leichte Abweichungen vom Spektrum einer frisch angesetzten FeTSPP-Lösung bei pH 7.0. Die Soret-Bande liegt nun bei 412 nm und vier Q-Banden sind bei 512.5 nm, 563.5 nm, 607 nm und eine sehr schwach ausgeprägte Bande bei ca. 653 nm erkennbar (Abbildung 21, schwarze Markierung). Das Spektrum der 58 Tage alten FeTSPP-Lösung deutet darauf hin, dass das meiste FeTSPP (**8**) unverändert in der 58 Tage alten Lösung vorliegt. Ein simuliertes Spektrum, zusammengesetzt aus dem Absorptionsspektrum der frischen FeTSPP-Lösung und 4% des Absorptionsspektrums des TSPP-Liganden zeigt insbesondere im Bereich der Soret-

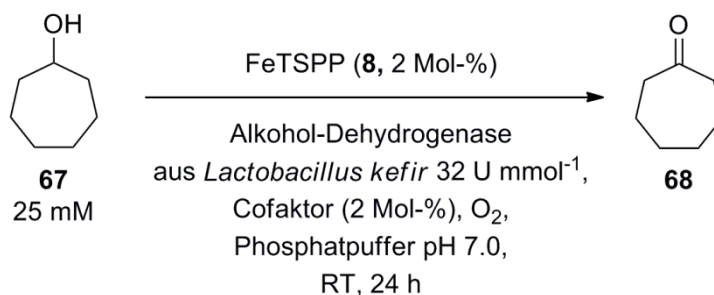
Bande um 400 nm eine gute Übereinstimmung mit dem Spektrum der 58 Tage alten FeTSPP-Lösung (Abbildung 21, rote Markierung). Fe(III)-Ionen zeigen hingegen keine Absorption im untersuchten Bereich. Es konnte hier gezeigt werden, dass FeTSPP (**8**) unter den verwendeten Bedingungen sehr robust ist und nur geringe Mengen komplexierte Eisenionen aus dem Komplex freigesetzt werden.

Insgesamt zeigen diese Vorversuche eine hohe Langzeitstabilität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** in Lösung. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden Recycling-Versuche durchgeführt, bei denen die Eignung der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8** zur Wiederverwertung in präparativen Versuchen untersucht wurde.

4.8.3 Recycling von FeTSPP (**8**)

Ausgehend von der Modellreaktion (4.5.2.2, Tabelle 16, Eintrag 2) wurde eine Versuchsreihe zur Wiederverwendung von FeTSPP (**8**) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Modellreaktion durchgeführt und nach 24 Stunden die Reaktionslösung zur Produkt- und Substratabtrennung mit Dichlormethan extrahiert. Es wurde ein produktbezogener Umsatz von 95% erhalten (Tabelle 44, Eintrag 1). Die *turn over number* (TON-Wert) für FeTSPP (**8**) wurde auf 49 berechnet. Die wässrige Phase enthält noch alle wasserlöslichen Komponenten (FeTSPP (**8**), MgCl₂, Puffersalze, Cofaktor sowie inaktive Alkohol-Dehydrogenase und entsprechende Komponenten der Enzymformulierung) und wurde eine Woche lang gesondert bei Raumtemperatur aufgehoben. Für das Recycling des FeTSPP (**8**) wurde die wässrige Lösung von Lösungsmittelresten befreit.

Für den ersten Recycling-Ansatz wurde nun Cycloheptanol (**67**) (25 mM), Cofaktor (2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1 mM) sowie Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (32 U mmol⁻¹ Substrat) zu der wässrigen Phase aus dem vorherigen Ansatz gegeben (Tabelle 44, Eintrag 2). Frisches FeTSPP (**8**) wurde nicht zu der Reaktionslösung gegeben.

Tabelle 44. Umsatz und TON-Werte der Recyclingversuche

Eintrag	Zeit / d	Substrat / mmol	Umsatz / %	Umgesetztes Edukt / mmol	TON	
1	0	0.260	95	0.247	49	Ansatz
2	7	0.254	91	0.231	46	1. Recycling
3	14	0.265	>99	0.265	53	2. Recycling
4	21	0.245	99	0.243	49	3. Recycling
5	28	0.264	>99	0.264	53	4. Recycling
6	56	0.270	17	0.046	9	5. Recycling
7	83	0.243	4	0.010	2	6. Recycling
Summe: 1.305					Summe: 261	

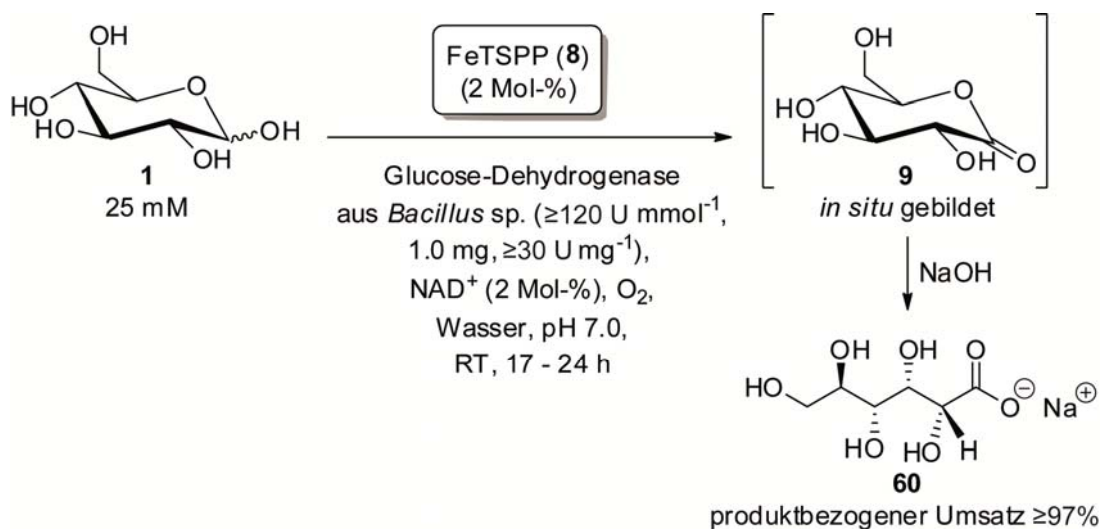
Nach 24 Stunden wurde ein produktbezogener Umsatz von 91% und eine *turn over number* (TON-Wert) von 46 erhalten. Die wässrige Phase des Recycling-Versuches wurde aufgehoben und für den nächsten Recycling-Versuch verwendet. Analog wurde das zweite Recycling nach 14 Tagen durchgeführt. Hierbei wurde ein produktbezogener Umsatz >99% erhalten (Tabelle 44, Eintrag 3). Die *turn over number* (TON-Wert) wurde auf 53 bestimmt. Entsprechend wurde beim dritten und vierten Recycling nach 21 bzw. 28 Tagen ein Umsatz von 99% bzw. von >99% erhalten (Tabelle 44, Einträge 3 und 4). Die jeweiligen *turn over numbers* (TON-Werte) wurde auf 49 bzw. auf 53 bestimmt. Beim fünften Recycling nach 58 Tagen wurde ein produktbezogener Umsatz von 17% und eine entsprechende *turn over number* (TON-Wert) von 9 erhalten (Tabelle 44, Eintrag 6). Der letzte Recycling-Ansatz nach 83 Tagen ergab einen produktbezogenen Umsatz von 4% und eine *turn over number* (TON-Wert) von 2 (Tabelle 44, Eintrag 7).

Insgesamt wurde in der Summe aller Ansätze 1.3 mmol Substrat umgesetzt. Daraus errechnet sich eine total turnover number (TTN-Wert) von 261 (Tabelle 44). Es wurde gezeigt, dass ein Recycling von FeTSPP (**8**) generell möglich ist und über einen Zeitraum von 4 Wochen sehr gute Ergebnisse liefert. Dies würde einer Senkung des Kostenfaktors von 204 € mol⁻¹ Produkt auf ca. 40 € mol⁻¹ Produkt entsprechen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das synthetische, wasserlösliche Eisen(III)-porphyrin FeTSPP (**8**, 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid) als neuartiges Cofaktor-regenerierungssystem eingehend charakterisiert und die präparative Anwendungsbreite der *in-situ*-Regenerierung von NAD^+ und NADP^+ anhand von Oxidationsreaktionen verschiedener Substrate in wässriger Lösung bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht.

Zunächst wurde das *in-situ*-Regenerierungssystem **8** erfolgreich unter optimierten Bedingungen mit der präparativen enzymatischen Oxidation von D-Glucose (**1**) unter Verwendung einer Glucose-Dehydrogenase kombiniert und erstmals ein quantitativer produktbezogener Umsatz^[192] erhalten (Schema 50). Der hierbei benötigte Cofaktor NAD^+ wird *in situ* durch FeTSPP (**8**), entsprechend der Wirkungsweise einer NADH-Oxidase, regeneriert. Das Eisen(III)-porphyrin **8** selbst wird dabei in Anwesenheit von Luftsauerstoff regeneriert.

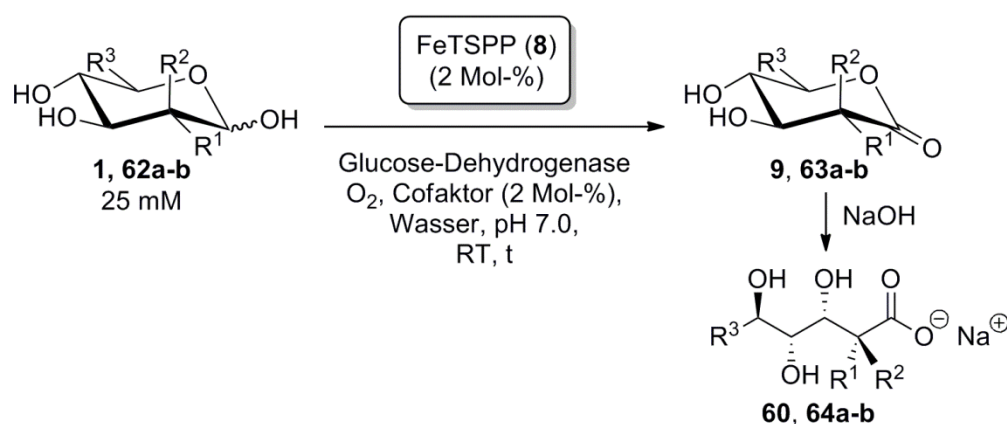


Schema 50. Oxidation von D-Glucose (**1**) zu D-Glucono- δ -lacton (**9**) und anschließender Hydrolyse und Neutralisation des *in-situ* gebildeten Lactons **9** zu Natrium-D-gluconat (**60**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

Für eine genaue Untersuchung der Reaktion war es notwendig, eine Analytik mit einer verlässlichen Bestimmung des produktbezogenen Umsatzes aus dem Rohprodukt in Anwesenheit des paramagnetischen Fe(III)-porphyrins **8** zu etablieren. Da sich eine Umsatzbestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aufgrund von Signalüberlagerungen als

ungünstig erwies, erfolgte in dieser Arbeit die Umsatzbestimmung der Oxidation von D-Glucose (**1**) zu Natrium-D-gluconat (**60**) mittels Protonen-Breitband-entkoppelter ^{13}C -NMR-Spektroskopie mit der Methode des „*inverse gated decoupling*“ oder durch Quantifizierung von Protonen-Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren (siehe 4.2.3). Für den Fall, dass kein Edukt im Protonen-Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert werden konnte, wurde entsprechend der zuvor bestimmten Nachweisgrenze ein produktbezogener Umsatz $\geq 97\%$ angegeben. Nach Etablierung der Analytik wurde die Anwendungsbreite von FeTSPP (**8**) als Cofaktorregenerierungssystem untersucht.

Tabelle 45. Oxidation verschiedener Monosaccharide mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)



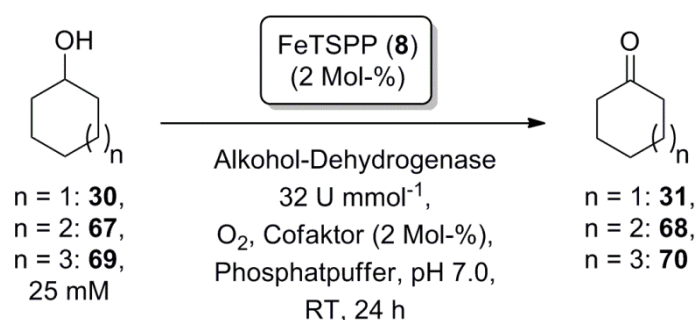
Eintrag	Substrat	R^1	R^2	R^3	Cofaktor	t / h	Umsatz ^d / %
1 ^a	D-Glucose (1)	OH	H	CH_2OH	NADH	24	≥ 97
2 ^a	D-Glucose (1)	OH	H	CH_2OH	NAD^+	24	≥ 97
3 ^a	D-Glucose (1)	OH	H	CH_2OH	NADP^+	24	≥ 97
4 ^b	D-Glucose (1)	OH	H	CH_2OH	NADPH	24	≥ 97
5 ^a	D-Mannose (62a)	H	OH	CH_2OH	NADP^+	264	≥ 95
6 ^c	D-Xylose (62b)	OH	H	H	NADP^+	24	≥ 98

a) Einsatz von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat);
 b) Einsatz von GDH aus *T. acidophilum* (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 120 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat);
 c) Einsatz von GDH aus *Bacillus* sp. (1.5 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, $\geq 180 \text{ U mmol}^{-1}$ bezogen auf die Menge an Substrat);
 d) Der Umsatz ist bezogen auf die Bildung von **60** bzw. **64a-b** (produktbezogener Umsatz), wobei keine Bildung von Nebenprodukten bei der enzymatischen Oxidation von **1** bzw. **62a-b** beobachtet wird und die Hydrolyse von **9** bzw. **63a-b** zu **60** bzw. **64a-b** quantitativ verläuft.

Die Oxidation von D-Glucose (**1**) zu Natrium-D-gluconat (**60**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSP (**8**) konnte hierbei sowohl durch eine Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. als auch durch eine Glucose-Dehydrogenase aus *Thermoplasma acidophilum* quantitativ durchgeführt werden (Tabelle 45, Einträge 1 – 2). Dabei konnte gezeigt werden, dass neben NAD⁺ ebenfalls der phosphorylierte Nicotinamid-Cofaktor NADP⁺ durch **8** regeneriert werden kann (Tabelle 45, Einträge 1 – 4). Anschließend wurden noch weitere Biotransformationen unter Verwendung anderer Monosaccharide durchgeführt, um die Eignung der entwickelten Methode zur *in-situ*-Cofaktorregenerierung von NAD(P)⁺ auch für diese Reaktionen zu untersuchen. Hierbei gelang analog die Herstellung von Natrium-D-mannonat (**64a**) sowie Natrium-D-Xylonat (**64b**) mit quantitativen produktbezogenen Umsätzen (Tabelle 45, Einträge 5 – 6).

Das als biomimetische NADH-Oxidase identifizierte Metalloporphyrin **8** erwies sich darüber hinaus auch als geeignet für die Cofaktorregenerierung bei Alkohol-Dehydrogenase-katalysierten Oxidationsreaktionen der achiralen sekundären Alkohole Cyclohexanol (**30**), Cycloheptanol (**67**) sowie Cyclooctanol (**69**) (Tabelle 46). In Gegenwart verschiedener Alkohol-Dehydrogenasen (Lk-ADH, Rsp-ADH und ADH evo-200) konnte Cyclohexanon (**31**) unter Einsatz von 2 Mol-% des Eisen(III)-porphyrins **8** und 2 Mol-% Cofaktor mit bis zu 35% produktbezogenem Umsatz erhalten werden (Tabelle 46, Einträge 1 – 3). Die Alkohole Cycloheptanol (**67**) und Cyclooctanol (**69**) konnten unter diesen Bedingungen abhängig vom verwendeten Biokatalysator mit Umsätzen bis >99% oxidiert werden (Tabelle 46, Einträge 4 – 6 und Einträge 7 – 10).

Zusätzlich wurde ein Vergleich der Cofaktorregenerierung mittels FeTSP (**8**) und zwei weiteren Methoden zur Cofaktorregenerierung durchgeführt. Bei einer Cofaktorregenerierung mittels NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* oder einer Substratgekoppelten Cofaktorregenerierung, bei der der Cofaktor durch die Reaktion von Aceton (25 Vol.%) zu Isopropanol durch die verwendete Alkohol-Dehydrogenase regeneriert wird, wurden stets gleich gute oder bessere Ergebnisse mit der „künstlichen NAD(P)H-Oxidase“ **8** erhalten.

Tabelle 46. Alkohol-Dehydrogenase-katalysierte Synthese der Ketone **31**, **68** und **70** mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

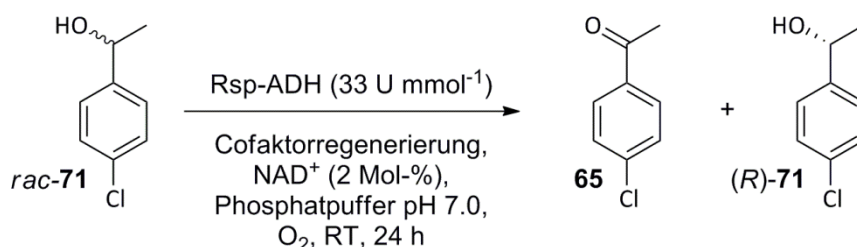
Eintrag	n	Enzym	Cofaktor	produktbezogener Umsatz / %	Ausbeute ^a / % Produkt / Edukt
1	1	Rsp-ADH	NAD ⁺	35	20 / 37
2	1	Lk-ADH	NADP ⁺	26	22 / 60
3	1	ADH evo-200	NAD ⁺	<1	<1 / 80
4	2	Rsp-ADH	NADH	>99	80 / 0
5	2	Lk-ADH	NADP ⁺	>94	89 / 0
6	2	ADH evo-200	NAD ⁺	<1	<1 / 89
7	3	ADH evo-210	NAD ⁺	48	34 / 36
8	3	Rsp-ADH	NADH	75	65 / 22
9	3	Lk-ADH	NADPH	99	73 / <1
10	3	ADH evo-200	NAD ⁺	>99	97 / 0

a) Berechnete Ausbeute entsprechend AAV 4.

Darüber hinaus konnte der „*proof of concept*“ für eine Racematspaltung durch die enantioselektive Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch die „künstliche NAD(P)H-Oxidase“ **8** gezeigt werden (Tabelle 47). In Anwesenheit der Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. und 2 Mol-% FeTSPP (**8**) sowie 2 Mol-% Cofaktor wurde ein Umsatz von 31% und ein ee-Wert von 50% erhalten (Tabelle 47, Eintrag 1). Im Vergleich dazu wurde beim Einsatz einer Substratgekoppelten Cofaktorregenerierung ein produktbezogener Umsatz von 48% ($\pm 4\%$) und ein ee-Wert >99% erhalten (Tabelle 47, Eintrag 2). Bei Verwendung einer NADH-Oxidase aus

Lactobacillus brevis wurde dagegen nur ein produktbezogener Umsatz von 12% und ein ee-Wert von 13% erreicht (Tabelle 47, Eintrag 3).

Tabelle 47. Enzymatische Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit verschiedenen Cofaktorregenerierungssystemen



Eintrag	Cofaktor- regenerierung	Enzym (U mmol ⁻¹)	ee-Wert / %	Umsatz ^a / % ¹ H-NMR / GC
1	FeTSPP (2 Mol-%)	Rsp-ADH (55)	50 ± 7 (R)	31 ± 4 / 32 ± 4
2	Aceton (25 Vol.%)	Rsp-ADH (33)	>99 (R)	48 ± 4 / 49 ± 4
3	NADH-Oxidase ^b	Rsp-ADH (55)	13 ± 7 (R)	13 ± 4 / 12 ± 4

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von **65**; die Bildung von Nebenprodukten wurde nicht beobachtet; b) NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (28 U mmol⁻¹).

Insgesamt bietet die *in-situ*-Cofaktorregenerierung mit FeTSPP (**8**) eine wertvolle Ergänzung zu bestehenden Möglichkeiten der Cofaktorregenerierung. Im direkten Vergleich wurden in dieser Arbeit teilweise bessere Ergebnisse mit der „künstlichen Cofaktorregenerierung“ als mit einer NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* oder einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung erzielt.

Die Cofaktorregenerierung mittels **8** konnte bisher mit sehr guten Ergebnissen in einem pH-Bereich von pH 6.0 – 7.0 durchgeführt werden. Eine Erhöhung der Temperatur oder der Katalysatorkonzentration resultierten in einem Umsatzrückgang. Die bisher niedrigste Cofaktorkonzentration lag bei 0.2 Mol-% wodurch eine *turnover number* (TON-Wert) von 500 erzielt werden konnte. Die *turnover number* der „künstlichen NAD(P)H-Oxidase“ **8** liegt bei den höchsten Umsätzen bei 50. Durch das Recycling von **8** konnte insgesamt nach sieben Cyclen über einen Zeitraum von 83 Tagen eine *total turnover number* (TTN-Wert) von 261 erzielt werden. Dabei konnte das verwendete Eisen(III)-porphyrin **8** über einen Zeitraum

von 28 Tagen fünf Mal eingesetzt werden ohne einen Umsatzrückgang der Oxidation von Cycloheptanol (**67**) in Anwesenheit der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* festzustellen.

Mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde die Kinetik der Oxidation von NADH durch FeTSPP (**8**) in Anwesenheit von Luftsauerstoff verfolgt. Bei Verwendung einer 5 μM FeTSPP-Lösung und einer 125 μM NADH-Lösung bei pH 7.0 wurde mit einer spezifischen Aktivität von 112 U mg^{-1} die größte in dieser Arbeit gemessenen Aktivität der „künstlichen NAD(P)H-Oxidase“ **8** erhalten. Diese Aktivität entspricht einer Umsatzfrequenz von 1.86 s^{-1} . In Abwesenheit von Luftsauerstoff wurde hingegen keine entsprechende Oxidation des Cofaktors beobachtet.

Aufgrund der katalytischen Effizienz und der einfachen Verfügbarkeit von **8** kann diese biomimetische Regenerierung der Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ in Wasser als wertvolle Alternative zu enzymatischen Cofaktorregenerierungen mit NAD(P)H-Oxidasen angesehen werden. Nach aktuellem Kenntnisstand ist das synthetische Metalloporphyrin FeTSPP (**8**) der erste biomimetische Katalysator für die Regenerierung von NAD(P)^+ aus NAD(P)H durch Aktivierung und Reduktion von molekularem Sauerstoff in wässriger Lösung, bei dem kein unvorteilhaftes Wasserstoffperoxid akkumuliert und somit auf den zusätzlichen Einsatz von Katalase verzichtet werden kann. Mit der beschriebenen Methode steht damit eine neuartige Möglichkeit zur Verfügung, enzymatische Oxidationsreaktionen unter *in-situ*-Regenerierung des oxidierten Cofaktors NAD(P)^+ mithilfe eines nichtenzymatischen, synthetischen Katalysators als „künstlichem Enzym“ durchzuführen.

6 Abstract

The synthetic and water-soluble iron(III) porphyrin FeTSPP (**8**, 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-porphinato-iron(III) chloride) was applied as an artificial, biomimetic and water-producing NAD(P)H oxidase in several enzymatic oxidation reactions in water for the *in situ* regeneration of the nicotinamide-cofactors NAD⁺ as well as NADP⁺ by activation and reduction of molecular oxygen. For example, the monosaccharide D-glucose (**1**) was quantitatively oxidized in presence of 2 mol% of the “artificial NAD(P)H Oxidase” **8** by the glucose dehydrogenase from *Bacillus* sp. or by the glucose dehydrogenase from *Thermoplasma acidophilum* while **8** was *in situ* regenerated by (air-)oxygen. In addition to the substrate D-glucose (**1**), it was possible to oxidize quantitatively further monosaccharides such as D-mannose (**62a**) and D-xylose (**62b**) with the glucose dehydrogenase from *Bacillus* sp. in presence of 2 mol% of FeTSPP (**8**). Furthermore, the biomimetic *in-situ*-cofactor-regeneration was also combined with alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidations of the achiral alcohols cyclohexanol (**30**), cycloheptanol (**67**) and cyclooctanol (**69**) by the alcohol dehydrogenases from *Lactobacillus kefir*, *Rhodococcus* sp. and the alcohol dehydrogenase evo-200. Depending on the biocatalyst the alcohols were converted to the corresponding ketones with product related conversions up to >99%. Moreover the proof of concept for a FeTSPP-coupled enzymatic resolution of 1-(4-chlorophenyl)ethanol (*rac*-**71**) by selective oxidation was shown. Applying the alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus* sp., 2 mol% FeTSPP (**8**) and 2 mol% NAD⁺, a conversion of 31% and an enantiomeric excess of 50% was achieved.

The highest specific activity for the oxidation of NADH by FeTSPP (**8**) was 112 U mg⁻¹ at pH 7.0 corresponding to a turn over frequency (TOF) of 1.86 s⁻¹. FeTSPP (**8**) proofed to be very robust and was recycled 5 times over a period of 28 days without any measurable loss of activity resulting in a total turnover number (TTN) of >250. The highest turnover number (TON) for NAD⁺ was 500. The cofactor regeneration with FeTSPP (**8**) resulted in higher product related conversions in some enzymatic oxidations compared to a regeneration with a NADH Oxidase from *Lactobacillus brevis* or a substrate-coupled method applying acetone. Hence, this biomimetic cofactor regeneration is a valuable supplement to established systems.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Chemikalien:

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt von ABCR, Acros Organics, Euticals, Fisher Scientific, Fluka, Merck, Roth und Sigma-Aldrich erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Lösungsmittel MTBE wurde als Hochschulspende von Evonik Degussa zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Lösungsmittel, außer MTBE wurden vor Gebrauch am Rotationsverdampfer destilliert oder wurden von VWR (AnalaR NORMAPUR) bezogen und waren für Reaktionen und Analyse von p.a. Qualität. Deuterierte Lösungsmittel stammten von Deutero. Die verwendeten Porphyrine wurden, sofern nicht anders vermerkt von Triportech erworben.

Enzyme und Cofaktoren:

Die Alkohol-Dehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH) und *Rhodococcus* sp. (Rsp-ADH) wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. Hummel (Forschungszentrum Jülich) entwickelt und freundlicher Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Diese Enzyme sind bei evocatal käuflich erwerblich. Die Alkohol-Dehydrogenasen evo-200 und evo-210 wurden von evocatal bezogen. Die NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* wurde ebenfalls im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. Hummel entwickelt und freundlicher Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. wurde von Amano Enzymes (teilweise als Hochschulspende) bezogen. Die Glucose-Dehydrogenase aus *Thermoplasma acidophilum* wurde von Sigma-Aldrich erworben. Die Cofaktoren NAD(P)H und NAD(P)⁺ wurden von Oriental Yeast bezogen.

Gaschromatographie:

Umsatz- und ee-Wert-Bestimmungen erfolgten an einem GC 2010 von Shimadzu mit einem Auto-injector AOC-20i (Shimadzu) und einer Rt-βDEXm-Säule von Restek. Die Säule weist eine Länge von 30 m und einen Innendurchmesser von 0.25 mm auf.

Methode: Start bei 60 °C und mit 4 °C min⁻¹ auf 200 °C.

NMR-Spektroskopie:

NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden an einem JEOL GX400, JEOL EX400, JEOL Alpha 500, Bruker Avance 300, Bruker Avance 400 und einem Bruker DRX-500 bei Raumtemperatur durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen δ (angegeben in ppm) der ^1H -NMR- und der ^{13}C -NMR-Spektren werden, sofern nicht anders angegeben, in Relation zur normierten chemischen Verschiebung des verwendeten partiell undeuterten Lösungsmittels angegeben (CDCl_3 $\delta = 7.26$ ppm) oder auf einen literaturbekannten Wert bezogen.^[226] Die Spin-Multiplizitäten werden als br (broad), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) angegeben.

UV/Vis-Spektroskopie:

Sofern nicht anders vermerkt, wurden UV/Vis-spektroskopische Messungen an den UV/Vis-Spektrophotometern SPEKOL 1300 der Firma Analytik Jena, Lamda 40 der Firma Perkin-Elmer, V-630 von Jasco und an einem UV-2450 der Firma Shimadzu durchgeführt.

Automatisches Titrationssystem:

Titrationen erfolgten an einem Titrino 702 SM von Metrohm.

7.2 Synthesen, Methoden und spektroskopische Daten

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Produktbezogene Umsatzbestimmung mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie am Beispiel der Oxidation von D-Glucose (**1**)

Entsprechend der AAV 3 wird D-Glucose (**1**) zum Natrium-D-gluconat (**60**) oxidiert. Das Rohprodukt wird in D_2O (700 μL) aufgenommen und ein ^{13}C -NMR-Spektrum (49388 Scans) auf einem Jeol Alpha 500 Spektrometer bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemische Verschiebung wird auf einen literaturbekannten Wert ($\delta(^{13}\text{C})$, 97.0 ppm, Hemiacetal-Kohlenstoffatom der β -D-Glucose (**1**)) bezogen.^[226] Außerdem wird ein ^{13}C -NMR-Spektrum (9800 Scans) einer definierten Mischung aus Edukt **1** und Produkt **60** (12.5 μmol : 237.5 μmol , **1** : **60**, 5 : 95) als Vergleichsprobe auf einem Jeol Alpha 500 Spektrometer bei Raumtemperatur in D_2O (700 μL) gemessen. Die Signale bei 75.2 ppm werden dem Natrium-D-gluconat (**60**) aus der Vergleichsprobe sowie des Rohproduktes zugeordnet und werden auf gleiche Höhen normiert. Beide Spektren werden auf Signale von D-Glucose (**1**) untersucht, um die Detektionsgrenzen und damit den produktbezogenen Umsatz^[192] zu bestimmen. Dies geschieht exemplarisch anhand der Signale bei 76.8 ppm und 77.0 ppm der β -D-Glucose (**1**). Die gemessene Probe des Rohproduktes zeigt im entsprechenden Bereich des ^{13}C -NMR-Spektrums keine Signale von D-Glucose (**1**). Die Vergleichsprobe zeigt deutliche Signale von β -D-Glucose (**1**).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[227]

7.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Quantitative Umsatzbestimmung mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Inverse gated decoupling:

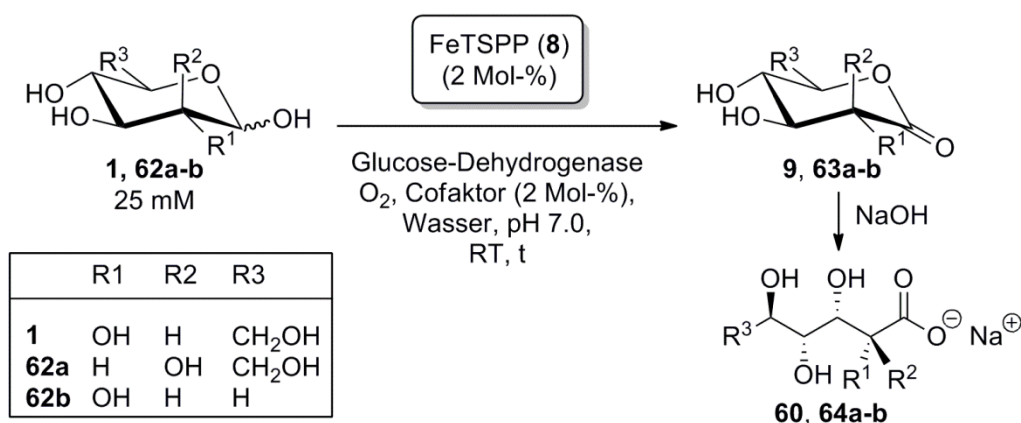
Integrierbare ^{13}C -NMR-Spektren können mit der Methode des „*inverse gated decoupling*“ erhalten werden. Hierzu wird ein Protonen-Breitband-entkoppeltes Spektrum aufgenommen, bei dem der Entkoppler während der ^{13}C -Messimpulse und des FID

eingeschaltet ist, nicht jedoch in der anschließenden Verweildauer. Die Verweildauer sollte so gewählt werden, dass sie länger ist als die Relaxation des „langsamsten“ Kohlenstoff-Kerns. Spin-Gitter-Relaxation und Kern-Overhauser-Effekt haben dann keinen Einfluss mehr auf die Besetzung der Kernniveaus und damit keinen Einfluss auf die Signalintensitäten.^[190]

Protonen-Breitband-Entkopplung:

Zur Umsatzbestimmung einer D-Glucose : D-Gluconat-Mischung (**1** : **60**) wird ein Protonen-Breitband-entkoppeltes ¹³C-NMR-Spektrum aufgenommen. Hierzu werden zunächst die Spin-Gitter-Relaxationszeiten aller Kohlenstoffatome bestimmt. Die Pulswiederholrate wird so gewählt, dass alle zu quantifizierenden Kohlenstoffatome komplett relaxieren können. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit des quartären Kohlenstoffatoms (Carbonyl-Kohlenstoffatom) liegt bei 5.4 Sekunden. Alle anderen Kohlenstoffatome haben Spin-Gitter-Relaxationszeiten von 0.8 – 1.4 Sekunden. Die Pulswiederholrate beträgt 6.6 Sekunden. Somit sind nach dieser Zeit alle nicht-quartären Kohlenstoffatome komplett relaxiert und können quantifiziert werden.^[190]

7.2.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Oxidation von Monosacchariden mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)

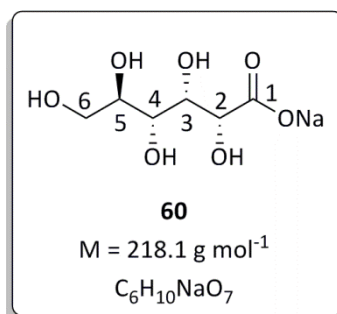


Schema 51. Oxidation von Monosacchariden **1**, **62a - b**

Ein Titrationssystem (Metrohm) wird mit einer wässrigen Lösung (10 mL) des entsprechenden Monosaccharids (0.25 mmol), sowie FeTSPP (**8**, 5 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Monosaccharid), NaCl (0.50 mmol) und Cofaktor NAD(P)H oder NAD(P)⁺

(5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Monosaccharid) befüllt. Anschließend wird der pH-Wert durch Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 7.0 eingestellt und die Reaktion durch Zugabe von GDH (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an Monosaccharid) gestartet. Das Reaktionsgemisch wird 24 – 264 Stunden bei Raumtemperatur und Standarddruck unter Luftatmosphäre als Sauerstoffquelle gerührt. Der pH-Wert wird durch automatische Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 7.0 konstant gehalten. Die NaOH-Zugabe (Menge pro Zeiteinheit) wird vom Titrationsgerät aufgenommen und ermöglicht einen Rückschluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die tatsächliche Reaktionsdauer. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 60 °C entfernt und der Umsatz aus dem Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie (^{13}C -NMR siehe AAV 1 und AAV 2 bzw. ^1H -NMR) bestimmt.

7.2.3.1 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit NAD^+ als Cofaktor



Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät waren die Reaktionen nach 17 – 24 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ^{13}C -NMR-Spektrum)

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O):

δ (ppm) = 63.80 (C6), 72.13 (C5), 72.41 (C4), 73.71 (C3), 75.20 (C2), 179.89 (C1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[227]

7.2.3.2 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit NADH als Cofaktor

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADH (3.5 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät war die Reaktion nach 24 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.3 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit NADP⁺ als Cofaktor

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät war die Reaktion nach 18 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.4 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit GDH aus *Thermoplasma acidophilum*

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADPH (3.7 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Thermoplasma acidophilum* (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$,

120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät war die Reaktion nach 7 Stunden beendet.

Umsatz: ≥97% (kein Edukt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.5 Synthese von Natrium-D-gluconat (**60**) ohne Enzym

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 0% (kein Produkt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.6 Synthese von Natrium-D-gluconat (**60**) ohne Cofaktor

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥30 U mg⁻¹, 120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 0% (kein Produkt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.7 Synthese von Natrium-D-gluconat (**60**) ohne FeTSPP (**8**)

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADH (3.5 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die

Menge an D-Glucose (**1**) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥ 30 U mg⁻¹, 120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 0% (kein Produkt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.8 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) bei pH 6.0

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 6.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥ 30 U mg⁻¹, 120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei Raumtemperatur und Standarddruck unter Luftatmosphäre als Sauerstoffquelle gerührt. Der pH-Wert wird durch automatische Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 6.0 konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 60 °C entfernt und der Umsatz aus dem Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Laut Titrationsgerät war die Reaktion nach 24 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.9 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) bei pH 8.0

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 8.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥ 30 U mg⁻¹, U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet. Das Reaktionsgemisch wird 72 Stunden bei

Raumtemperatur und Standarddruck unter Luftatmosphäre als Sauerstoffquelle gerührt. Der pH-Wert wird durch automatische Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 8.0 konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 60 °C entfernt und der Umsatz aus dem Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Laut Titrationsgerät ist die Reaktion nach 48 Stunden zum Erliegen gekommen.

Umsatz: 30% ($\pm 10\%$) (^{13}C -NMR-Spektrum).

7.2.3.10 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) bei 35 °C

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet. Das Reaktionsgemisch wird 112 Stunden bei 35 °C und Standarddruck unter Luftatmosphäre als Sauerstoffquelle gerührt. Der pH-Wert wird durch automatische Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 7.0 konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 60 °C entfernt und der Umsatz aus dem Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Laut Titrationsgerät ist die Reaktion nach 11 Stunden zum Erliegen gekommen.

Umsatz: 25% ($\pm 10\%$) (^{13}C -NMR-Spektrum).

7.2.3.11 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) bei 50 °C

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet. Das Reaktionsgemisch wird 48 Stunden

bei 50 °C und Standarddruck unter Luftatmosphäre als Sauerstoffquelle gerührt. Der pH-Wert wird durch automatische Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 7.0 konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 60 °C entfernt und der Umsatz aus dem Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie bestimmt.

Umsatz: 0% (¹³C-NMR-Spektrum inverse gated).

7.2.3.12 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit doppelter Enzymmenge (240 U mmol⁻¹)

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (2 mg, ≥30 U mg⁻¹, 240 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät war die Reaktion nach 11 Stunden beendet.

Umsatz: ≥97% (kein Edukt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.13 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit verminderter Enzymmenge (12 U mmol⁻¹)

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (0.1 mg, ≥30 U mg⁻¹, 12 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Die Reaktion war nach 17 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ^{13}C -NMR-Spektrum).

7.2.3.14 Synthese Natrium-D-gluconat (60) mit verminderter Enzymmenge (4 U mmol^{-1})

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (33.3 μg , $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 4 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Die Reaktion war nach 22 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ^{13}C -NMR-Spektrum).

7.2.3.15 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit verminderter Enzymmenge (1.2 U mmol^{-1})

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (10 μg , $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 1.2 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 66 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Die Reaktion war nach 61 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ^{13}C -NMR-Spektrum).

7.2.3.16 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit verminderter Cofaktormenge (0.2 Mol-%)

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD^+ (0.3 mg, 0.5 μmol , 0.2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät war die Reaktion nach 24 Stunden beendet.

Umsatz: $\geq 97\%$ (kein Edukt im ^{13}C -NMR-Spektrum).

7.2.3.17 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit verminderter FeTSPP-Menge (1 Mol-%)

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 2.6 mg, 2.5 μmol , 1 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und dest. H_2O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, $\geq 30 \text{ U mg}^{-1}$, 120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät waren die Reaktionen nach 24 Stunden beendet.

Umsatz: 47% ($\pm 10\%$) (^{13}C -NMR-Spektrum).

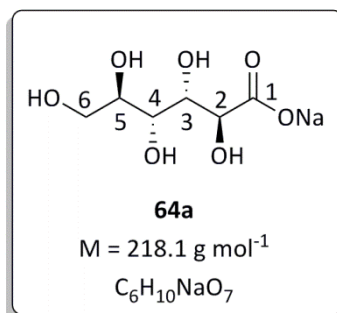
7.2.3.18 Synthese von Natrium-D-gluconat (60) mit verminderter FeTSPP-Menge (0.1 Mol-%)

Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 0.5 mg, 0.5 μmol , 0.2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die

Menge an D-Glucose (**1**) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥ 30 U mg⁻¹, 120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Laut Titrationsgerät waren die Reaktionen nach 24 Stunden beendet.

Umsatz: 4% (¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.3.19 Synthese von Natrium-D-mannonat (**64a**)



Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Mannose (**62a**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Mannose (**62a**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Mannose (**62a**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (1 mg, ≥ 30 U mg⁻¹, 120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Mannose (**62a**)) gestartet. Nach 6 Tagen wurde die Hälfte des Reaktionsgemisches weitere 5 Tage in einem Kolben ohne Titrationssystem (Metrohm) gerührt. Entsprechend der AAV 3 wurde die Aufarbeitung durchgeführt. Es wurde ein ¹³C-NMR-Spektrum (*inverse gated*, 12288 Scans, 125 MHz) gemessen.

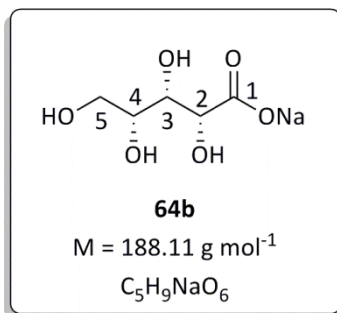
Umsatz: $\geq 95\%$.

¹³C-NMR (*inverse gated*, 125 MHz, D₂O):

δ (ppm) = 63.90 (C6), 71.48 (C4), 71.53 (C3), 71.91 (C2), 74.73 (C5), 180.12 (C1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[228]

7.2.3.20 Synthese von Natrium-D-xylonat (**64b**)



Entsprechend der AAV 3 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Xylose (**62b**, 45.0 mg, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Xylose (**62b**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Xylose (**62b**)) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird

die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (2.3 mg, ≥30 U mg⁻¹, 280 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Xylose (**62b**)) gestartet. Entsprechend der AAV 3 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Es wurde ein ¹³C-NMR-Spektrum (9924 Scans, 100 MHz) und ein ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) gemessen. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt im Gegensatz zu einer Vergleichsprobe (D-Xylonat : D-Xylose; 98 : 2) kein Edukt. Im ¹H-NMR-Spektrum ist kein Edukt erkennbar.

Umsatz: ≥98%.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

δ (ppm) = 3.63 – 3.99 (4H, m, H-C₃ – H-C₅), 4.12 (1H, m, H-C₂).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ (ppm) = 63.85 (C₅), 73.61 (C₃), 74.07 (C₂), 74.69 (C₄), 180.47 (C₁).

Die spektroskopischen Daten (¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten) stimmen mit den Daten einer käuflich erwerblichen Probe von reinem Calcium-D-Xylonat überein.

7.2.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Bestimmung der berechneten Ausbeute mittels Standard am Beispiel der Oxidation von Cyclooctanol (**69**)

Die Umsetzung von Cyclooctanol (**69**) (0.244 mmol) zu Cyclooctanon (**70**) erfolgt entsprechend der AAV 5. Zur Berechnung der Ausbeute (im Gegensatz zur Bestimmung der Ausbeute durch Auswaage entsprechend einer isolierten Ausbeute) wird Pyridazin

(0.253 mmol) als Standard direkt in ein NMR-Röhrchen eingewogen.^[229] Daraufhin wird das gesamte Rohprodukt der Umsetzung ins NMR-Röhrchen gegeben. Das Lösungsmittel CDCl_3 (800 μL) wird verwendet um die Reste des Rohproduktes aufzunehmen und wird anschließend ebenfalls in das NMR-Röhrchen gegeben. Die vier Protonen des Pyridazins zeigen im ^1H -NMR-Spektrum zwei isolierte Signale (7.44 ppm und 9.14 ppm) gleicher Intensitäten (1000.00 bzw. 999.97). Durch Normierung ergibt sich für das Pyridazin eine Signalintensität von 500.0 pro Proton. Die eingewogene Menge des Standards (0.253 mmol) entspricht demnach einer Intensität von 500.0 pro Proton. Aus den entsprechenden normierten Signalintensitäten kann nun mittels Dreisatz die Menge jeder Substanz im Spektrum berechnet werden. Das isolierte Signal des Cyclooctanols (**69**) bei 3.78 ppm entspricht einem Proton und besitzt eine Signalintensität von 3.42.

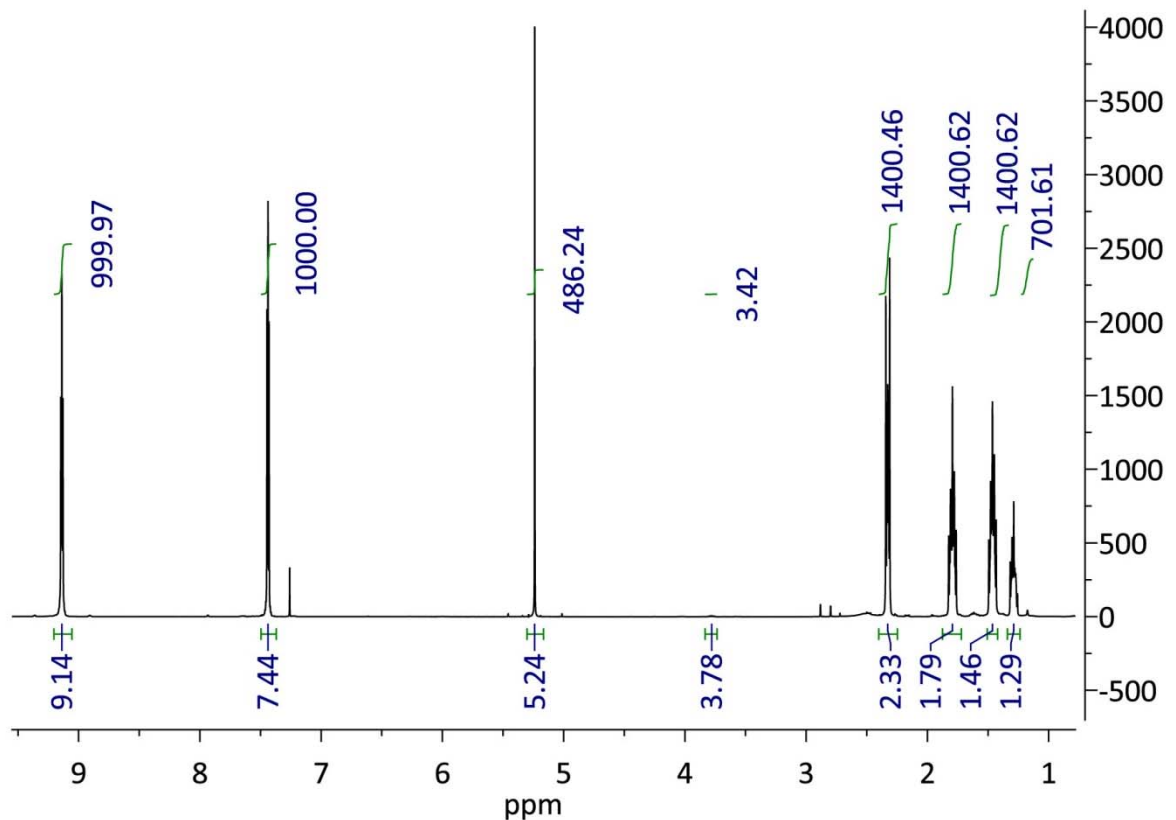
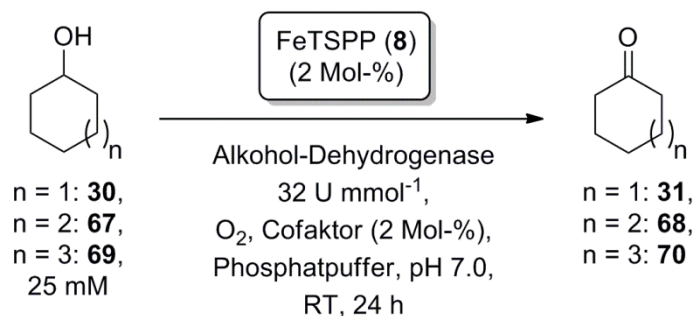


Abbildung 22. NMR-Spektrum der Oxidation von Cyclooctanol (**69**) zu Cyclooctanon (**70**)

Daraus errechnet sich eine Menge von 1.73 μmol (<1% der eingesetzten Menge). Cyclooctanon (**70**) zeigt bei 2.33 ppm ein isoliertes Signal mit einer Intensität von 1400.46 für vier Protonen, entsprechend einer Signalintensität von 350.12 pro Proton. Daraus errechnet sich für das Keton eine Menge von 0.18 mmol und eine berechnete Ausbeute von 73%.

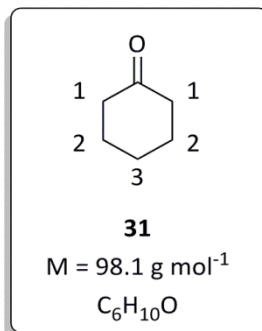
7.2.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Oxidation achiraler Alkohole mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)



Schema 52. Oxidation achiraler Alkohole

In einen 25-mL Rundkolben gibt man den entsprechenden Alkohol (0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD(P)⁺ oder NAD(P)H (5 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe einer geeigneten ADH (32 U mmol⁻¹ Substrat). Wird die ADH aus *Lactobacillus kefir* verwendet, gibt man zusätzlich MgCl₂ (1 mM) zum Reaktionsgemisch. Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt, wobei die vorhandene Luft als Sauerstoffquelle dient. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 900 mbar und 40 °C entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ausbeute (berechnete Ausbeute) wird entsprechend der AAV 4 über einen internen Standard aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes bestimmt.

7.2.5.1 Synthese von Cyclohexanon (31) mit ADH evo-200



Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 26.8 mg, 0.268 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol⁻¹).

Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.8 mg, 0.259 mmol) verwendet.

Umsatz: <1%

Ausbeute: <1% Produkt, 80% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) = 1.59 – 1.70 (2H, m, H-C3), 1.74 – 1.85 (4H, m, H-C2), 2.16 – 2.28 (4H, t, H-C1, ³J = 6.8 Hz).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[227]

7.2.5.2 Synthese von Cyclohexanon (31) mit Rsp-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 21.0 mg, 0.257 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.7 mg, 0.258 mmol) verwendet.

Umsatz: 35%

Ausbeute: 20% Produkt, 37% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.3 Synthese von Cyclohexanon (31) mit Lk-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 20.5 mg, 0.204 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.1 mg, 0.264 mmol) verwendet.

Umsatz: 26%

Ausbeute: 22% Produkt, 61% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.4 Synthese von Cyclohexanon (31) ohne Enzym

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 27.3 mg, 0.273 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.2 mg, 0.264 mmol) verwendet.

Umsatz: 1%

Ausbeute: <1% Produkt, 80% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.5 Synthese von Cyclohexanon (31) ohne Cofaktor

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 28.9 mg, 0.288 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die

Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.2 mg, 0.252 mmol) verwendet.

Umsatz: <1%

Ausbeute: <1% Produkt, 65% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.6 Synthese von Cyclohexanon (**31**) ohne FeTSPP (**8**)

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 29.5 mg, 0.204 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.1 mg, 0.251 mmol) verwendet.

Umsatz: <1%

Ausbeute: <1% Produkt, 81% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.7 Synthese von Cyclohexanon (**31**) mit Aceton zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 22.9 mg, 0.229 mmol) und Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) in einen 25-mL Rundkolben. Statt FeTSPP (**8**) wird zur Cofaktorregenerierung Aceton (2.5 mL) verwendet. Außerdem wird Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in den Kolben gegeben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.4 mg, 0.255 mmol) verwendet.

Umsatz: 16%

Ausbeute: 16% Produkt, 83% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.8 Synthese von Cyclohexanon (31) mit NADH-Oxidase zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 25.9 mg, 0.259 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Statt FeTSPP (**8**) gibt man das Enzym NADH-Oxidase (32 U mmol⁻¹) zur Cofaktorregenerierung in den Kolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.0 mg, 0.262 mmol) verwendet.

Umsatz: 36%

Ausbeute: 32% Produkt, 56% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

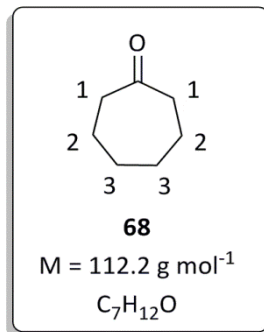
7.2.5.9 Synthese von Cyclohexanon (31) mit Rsp-ADH bei pH 8.0

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclohexanol (**30**, 24.9 mg, 0.248 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 8.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.1 mg, 0.258 mmol) verwendet.

Umsatz: 35%

Ausbeute: 22% Produkt, 41% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.10 Synthese von Cycloheptanon (**68**) mit ADH evo-200



Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 28.4 mg, 0.247 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol⁻¹).

Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.8 mg, 0.259 mmol) verwendet.

Umsatz: <1%

Ausbeute: <1% Produkt, 89% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) = 1.51 – 1.66 (8H, m, H-C**2+3**), 2.36 – 2.42 (4H, m, H-C**1**).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[227]

7.2.5.11 Synthese von Cycloheptanon (**68**) mit Rsp-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.0 mg, 0.254 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.5 mg, 0.281 mmol) verwendet.

Umsatz: >99% (kein Edukt im ¹H-NMR-Spektrum)

Ausbeute: 80% (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.12 Synthese von Cycloheptanon (68) mit Lk-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 30.8 mg, 0.270 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.6 mg, 0.282 mmol) verwendet.

Umsatz: >99% (kein Edukt im ¹H-NMR-Spektrum)

Ausbeute: 89% (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.13 Synthese von Cycloheptanon (68) ohne Enzym

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.8 mg, 0.261 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.4 mg, 0.254 mmol) verwendet.

Umsatz: 0% (kein Produkt im ¹H-NMR-Spektrum)

Ausbeute: 0% Produkt, 75% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.14 Synthese von Cycloheptanon (68) ohne Cofaktor mittels Rsp-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 33.0 mg, 0.289 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (23.2 mg, 0.284 mmol) verwendet.

Umsatz: 12%

Ausbeute: 11% Produkt, 84% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.15 Synthese von Cycloheptanon (68) ohne Cofaktor mittels Lk-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 33.9 mg, 0.297 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.1 mg, 0.259 mmol) verwendet.

Umsatz: 0%

Ausbeute: 0% Produkt, 78% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.16 Synthese von Cycloheptanon (68) ohne FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 33.6 mg, 0.294 mmol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.3 mg, 0.261 mmol) verwendet.

Umsatz: 2%

Ausbeute: 1% Produkt, 60% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.17 Synthese von Cycloheptanon (68) mit Aceton zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 33.2 mg, 0.291 mmol) und Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) in einen 25-mL Rundkolben. Statt FeTSPP (**8**) wird zur Cofaktorregenerierung Aceton (2.5 mL) verwendet. Außerdem wird Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in den Kolben gegeben. Gestartet

wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (18.1 mg, 0.226 mmol) verwendet.

Umsatz: 14%

Ausbeute: 13% Produkt, 77% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.18 Synthese von Cycloheptanon (68) mit NADH-Oxidase zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 38.2 mg, 0.334 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Statt FeTSPP (**8**) gibt man das Enzym NADH-Oxidase (32 U mmol⁻¹) zur Cofaktorregenerierung in den Kolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.6 mg, 0.257 mmol) verwendet.

Umsatz: 92%

Ausbeute: 70% Produkt, 6% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.19 Synthese von Cycloheptanon (68) bei pH 6.0

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.0 mg, 0.254 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 6.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 32%

Ausbeute: nicht bestimmt.

7.2.5.20 Synthese von Cycloheptanon (68) bei pH 8.0

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.0 mg, 0.254 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 8.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 39%

Ausbeute: nicht bestimmt.

7.2.5.21 Synthese von Cycloheptanon (68) bei pH 9.0

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.0 mg, 0.254 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und TRIS-Puffer (pH 9.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 8%

Ausbeute: nicht bestimmt.

7.2.5.22 Synthese von Cycloheptanon (68): Substratverdopplung

Dieser Versuch wird entsprechend der AAV 5 durchgeführt, jedoch wird die Substrat - sowie die Enzymkonzentration verdoppelt: in einen 25-mL Rundkolben gibt man Cycloheptanol (**67**, 57.0 mg, 0.499 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 1 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 1 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die

Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (30.1 mg, 0.376 mmol) verwendet.

Umsatz: 68%

Ausbeute: 52% Produkt, 24% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.23 Synthese von Cycloheptanon (68): Scale-up

Dieser Versuch wird entsprechend der AAV 5 durchgeführt, jedoch werden die eingesetzten Mengen aller Substanzen vervierzigfacht: in einen 1-L Rundkolben gibt man Cycloheptanol (**67**, 1.14 g, 9.98 mmol), FeTSP (**8**, 204 mg, 200 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (156 mg, 200 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (40.0 mg, 400 μ mol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 400 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (8 U mmol⁻¹), entsprechend einer verzehnfachung bezüglich der AAV 5. Die Reaktionsbedingungen werden wie in der AAV 5 beschrieben, eingestellt. Bei der Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 350 mL, 1 x 250 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 900 mbar und 40 °C entfernt. Das erhaltene Rohprodukt (samt Lösungsmittelresten) wird in einem Maßkolben mit D₂O auf 25 mL aufgefüllt. Der produktbezogene Umsatz wird aus genau 1.0 mL dieser Lösung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ausbeute (berechnete Ausbeute) wird entsprechend der AAV 4 über einen internen Standard aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes bestimmt. Als interner Standard wurde Pyridazin (22.4 mg, 0.279 mmol) verwendet.

Umsatz: 96%

Ausbeute: 93% Produkt, 4% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.24 Synthese von Cycloheptanon (68) unter Sauerstoffatmosphäre mit 5 Stunden Reaktionszeit

Zunächst wird Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen mit Sauerstoff befüllten 25-mL Rundkolben gegeben und 30 Minuten mit Sauerstoff über eine Kanüle „durchblubbert“. Entsprechend der AAV 5 gibt man in diesen Kolben Cycloheptanol (**67**, 32.2 mg, 0.282 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und MgCl₂ (1.0 mg, 10 μ mol). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Während der Reaktion wird eine Sauerstoffatmosphäre im Reaktionskolben durch einen Sauerstoffballon erzeugt. Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt. Die Aufarbeitung wird ebenfalls entsprechend der AAV 5 durchgeführt, jedoch wird die Reaktionszeit auf 5 Stunden verkürzt. Als interner Standard wurde Pyridazin (31.6 mg, 0.394 mmol) verwendet.

Umsatz: 50%

Ausbeute: 41% Produkt, 40% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

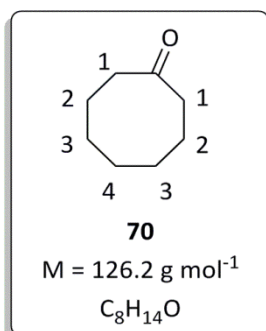
7.2.5.25 Synthese von Cycloheptanon (68) mit 5 Stunden Reaktionszeit

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.6 mg, 0.259 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μ mol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt, jedoch wird die Reaktionszeit auf 5 Stunden verkürzt. Als interner Standard wurde Pyridazin (30.4 mg, 0.380 mmol) verwendet.

Umsatz: 48%

Ausbeute: 43% Produkt, 47% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.26 Synthese von Cyclooctanon (70) mit ADH evo-200



Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 29.0 mg, 0.226 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol⁻¹).

Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (17.7 mg, 0.221 mmol) verwendet.

Umsatz: >99% (kein Edukt im ¹H-NMR-Spektrum)

Ausbeute: 97% (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) = 1.32 – 1.38 (2H, m, H-C4), 1.49 – 1.56 (4H, m, H-C3), 1.82 – 1.89 (4H, m, H-C2), 2.36 – 2.42 (4H, m, H-C1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[227,230-231]

7.2.5.27 Synthese von Cyclooctanon (70) mit Rsp-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 28.9 mg, 0.226 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.1 mg, 0.251 mmol) verwendet.

Umsatz: 75%

Ausbeute: 65% Produkt, 22% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.28 Synthese von Cyclooctanon (70) mit Lk-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 31.3 mg, 0.244 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADPH (3.7 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.7 mg, 0.258 mmol) verwendet.

Umsatz: 99%

Ausbeute: 73% Produkt, <1% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.29 Synthese von Cyclooctanon (70) mit HL-ADH

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 32.5 mg, 0.244 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von HL-ADH (ADH 210 von evocatal GmbH, $>0.5 \text{ U mg}^{-1}$, 16 mg). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt, jedoch wird das Reaktionsgemisch 66 Stunden gerührt. Die Aufarbeitung wird entsprechend der AAV 5 durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.1 mg, 0.251 mmol) verwendet.

Umsatz: 48%

Ausbeute: 34% Produkt, 36% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.30 Synthese von Cyclooctanon (70) ohne Enzym

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 31.2 mg, 0.251 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM,

10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 0% (kein Produkt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum)

Ausbeute: nicht bestimmt.

7.2.5.31 Synthese von Cyclooctanon (70) ohne Cofaktor

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 32.3 mg, 0.252 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 0% (kein Produkt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum)

Ausbeute: nicht bestimmt.

7.2.5.32 Synthese von Cyclooctanon (70) ohne FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 32.9 mg, 0.288 mmol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 4%

Ausbeute: nicht bestimmt.

7.2.5.33 Synthese von Cyclooctanon (70) mit Aceton zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 34.7 mg, 0.271 mmol) und Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) in einen 25-mL Rundkolben. Statt FeTSPP (**8**) wird zur Cofaktorregenerierung Aceton (2.5 mL) verwendet.

Außerdem wird Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in den Kolben gegeben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.7 mg, 0.259 mmol) verwendet.

Umsatz: 62%

Ausbeute: 55% Produkt, 34% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.5.34 Synthese von Cyclooctanon (70) mit NADH-Oxidase zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cyclooctanol (**69**, 34.6 mg, 0.270 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Statt FeTSPP (**8**) gibt man das Enzym NADH-Oxidase (32 U mmol⁻¹) zur Cofaktorregenerierung in den Kolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (19.9 mg, 0.249 mmol) verwendet.

Umsatz: 99%

Ausbeute: 83% Produkt, 1% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Recycling von FeTSPP (**8**)

In einen 25-mL Rundkolben gibt man Cycloheptanol (**67**, 0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ oder NADPH (5 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1 mM) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹ Substrat). Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt, wobei die vorhandene Luft als Sauerstoffquelle dient. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird für das Recycling gesondert aufgehoben. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend wird das Lösungsmittel am

Rotationsverdampfer bei 900 mbar und 40 °C entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ausbeute (berechnete Ausbeute) wird entsprechend der AAV 4 über einen internen Standard aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes bestimmt.

Für das Recycling des FeTSPP (**8**) werden Lösungsmittelreste der wässrigen Phase am Rotationsverdampfer bei 500 mbar und 40 °C entfernt. Gegebenenfalls wird die wässrige Phase mit H_2O dest. auf 10 mL aufgefüllt. Für den Recycling-Ansatz gibt man nun Cycloheptanol (**67**, 0.25 mmol), Cofaktor NADP^+ oder NADPH (5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und MgCl_2 (1 mM) sowie die wässrige Phase aus dem vorherigen Ansatz in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1} Substrat). Das Einstellen der Reaktionsbedingungen sowie die Aufarbeitung und die Analytik werden entsprechend der obigen Vorgehensweise durchgeführt. Die wässrige Phase wird gegebenenfalls erneut aufgehoben und für den nächsten Recycling-Ansatz aufbereitet.

7.2.6.1 Synthese von Cycloheptanon (**68**)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.7 mg, 0.260 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (22.3 mg, 0.278 mmol) verwendet. Die wässrige Phase wird für den nächsten Versuch aufbewahrt.

Umsatz: 95%

Ausbeute: 85% Produkt, 5% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6.2 1. Recycling: Synthese von Cycloheptanon (68) mittels wiederverwendetem FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 29.0 mg, 0.254 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 µmol) und die (6 Tage bei Raumtemperatur gelagerte) wässrige Phase (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) aus 7.2.6.1 in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.1 mg, 0.264 mmol) verwendet. Die wässrige Phase wird für den nächsten Versuch aufbewahrt.

Umsatz: 91%

Ausbeute: 90% Produkt, 8% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6.3 2. Recycling: Synthese von Cycloheptanon (68) mittels wiederverwendetem FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 30.3 mg, 0.265 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 µmol) und die (inzwischen insgesamt 13 Tage bei Raumtemperatur gelagerte) wässrige Phase (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) aus 7.2.6.2 in einen 25-mL Rundkolben.

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (24.1 mg, 0.300 mmol) verwendet. Die wässrige Phase wird für den nächsten Versuch aufbewahrt.

Umsatz: >99% (kein Edukt im ¹H-NMR-Spektrum)

Ausbeute: 94% Produkt, 0% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6.4 3. Recycling: Synthese von Cycloheptanon (68) mittels wiederverwendetem FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 28.0 mg, 0.245 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 µmol) und die (inzwischen insgesamt 20 Tage bei Raumtemperatur gelagerte) wässrige Phase (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) aus 7.2.6.3 in einen 25-mL Rundkolben.

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.4 mg, 0.268 mmol) verwendet. Die wässrige Phase wird für den nächsten Versuch aufbewahrt.

Umsatz: 99%

Ausbeute: 99% Produkt, <1% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6.5 4. Recycling: Synthese von Cycloheptanon (68) mittels wiederverwendetem FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 30.1 mg, 0.264 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 µmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 µmol) und die (inzwischen insgesamt 27 Tage bei Raumtemperatur gelagerte) wässrige Phase (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) aus 7.2.6.4 in einen 25-mL Rundkolben.

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.1 mg, 0.263 mmol) verwendet. Die wässrige Phase wird für den nächsten Versuch aufbewahrt.

Umsatz: >99% (kein Edukt im ¹H-NMR-Spektrum)

Ausbeute: 84% Produkt, <1% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6.6 5. Recycling: Synthese von Cycloheptanon (68) mittels wiederverwendetem FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 30.9 mg, 0.270 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μmol) und die (inzwischen insgesamt 56 Tage (8 Wochen) bei Raumtemperatur gelagerte) wässrige Phase (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) aus 7.2.6.5 in einen 25-mL Rundkolben.

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.9 mg, 0.273 mmol) verwendet. Die wässrige Phase wird für den nächsten Versuch aufbewahrt.

Umsatz: 17%

Ausbeute: 15% Produkt, 75% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.6.7 6. Recycling: Synthese von Cycloheptanon (68) mittels wiederverwendetem FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 6 gibt man Cycloheptanol (**67**, 27.7 mg, 0.243 mmol), Cofaktor NADPH (3.7 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μmol) und die (inzwischen insgesamt 83 Tage (fast 12 Wochen) bei Raumtemperatur gelagerte) wässrige Phase (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) aus 7.2.6.5 in einen 25-mL Rundkolben.

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.9 mg, 0.261 mmol) verwendet.

Umsatz: 4%

Ausbeute: 3% Produkt, 88% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Oxidation achiraler Alkohole mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**)

In einen 25-mL Rundkolben gibt man den entsprechenden Alkohol (0.25 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**, 5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD(P)⁺ oder NAD(P)H (5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe einer geeigneten ADH (32 U mmol^{-1} Substrat). Wird die ADH aus *Lactobacillus kefir* verwendet, gibt man zusätzlich MgCl_2 (1 mM) zum Reaktionsgemisch. Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt, wobei die vorhandene Luft als Sauerstoffquelle dient. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 900 mbar und 40 °C entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ausbeute (berechnete Ausbeute) wird entsprechend der AAV 4 über einen internen Standard aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes bestimmt.

7.2.7.1 Synthese von Cycloheptanon (**68**) mit Rsp-ADH

Entsprechend der AAV 7 gibt man Cycloheptanol (**67**, 39.1 mg, 0.342 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**, 4.6 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.5 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.0 mg, 0.245 mmol) verwendet.

Umsatz: 11%

Ausbeute: 9% Produkt, 76% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.7.2 Synthese von Cycloheptanon (68) mit Lk-ADH und NADPH

Entsprechend der AAV 7 gibt man Cycloheptanol (**67**, 27.4 mg, 0.240 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**, 4.6 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADPH (3.7 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.5 mg, 0.251 mmol) verwendet.

Umsatz: 0% (kein Produkt im ^1H -NMR-Spektrum)

Ausbeute: 0% Produkt, 87% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.7.3 Synthese von Cycloheptanon (68) ohne Enzymzugabe

Entsprechend der AAV 7 gibt man Cycloheptanol (**67**, 33.8 mg, 0.296 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**, 4.6 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (19.9 mg, 0.243 mmol) verwendet.

Umsatz: 0%.

Ausbeute: 0% Produkt, 94% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.7.4 Synthese von Cycloheptanon (68) ohne Fe(III)-porphyrin (75)

Entsprechend der AAV 5 gibt man Cycloheptanol (**67**, 31.3 mg, 0.274 mmol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 5 werden die Reaktionsbedingungen

eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (20.4 mg, 0.250 mmol) verwendet.

Umsatz: 10%

Ausbeute: 6% Produkt, 57% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.7.5 Synthese von Cyclooctanon (70) mit ADH evo-200

Entsprechend der AAV 7 gibt man Cyclooctanol (**69**, 31.1 mg, 0.242 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-isobutyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid (**75**, 4.6 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 6 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.2 mg, 0.259 mmol) verwendet.

Umsatz: 2%

Ausbeute: 2% Produkt, 78% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV 8): Oxidation von Cyclooctanol (**69**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-21,23H-porphyrin (**78**)

In einen 25-mL Rundkolben gibt man Cyclooctanol (**69**) (0.25 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-21,23H-porphyrin (**78**, 5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1} Substrat). Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt, wobei die vorhandene Luft als Sauerstoffquelle dient. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 900 mbar und 40 °C

entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt.

7.2.8.1 Synthese von Cyclooctanon (70) mit ADH evo-200

Entsprechend der AAV 8 gibt man Cyclooctanol (**69**, 31.6 mg, 0.246 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-21,23H-porphyrin (**78**, 4.7 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 8 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 2%.

7.2.9 Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV 9): Oxidation von Cyclooctanol (**69**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Pd(II) (**77**)

In einen 25-mL Rundkolben gibt man Cyclooctanol (**69**) (0.25 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Pd(II) (**77**, 5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1} Substrat). Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt, wobei die vorhandene Luft als Sauerstoffquelle dient. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 900 mbar und 40 °C entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt.

7.2.9.1 Synthese von Cyclooctanon (70) mit ADH evo-200

Entsprechend der AAV 9 gibt man Cyclooctanol (**69**, 31.1 mg, 0.242 mmol), 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Pd(II) (**77**, 5.2 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 9 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 2%.

7.2.10 Allgemeine Arbeitsvorschrift 10 (AAV 10): Oxidation von D-Glucose (**1**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch MnTSPP (**76**)

Ein Titrationssystem (Metrohm) wird mit einer wässrigen Lösung (10 mL) von D-Glucose (**1**) (0.25 mmol), NaCl (0.50 mmol), MnTSPP (**76**, 5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) und Cofaktor NADP^+ (5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) befüllt. Anschließend wird der pH-Wert durch Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 7.0 eingestellt und die Reaktion durch Zugabe von GDH (120 U mmol^{-1} bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei Raumtemperatur und Standarddruck unter Luftatmosphäre als Sauerstoffquelle gerührt. Der pH-Wert wird durch automatische Zugabe von NaOH-Lösung (0.2 M) auf pH 7.0 konstant gehalten. Die NaOH-Zugabe (Menge pro Zeiteinheit) wird vom Titrationsgerät aufgenommen und ermöglicht einen Rückschluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die tatsächliche Reaktionsdauer. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 60 °C entfernt und der Umsatz aus dem Rohprodukt mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie entsprechend AAV 2 bestimmt.

7.2.10.1 Synthese von Natrium-D-gluconat (**60**)

Entsprechend der AAV 10 wird ein Titrationssystem (Metrohm) mit D-Glucose (**1**, 45.0 mg, 0.25 mmol), MnTSPP (**76**, 5.2 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)), NaCl (29.2 mg, 0.50 mmol), NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf

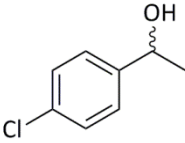
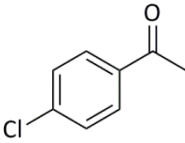
die Menge an D-Glucose (**1**) und dest. H₂O (10 mL) befüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf pH 7.0 wird die Reaktion durch Zugabe von GDH aus *Bacillus* sp. (120 U mmol⁻¹ bezogen auf die Menge an D-Glucose (**1**)) gestartet und 24 Stunden gerührt. Entsprechend der AAV 10 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 0% (kein Produkt im ¹³C-NMR-Spektrum).

7.2.11 Allgemeine Arbeitsvorschrift 11 (AAV 11): Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler Gaschromatographie

Zur Etablierung einer Analytik mittels Gaschromatographie wird zunächst eine Vergleichsprobe von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) : *p*-Chloracetophenon (**65**) (48 : 52) mittels Gaschromatographie sowie mittels ¹H-NMR-Spektroskopie gemessen. Hierzu wird *rac*-**71** (125 μmol, 19.61 mg) und **65** (136 μmol, 21.09 mg) in ein NMR-Röhrchen (mit 700 μL Aceton-d₆) eingewogen und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und anschließend mittels Gaschromatographie gemessen.

Tabelle 48. Eingewogenes und gemessenes Verhältnis und ee-Wert der Vergleichsprobe

 <i>rac</i> - 71 125 μmol	 65 136 μmol		
Verhältnis <i>rac</i> - 71 : 65			ee-Wert /
eingewogen	¹ H-NMR	GC	%
48 : 52	(40 : 50) ±1	51 : 49	6

Der angegebene Fehler der ¹H-NMR-Spektroskopie ergibt sich durch eine leichte Abweichung einzelner normierter Integrationsflächen im ¹H-NMR-Spektrum. Das Gaschromatogramm der Vergleichsprobe zeigt das Signal von *p*-Chloracetophenon (**65**) bei einer Retentionszeit von 17.759 Minuten. Die beiden Enantiomere (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol ((*R*)-**71**) und (*S*)-*p*-Chlorphenyl-ethanol ((*S*)-**71**) werden bei

Retentionszeiten von 20.628 und 20.921 Minuten detektiert. Alle übrigen Signale sind Verunreinigungen der eingewogenen Verbindungen **65** und *rac-71*.

Aufgrund der unvollständigen Trennung der Enantiomere ist keine genaue Messung des ee-Wertes möglich. Deswegen wird die Genauigkeit der Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler Gaschromatographie in einer Versuchsreihe für verschiedene simulierte ee-Werte bestimmt (Tabellen 49 – 51). Um Wägefehler zu minimieren, werden alle Lösungen über Verdünnungsreihen hergestellt. Außerdem wurden die Ergebnisse durch eine zweite Messreihe mit neu angesetzten Lösungen wiederholt.

Zunächst werden racemische Mischungen aus kommerziell erworbenem und enantiomerenreinem (*S*)-*p*-Chlorphenylethanol (*(S)*-**71**) und (*R*)-*p*-Chlorphenylethanol (*(R)*-**71**) (*(S)*-**71** : (*R*)-**71**, 1 : 1) hergestellt und mittels GC gemessen (Tabelle 49, Einträge 1 – 5). Hierbei werden ee-Werte zwischen 2.4 und 6.4% erhalten. Der Fehler für diesen Bereich wird im Folgenden mit 7% angegeben.

Tabelle 49. Bestimmung des Fehlers der ee-Wert-Messung bei racemischen Gemischen

Eintrag	ee-Wert / % eingewogen	ee-Wert / % GC	Abweichung
1	0.0	2.4 (<i>S</i>)	2.4
2	0.0	2.5 (<i>S</i>)	2.5
3	0.0	6.4 (<i>S</i>)	6.4
4 ^a	0.0	1.8 (<i>S</i>)	1.8
5 ^a	0.0	5.0 (<i>S</i>)	5.0

a) Wiederholungsversuch

Anschließend werden simulierte ee-Werte von 80% (*(S)* und (*R*)) eingewogen und gemessen (Tabelle 50, Einträge 1 – 2). Hier liegt der Fehler bei 0.0 – 1.3%. Der simulierte ee-Wert von 98% (*(S)* und (*R*)) wird mit einer Abweichung von 0.2 – 1.1% gemessen (Tabelle 50, Einträge 3 – 6). Der Fehler für diesen Bereich wird im Folgenden mit 2% angegeben.

Tabelle 50. Bestimmung des Fehlers der ee-Wert-Messung für ee-Werte von 80 – 98%

Eintrag	ee-Wert / % eingewogen	ee-Wert / % GC	Abweichung
1	80.0 (S)	80.0 (S)	0.0
2	80.0 (R)	81.3 (R)	1.3
3	98.0 (S)	98.2 (S)	0.2
4	98.0 (R)	99.1 (R)	1.1
5 ^a	98.0 (S)	98.4 (S)	0.4
6 ^a	98.0 (R)	98.9 (R)	0.9

a) Wiederholungsversuch

Zuletzt werden ee-Werte von 99% ((S) und (R)) eingewogen und gemessen (Tabelle 51, Einträge 1 – 6). Hier liegt die Abweichung bei 0.2 – 0.5%, sodass für diesen Bereich ein Fehler von 1% angegeben wird.

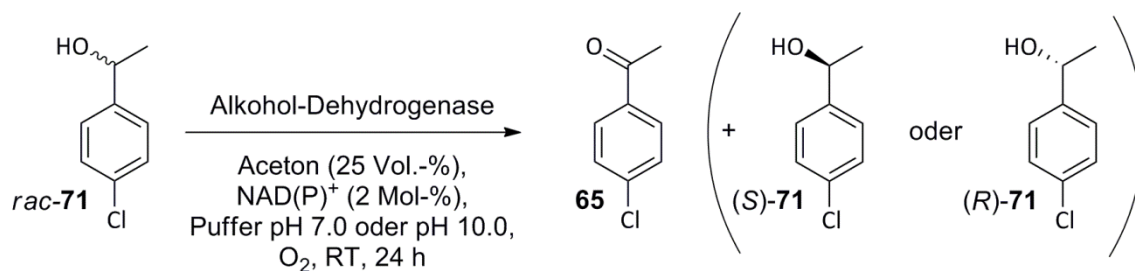
Tabelle 51. Bestimmung des Fehlers der ee-Wert-Messung für ee-Werte von 99%

Eintrag	ee-Wert / % eingewogen	ee-Wert / % GC	Abweichung
1	99.0 (S)	99.2 (S)	0.2
2	99.0 (R)	99.5 (R)	0.5
3	99.0 (S)	99.2 (S)	0.2
4	99.0 (R)	99.4 (R)	0.4
5 ^a	99.0 (S)	99.3 (S)	0.3
6 ^a	99.0 (R)	99.5 (R)	0.5

a) Wiederholungsversuch

Simulierte ee-Werte von 99% können eindeutig gemessen werden. Befindet sich im Gaschromatogramm für *rac-71* nur ein Signal, wird im Folgenden daher ein ee-Wert >99% angegeben (siehe Diskussion, Seite 105 – 106).

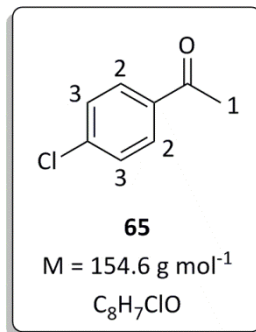
7.2.12 Allgemeine Arbeitsvorschrift 12 (AAV 12): Oxidation chiraler Alkohole mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch Aceton



Schema 53. Oxidation chiraler Alkohole mit Aceton zur Cofaktorregenerierung

In einen 25-mL Rundkolben gibt man den entsprechenden chiralen Alkohol (0.25 mmol), Cofaktor NAD(P)⁺ (5 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) bzw. Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 7.5 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe einer ADH (30 – 200 U mmol⁻¹ Substrat). Wird die ADH aus *Lactobacillus kefir* verwendet, gibt man zusätzlich MgCl₂ (1 mM) zum Reaktionsgemisch. Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 700 mbar und 40 °C entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie sowie mittels GC bestimmt. Die Ausbeute (berechnete Ausbeute) wird entsprechend der AAV 4 über einen internen Standard aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes bestimmt. Der ee-Wert und dessen Fehler werden mittels chiraler GC entsprechend der AAV 11 ermittelt.

7.2.12.1 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit ADH evo-200 bei pH 7.0



Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 37.0 mg, 0.236 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 500 mbar und 40 °C entfernt.

Umsatz: 45% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: 45% (mittels GC)

ee-Wert: (86 ± 2)%

GC: t_R = 17.86 Minuten (**65**), 21.15 Minuten ((*R*)-**71**), 21.44 Minuten ((*S*)-**71**).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) = 2.62 (3H, s, H-C**1**), 7.48 (2H, d, H-C**3**, ³J = 8.6 Hz), 7.93 (2H, d, H-C**2**, ³J = 8.6 Hz).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^[232]

7.2.12.2 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit ADH evo-200 bei pH 10.0

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 36.0 mg, 0.230 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 500 mbar und 40 °C entfernt.

Umsatz: 45% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 36% (mittels GC)

ee-Wert: $(61 \pm 7)\%$

GC: $t_R = 17.86$ Minuten (**65**), 21.13 Minuten (*(R)*-**71**), 21.42 Minuten (*(S)*-**71**).

7.2.12.3 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Rsp-ADH bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 42.0 mg, 0.268 mmol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (33 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 500 mbar und 40 °C entfernt.

Umsatz: 48% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 49% (mittels GC)

ee-Wert: >99%

GC: $t_R = 17.86$ Minuten (**65**), 21.13 Minuten (*(R)*-**71**).

7.2.12.4 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Rsp-ADH bei pH 10.0

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 36.2 mg, 0.231 mmol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (33 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 700 mbar und 40 °C entfernt.

Umsatz: 47% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 48% (mittels GC)

ee-Wert: >99%

GC: $t_R = 17.75$ Minuten (**65**), 20.87 Minuten (*(R)*-**71**).

Dieser Versuch wurde auf analoge Weise mehrmals durchgeführt. Die Ergebnisse können der Tabelle entnommen werden:

Tabelle 52. Racematspaltung mit Rsp-ADH

Eintrag	<i>rac-p</i> -Chlorphenylethanol (<i>rac</i> - 71) / mmol	ee-Wert / %	Umsatz / % ¹ H / GC
1	0.249	>99	48 / 47
2	0.231	>99	47 / 48
3	0.233	>99	46 / 47

7.2.12.5 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Lk-ADH bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 44.1 mg, 0.282 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μmol), Aceton (2.5 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (30 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 500 mbar und 40 °C entfernt.

Umsatz: 48% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: 49% (mittels GC)

ee-Wert: >99%

GC: t_R = 17.86 Minuten (**65**), 21.46 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.12.6 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Lk-ADH bei pH 10.0

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 43.0 mg, 0.275 mmol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μmol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μmol), Aceton (2.5 mL) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH

(30 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 500 mbar und 40 °C entfernt.

Umsatz: <5% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: <5% (mittels GC)

ee-Wert: <5% ±7%

GC: t_R = 21.13 Minuten ((*R*)-**71**), 21.45 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.12.7 Simulierte Aufarbeitung einer Mischung aus *rac-p*-Chlorphenylethanol : *p*-Chloracetophenon (*rac*-71** : **65**, 1 : 1) ohne Enzym bei pH 7.0**

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 17.3 mg, 0.110 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 4 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Außerdem gibt man *p*-Chloracetophenon (**65**, 20.0 mg, 0.130 mmol) in den Kolben. Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 700 mbar und 40 °C entfernt.

Theoretischer Umsatz: 54% (Einwaage)

Umsatz: 50% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: 50% (mittels GC)

ee-Wert: (2 ±7)%

GC: t_R = 17.72 Minuten (**65**), 20.80 Minuten ((*R*)-**71**), 21.13 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.12.8 Simulierte Aufarbeitung einer Mischung aus *rac-p*-Chlorphenylethanol : *p*-Chloracetophenon (*rac*-71**: **65**, 1 : 1) ohne Enzym bei pH 10.0**

Entsprechend der AAV 12 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 19.1 mg, 0.122 mmol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μmol, 4 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Aceton (2.5 mL) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 7.5 mL) in einen 25-mL Rundkolben.

Außerdem gibt man *p*-Chloracetophenon (**65**, 25.4 mg, 0.164 mmol) in den Kolben. Entsprechend der AAV 12 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 700 mbar und 40 °C entfernt.

Theoretischer Umsatz: 57% (Einwaage)

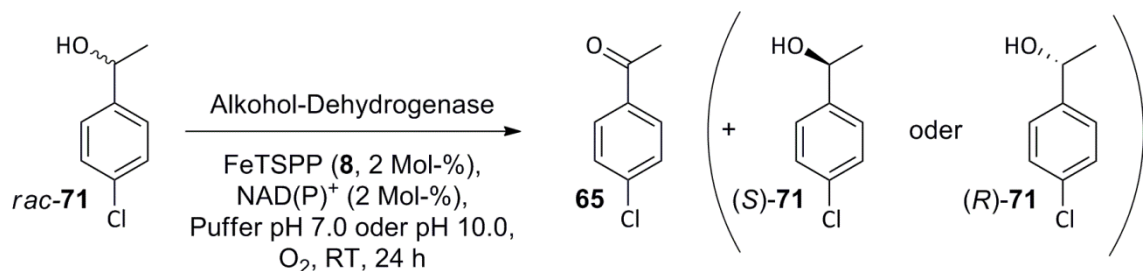
Umsatz: 54% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 54% (mittels GC)

ee-Wert: (2 ± 7)%

GC: t_R = 17.73 Minuten (**65**), 20.88 Minuten (*(R)*-**71**), 21.20 Minuten (*(S)*-**71**).

7.2.13 Allgemeine Arbeitsvorschrift 13 (AAV 13): Oxidation chiraler Alkohole mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**)



Schema 54. Oxidation chiraler Alkohole mit FeTSPP (**8**) zur Cofaktorregenerierung

In einen 25-mL Rundkolben gibt man den entsprechenden chiralen Alkohol (0.25 mmol), FeTSPP (**8**, 5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD(P)⁺ (5 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) bzw. Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 10.0 mL). Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe einer geeigneten ADH (55 – 200 U mmol^{-1} Substrat). Wird die ADH aus *Lactobacillus kefir* verwendet, gibt man zusätzlich MgCl_2 (1 mM) zum Reaktionsgemisch. Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur unter Normaldruck gerührt, wobei die vorhandene Luft als Sauerstoffquelle dient. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 700 mbar und 40 °C entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Rohprodukt

mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie mittels GC bestimmt. Die Ausbeute (berechnete Ausbeute) wird entsprechend der AAV 4 über einen internen Standard aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes bestimmt. Der ee-Wert und dessen Fehler wird mittels chiraler GC entsprechend der AAV 11 ermittelt.

7.2.13.1 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit ADH evo-200 bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71, 40.9 mg, 0.261 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei 870 mbar und 40 °C entfernt. Als interner Standard wurde Pyridazin (23.8 mg, 0.291 mmol) verwendet.

Umsatz: 11% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 12% (mittels GC)

ee-Wert: (13 \pm 7)%

Ausbeute: 11% Produkt, 82% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

GC: t_{R} = 17.87 Minuten (**65**), 21.15 Minuten (*(R)*-71), 21.47 Minuten (*(S)*-71).

7.2.13.2 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71) mit ADH evo-200 bei pH 7.0 und 46 Stunden Reaktionszeit

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-71, 40.1 mg, 0.256 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Nach 46 Stunden Reaktionszeit wird das

Lösungsmittel bei 870 mbar und 40 °C am Rotationsverdampfer entfernt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.6 mg, 0.264 mmol) verwendet.

Umsatz: 15% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 15% (mittels GC)

ee-Wert: (20 \pm 7)%

Ausbeute: 10% Produkt, 58% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

GC: t_R = 17.85 Minuten (**65**), 21.12 Minuten ((*R*)-**71**), 21.43 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.13.3 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit ADH evo-200 bei pH 10.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 41.0 mg, 0.262 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 10.0 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 3% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 3% (mittels GC)

ee-Wert: (4 \pm 7)%

GC: t_R = 17.88 Minuten (**65**), 21.15 Minuten ((*R*)-**71**), 21.47 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.13.4 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit ADH evo-200 bei pH 10.0 und 46 Stunden Reaktionszeit

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 41.4 mg, 0.264 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 10.0 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die

Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Nach 46 Stunden Reaktionszeit wird das Lösungsmittel bei 870 mbar und 40 °C am Rotationsverdampfer entfernt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.7 mg, 0.265 mmol) verwendet.

Umsatz: 3% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 5% (mittels GC)

ee-Wert: (6 \pm 7)%

Ausbeute: 2% Produkt, 74% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

GC: t_R = 17.85 Minuten (**65**), 21.11 Minuten (*(R)*-**71**), 21.42 Minuten (*(S)*-**71**).

7.2.13.5 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Rsp-ADH bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 37.0 mg, 0.236 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (55 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 31% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 32% (mittels GC)

ee-Wert: (50 \pm 7)%

GC: t_R = 17.74 Minuten (**65**), 20.75 Minuten (*(R)*-**71**), 21.21 Minuten (*(S)*-**71**).

7.2.13.6 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) mit Rsp-ADH bei pH 10.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 40.0 mg, 0.255 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 10.0 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 3% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: n.b. (mittels GC)

ee-Wert: n.b.

7.2.13.7 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) mit NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* zur Cofaktorregenerierung

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 41.0 mg, 0.262 mmol), NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (28 U mmol^{-1}), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Rsp-ADH (55 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 13% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: 12% (mittels GC)

ee-Wert: (13 \pm 7)%

GC: t_R = 17.79 Minuten (**65**), 20.77 Minuten (*(R)*-**71**), 21.12 Minuten (*(S)*-**71**).

7.2.13.8 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) mit Lk-ADH bei pH 7.0

7.2.13.8.1 32 U mmol^{-1} Lk-ADH

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 41.7 mg, 0.266 mmol), FeTSP (8, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP^+ (3.9 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl_2 (1.0 mg, 10 μmol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (32 U mmol^{-1}). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Als interner Standard wurde Pyridazin (20.6 mg, 0.252 mmol) verwendet.

Umsatz: 11% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: n.b. (mittels GC)

ee-Wert: n.b.

Ausbeute: 11% Produkt, 85% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.8.2 64 U mmol⁻¹ Lk-ADH

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 38.2 mg, 0.244 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μ mol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (64 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Als interner Standard wurde Pyridazin (20.6 mg, 0.252 mmol) verwendet.

Umsatz: 11% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: n.b. (mittels GC)

ee-Wert: n.b.

Ausbeute: 11% Produkt, 87% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.8.3 64 U mmol⁻¹ Lk-ADH und 48 Stunden Reaktionszeit

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 40.6 mg, 0.259 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μ mol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (64 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt. Nach 48 Stunden Reaktionszeit wird die Aufarbeitung durchgeführt entsprechend der AAV 13 durchgeführt.

Als interner Standard wurde Pyridazin (20.6 mg, 0.252 mmol) verwendet.

Umsatz: 11% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: n.b. (mittels GC)

ee-Wert: n.b.

Ausbeute: 10% Produkt, 85% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.8.4 64 U mmol⁻¹ Lk-ADH und 5 Mol-% FeTSPP (8)

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 41.8 mg, 0.261 mmol), FeTSPP (**8**, 12.8 mg, 12.5 μ mol, 5 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μ mol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (64 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Als interner Standard wurde Pyridazin (20.7 mg, 0.253 mmol) verwendet.

Umsatz: 8% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: n.b. (mittels GC)

ee-Wert: n.b.

Ausbeute: 8% Produkt, 89% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.8.5 64 U mmol⁻¹ Lk-ADH und pH 8.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**, 40.5 mg, 0.259 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NADP⁺ (3.9 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), MgCl₂ (1.0 mg, 10 μ mol) und Phosphatpuffer (pH 8.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Lk-ADH (64 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Als interner Standard wurde Pyridazin (20.3 mg, 0.248 mmol) verwendet.

Umsatz: 5% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: n.b. (mittels GC)

ee-Wert: n.b.

Ausbeute: 5% Produkt, 87% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.9 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) ohne Enzym bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 42.0 mg, 0.268 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD⁺ (3.4 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: 1% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Umsatz: <1% (mittels GC)

ee-Wert: <1% \pm 7%

GC: t_R = 20.16 Minuten ((*R*)-**71**), 21.47 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.13.10 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) ohne Cofaktor bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 36.4 mg, 0.233 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.0 mg, 0.257 mmol) verwendet.

Umsatz: 0% (mittels ¹H-NMR-Spektroskopie)

Ausbeute: 0% Produkt, 74% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.11 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) ohne FeTSPP (**8**) bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 36.3 mg, 0.232 mmol), Cofaktor NADH (3.5 mg, 5.0 μ mol, 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 10 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von ADH evo-200 (200 U mmol⁻¹). Entsprechend der AAV 13 werden

die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt. Als interner Standard wurde Pyridazin (21.5 mg, 0.263 mmol) verwendet.

Umsatz: 11% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Ausbeute: 5% Produkt, 41% Edukt (berechnete Ausbeute entsprechend der AAV 4).

7.2.13.12 Racematspaltung von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*) ohne Enzym bei pH 10.0

Entsprechend der AAV 13 gibt man *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac-71*, 39.0 mg, 0.249 mmol), FeTSPP (**8**, 5.1 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol), Cofaktor NAD^+ (3.4 mg, 5.0 μmol , 2 Mol-% bezogen auf die Menge an Alkohol) und Kaliumcarbonatpuffer (pH 10.0, 100 mM, 10.0 mL) in einen 25-mL Rundkolben. Entsprechend der AAV 13 werden die Reaktionsbedingungen eingestellt sowie die Aufarbeitung durchgeführt.

Umsatz: <1% (mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie)

Umsatz: <1% (mittels GC)

ee-Wert: <1% \pm 7%

GC: t_{R} = 20.15 Minuten ((*R*)-**71**), 21.47 Minuten ((*S*)-**71**).

7.2.14 Allgemeine Arbeitsvorschrift 14 (AAV 14): H_2O_2 -Nachweis

Im Folgenden wird der Nachweis von Wasserstoffperoxid mittels Teststäbchen (Quantofix der Firma Macherey-Nagel; 0.5 – 25 mg L^{-1} H_2O_2) am Beispiel der Synthese des Natrium-D-Gluconat (**60**) aus D-Glucose (**1**) mit gekoppelter *in-situ*-Cofaktorregenerierung durch FeTSPP (**8**) entsprechend der AAV 3 beschrieben. Die Reaktionsmischung wird angesetzt und 24 Stunden gerührt (entsprechend AAV 3), allerdings wird die Reaktionslösung nicht aufgearbeitet, sondern für den H_2O_2 -Nachweis verwendet. Die auf H_2O_2 zu untersuchende wässrige FeTSPP-Lösung (0.5 mM) ist selbst dunkel gefärbt, sodass ein quantitativer Nachweis von H_2O_2 mittels Farbskala nicht möglich ist. Aus diesem Grund werden wässrige FeTSPP-Lösungen (0.5 mM) mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (0.5 mg L^{-1} – 10 mg L^{-1} ; 14.7 mM – 294 mM) angesetzt. Hierbei konnte mittels Teststäbchen wiederholt und

eindeutig eine H_2O_2 -Konzentration von 10 mg L^{-1} nachgewiesen werden. Eine H_2O_2 -Konzentration von 5 mg L^{-1} konnte jedoch nicht mehr detektiert werden. In der zu untersuchenden Reaktionslösung hingegen konnte kein H_2O_2 nachgewiesen werden. Es wird gefolgert, dass sich in der Reaktionslösung eine H_2O_2 -Konzentration $<10 \text{ mg L}^{-1}$ befand. Bezogen auf eine Umsetzung von $25 \text{ mM D-Glucose (1)}$ entsprechend der AAV 3 entsprächen 10 mg L^{-1} einer Menge von $0.294 \text{ mmol L}^{-1}$ oder einem Umsatz $<2\%$ (1.18%). Im Vergleich dazu entspricht der Umsatz der Standardreaktionen $>95\%$. Evtl. gebildetes Wasserstoffperoxid sollte demnach deutlich nachweisbar sein.

7.2.15 Allgemeine Arbeitsvorschrift 15 (AAV 15): Spektralphotometrische Bestimmung der Enzymaktivität bei pH 7.0

Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden Stammlösungen der jeweiligen Substrate (10 mM) sowie der benötigten Cofaktoren (NAD(P)H bzw. NAD(P)^+ , $12,5 \text{ mM}$) in Phosphatpuffer ($\text{pH } 7.0$, 50 mM) hergestellt. Zunächst wird als Referenz 1 mL Pufferlösung (Phosphatpuffer, $\text{pH } 7.0$, 50 mM) bei 340 nm gemessen. Anschließend werden $960 \mu\text{L}$ der entsprechenden Substratlösung und $20 \mu\text{L}$ der Cofaktor-Lösung in eine Küvette pipettiert und gut vermischt. Zuletzt werden $20 \mu\text{L}$ der entsprechend verdünnten Enzymlösung hinzugefügt. Nach nochmaligem Mischen wird die Messung der Enzymkinetik gestartet. Gemessen wird 5 Minuten alle 2 Sekunden , dabei wird die Zu- bzw. Abnahme von NAD(P)H , entsprechend einer Oxidation bzw. einer Reduktion, bei 340 nm verfolgt und anschließend die Anfangssteigung bestimmt. Die Anfangssteigung kann am genauesten bestimmt werden, wenn der Kurvenverlauf über mehrere Sekunden möglichst konstant ist. Gegebenenfalls muss die Enzymlösung verdünnt werden und die Messung entsprechend wiederholt werden. Bei Verwendung von Lk-ADH wird NADPH bzw. NADP^+ als Cofaktor eingesetzt und zusätzlich muss MgCl_2 (1 mM) zur Substratlösung hinzugegeben werden. Bei Verwendung von Rsp-ADH sowie von ADH evo-200 wird hingegen NADH bzw. NAD^+ als Cofaktor benötigt. Für die Berechnung der volumetrischen bzw. der spezifischen Enzymaktivität wird die Anfangssteigung der Absorptionskurve verwendet.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot V_g \cdot f}{\epsilon \cdot V_p \cdot t \cdot d}$$

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot V_g \cdot f}{\epsilon \cdot V_p \cdot t \cdot d \cdot c_p}$$

$U \text{ mL}^{-1}$: volumetrische Enzymaktivität

$U \text{ mg}^{-1}$: spezifische Enzymaktivität

$\Delta E_{340\text{nm}} \text{ t}^{-1}$: Anfangssteigung der Absorptionskurve

V_g / mL : Gesamtprobenvolumen

f: Probenverdünnungsfaktor

$\epsilon / \text{mL} (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$: molarer Extinktionskoeffizient für NAD(P)H

V_p / mL : Probenvolumen

d / cm: Küvettendicke

$c_p / \text{mg mL}^{-1}$: Enzymkonzentration der Probe

In dieser Arbeit ist $V_g = 1.0 \text{ mL}$, $\epsilon = 6.3 \text{ mL} (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$, $V_p = 20 \mu\text{L}$, $d = 1.0 \text{ cm}$.

7.2.15.1 Oxidation von Cyclohexanol (30) und Reduktion von Cyclohexanon (31)

7.2.15.1.1 Lk-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Lk-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetophenon (27). Die für Acetophenon (27) bestimmte Aktivität von 1544 U mL^{-1} wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 53. Reduktion von **31** und Oxidation von **30** mit Lk-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetophenon (27)	0.973	200	1544	100
Cyclohexanon (31)	1.065	200	1690	109
Cyclohexanol (30)	0.339	40	108	7

7.2.15.1.2 Rsp-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Rsp-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient *p*-Cl-Acetophenon (**65**). Die für *p*-Cl-Acetophenon (**65**) bestimmte Aktivität von 62 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 54. Reduktion von **31** und Oxidation von **30** mit Rsp-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	0.389	20	62	100
Cyclohexanon (31)	0.190	20	30	48
Cyclohexanol (30)	0.090	2	1	2

7.2.15.1.3 ADH evo-200

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 110 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 55. Reduktion von **31** und Oxidation von **30** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.139	100	110	4.4	100
Cyclohexanon (31)	0.147	100	117	4.7	106
Cyclohexanol (30)	0.096	20	15	0.6	14

7.2.15.2 Oxidation von Cycloheptanol (**67**) und Reduktion von Cycloheptanon (**68**)

7.2.15.2.1 Lk-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Lk-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetophenon (**27**). Die für Acetophenon (**27**) bestimmte Aktivität von 1544 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 56. Reduktion von **68** und Oxidation von **67** mit Lk-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetophenon (27)	0.973	200	1544	100
Cycloheptanon (68)	0.297	200	472	31
Cycloheptanol (67)	0.620	40	197	13

7.2.15.2.2 Rsp-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Rsp-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient *p*-Cl-Acetophenon (**65**). Die für *p*-Cl-Acetophenon (**65**) bestimmte Aktivität von 62 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 57. Reduktion von **68** und Oxidation von **67** mit Rsp-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	0.389	20	62	100
Cycloheptanon (68)	0.300	2	5	8
Cycloheptanol (67)	0.125	2	2	3

7.2.15.2.3 ADH evo-200

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 208 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 58. Reduktion von **68** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.262	100	208	4.7	100
Cycloheptanon (68)	0.744	10	59	1.3	28

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 110 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 59. Oxidation von **67** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.139	100	110	4.4	100
Cycloheptanol (67)	0.167	20	27	1.1	24

7.2.15.3 Oxidation von Cyclooctanol (**69**) und Reduktion von Cyclooctanon (**70**)

7.2.15.3.1 Lk-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Lk-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetophenon (**27**). Die für Acetophenon (**27**) bestimmte Aktivität von 1544 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 60. Reduktion von **70** und Oxidation von **69** mit Lk-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetophenon (27)	0.973	200	1544	100
Cyclooctanon (70)	0.245	100	195	13
Cyclooctanol (69)	0.701	40	223	14

7.2.15.3.2 Rsp-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Rsp-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient *p*-Cl-Acetophenon (**65**). Die für *p*-Cl-Acetophenon (**65**) bestimmte Aktivität von 62 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 61. Reduktion von **70** und Oxidation von **69** mit Rsp-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	0.755	10	62	100
Cyclooctanon (70)	0.286	2	5	8
Cyclooctanol (69)	0.000	2	0	0

7.2.15.3.3 ADH evo-200

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 208 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 62. Reduktion von **70** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.262	100	208	4.7	100
Cyclooctanon (70)	0.081	10	6	0.1	3

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 110 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 63. Oxidation von **69** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.139	100	110	4.4	100
Cyclooctanol (69)	0.165	20	26	1.0	24

7.2.15.4 Oxidation von *rac-p*-Chlorphenylethanol (*rac*-**71**) und Reduktion von *p*-Cl-Acetophenon (**65**)

7.2.15.4.1 Lk-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Lk-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetophenon (**27**). Die für Acetophenon (**27**) bestimmte Aktivität von 2390 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 64. Reduktion von **65** mit Lk-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetophenon (27)	0.251	1200	2390	100
<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	0.361	800	2292	96

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Lk-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetophenon (**27**). Die für Acetophenon (**27**) bestimmte Aktivität von 1544 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 65. Oxidation von *rac*-**71** mit Lk-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetophenon (27)	0.973	200	1544	100
<i>rac</i> - <i>p</i> -Chlorphenyl- ethanol (<i>rac</i> - 71)	0.848	40	269	17

7.2.15.4.2 Rsp-ADH

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit Rsp-ADH werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient *p*-Cl-Acetophenon (**65**). Die für *p*-Cl-Acetophenon (**65**) bestimmte Aktivität von 62 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 66. Reduktion von **65** und Oxidation von *rac*-**71** mit Rsp-ADH

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungsfaktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	rel. Aktivität / %
<i>p</i> -Cl-Acetophenon (65)	0.389	20	62	100
<i>rac</i> - <i>p</i> -Chlorphenyl- ethanol (<i>rac</i> - 71)	0.221	2	4	6

7.2.15.4.3 ADH evo-200

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 208 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 67. Reduktion von **65** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.262	100	208	4.7	100
<i>p</i> -Cl- Acetophenon (65)	0.865	10	69	1.6	33

Die spektralphotometrischen Untersuchungen mit ADH evo-200 werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 15 durchgeführt. Als Referenz dient Acetessigester (**66**). Die für Acetessigester (**66**) bestimmte Aktivität von 110 U mL⁻¹ wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Substrate auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 68. Oxidation von *rac*-**71** mit ADH evo-200

Substrat	Steigung g / s ⁻¹	Verdünnungs- faktor f	vol. Aktivität / U mL ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	rel. Aktivität / %
Acetessigester (66)	0.139	100	110	4.4	100
<i>rac</i> - <i>p</i> -Chlorphenyl- ethanol (<i>rac</i> - 71)	0.089	20	14	0.6	13

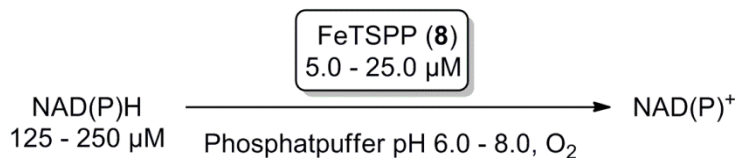
7.2.16 Allgemeine Arbeitsvorschrift 16 (AAV 16): Spektralphotometrische Untersuchung der Oxidation von NADH durch FeTSPP (**8**) unter Sauerstoffausschluss

Es werden entgaste Stammlösungen aus FeTSPP (**8**) (0.1 mM) und NADH (0.5 mM) in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) hergestellt. Jeweils 0.5 mL dieser Lösungen werden unter Schutzatmosphäre in eine Küvette gegeben, luftdicht verschlossen und anschließend bei 340 nm spektralphotometrisch gemessen. Zur Überprüfung des Sauerstoffeinflusses auf die Reaktion wird die Küvette kurz geöffnet und ein Luftstrom (1 Sekunde) auf die Oberfläche der Lösung gerichtet, bevor die Messung fortgesetzt wird. Als nächstes wird die Küvette erneut kurz geöffnet und diesmal zusätzlich invertiert bevor die Messung fortgesetzt wird.

Als Vergleichsversuch werden erneut jeweils 0.5 mL der Stammlösungen in eine Küvette gegeben und anschließend bei 340 nm gemessen. Das Ansetzen der Vergleichsprobe wird jedoch nicht unter Schutzatmosphäre durchgeführt und die Messung der Probe erfolgt in einer offenen Küvette. Als Referenz wird jeweils Pufferlösung (Phosphatpuffer, pH 7.0, 50 mM) bei 340 nm gemessen.

7.2.17 Allgemeine Arbeitsvorschrift 17 (AAV 17): Spektralphotometrische Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Umsatzfrequenz (TOF) von FeTSPP (**8**): Methode A

Es werden Stammlösungen aus FeTSPP (**8**) (5 – 25 µM) und NAD(P)H (125 – 250 µM) in Phosphatpuffer (pH 6.0 – 8.0, 50 mM) hergestellt. Als Referenz wird die entsprechende Pufferlösung (Phosphatpuffer, pH 6.0 – 8.0, 50 mM) bei 340 nm gemessen.



Schema 55. Oxidation von NAD(P)H durch FeTSPP (**8**)

Anschließend werden jeweils 0.5 mL der Stammlösungen in eine Küvette gegeben und die Abnahme der Absorption von NAD(P)H bei 340 nm spektralphotometrisch verfolgt. Aus der erhaltenen Absorptionskurve wird die Anfangssteigung bestimmt. Mit diesem Wert kann nun die „biomimetische spezifische Aktivität“ bezogen auf die entsprechende FeTSPP-Menge (in mg) berechnet werden. Hierzu wird die Gleichung zur Berechnung der volumetrischen Aktivität umgeformt:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot V_g \cdot f}{\epsilon \cdot V_p \cdot t \cdot d}$$

Zunächst wird die Aktivität pro mmol ($U \text{ mmol}^{-1}$) berechnet: Hierbei ist $V_g = V_p = 1 \text{ mL}$ und $f = 1$.

$$\frac{U}{\text{mmol}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{\varepsilon \cdot t \cdot d \cdot n_p}$$

Anschließend wird die „biomimetische spezifische Aktivität“ / $U \text{ mg}^{-1}$ durch Multiplikation mit der molaren Masse M_p erhalten:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{\varepsilon \cdot t \cdot d \cdot n_p \cdot M_p}$$

Die Berechnung der Umsatzfrequenz (TOF, / s^{-1}) erfolgt durch Umformung der Aktivität pro mmol ($\mu\text{mol} (\text{min} \cdot \text{mmol})^{-1}$):

$$\frac{1}{s} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot \text{mmol} \cdot 60}{\varepsilon \cdot t \cdot d \cdot n_p \cdot \mu\text{mol}}$$

$U \text{ mL}^{-1}$: volumetrische Enzymaktivität

$U \text{ mg}^{-1}$: spezifische Enzymaktivität

$\Delta E_{340\text{nm}} \text{ t}^{-1}$: Anfangssteigung der Absorptionskurve

V_g / mL : Gesamtprobenvolumen

f: Probenverdünnungsfaktor

$\varepsilon / \text{mL} (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$: molarer Extinktionskoeffizient für NAD(P)H

V_p / mL : Probenvolumen

d / cm: Küvettendicke

n_p / mmol : Stoffmenge der Probe

$M_p / \text{g mol}^{-1}$: molare Masse der Probe

TOF / s^{-1} : Umsatzfrequenz

Hier ist $V_g = 1.0 \text{ mL}$, $\varepsilon = 6.3 \text{ mL} (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$, $V_p = 1 \text{ mL}$, $d = 1.0 \text{ cm}$.

7.2.17.1 Oxidation von NADH bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 17 werden Stammlösungen von FeTSPP (**8**) und NAD(P)H in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) hergestellt und Absorptionskurven erstellt.

Tabelle 69. Bestimmung der spez. Aktivität von FeTSPP (**8**) bei pH 7.0

Eintrag	NAD(P)H / μM	FeTSPP / μM	Steigung / min ⁻¹	spezifische Aktivität / U mg ⁻¹	TOF / s ⁻¹
1	125 ^a	25	0.027	4.6	0.077
2	250 ^a	12.5	0.599	7.4	0.124
3	125 ^a	5	0.167	5.2	0.086
4	125 ^b	25	0.027	4.7	0.078

7.2.17.2 Oxidation von NADH bei pH 6.0 – 8.0

Entsprechend der AAV 17 werden Stammlösungen von FeTSPP (**8**, 25 μM) und NADH (125 μM) in Phosphatpuffer (pH 6.0 – 8.0, 50 mM) hergestellt und Absorptionskurven erstellt.

Tabelle 70. Bestimmung der spez. Aktivität von FeTSPP (**8**) mit NADH bei pH 6.0 – 8.0

Eintrag	pH-Wert	Steigung / min ⁻¹	spezifische Aktivität / U mg ⁻¹	TOF / s ⁻¹
1	6.0	0.067	0.4	0.007
2	7.0	0.750	4.6	0.077
3	7.5	0.037	0.2	0.004
4	8.0	0.027	0.2	0.003

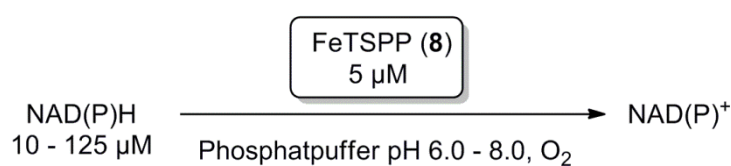
7.2.17.3 Oxidation von NADPH bei pH 6.0 – 8.0

Entsprechend der AAV 17 werden Stammlösungen von FeTSPP (**8**, 25 μM) und NADPH (125 μM) in Phosphatpuffer (pH 6.0 – 8.0, 50 mM) hergestellt und Absorptionskurven erstellt.

Tabelle 71. Bestimmung der spez. Aktivität von FeTSPP (**8**) mit NADPH bei pH 6.0 – 8.0

Eintrag	pH-Wert	Steigung / min^{-1}	spezifische Aktivität / U mg^{-1}	TOF / s^{-1}
1	6.0	0.042	0.3	0.004
2	7.0	0.759	4.7	0.078
3	7.5	0.033	0.2	0.003
4	8.0	0.013	0.1	0.001

7.2.18 Allgemeine Arbeitsvorschrift 18 (AAV 18): Spektralphotometrische Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Umsatzfrequenz (TOF) von FeTSPP (**8**): Methode B



Schema 56. Oxidation von NADH mittels FeTSPP (**8**)

Es werden Stammlösungen aus FeTSPP (**8**) (100.0 μM) und NADH (20 mM) in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0 – 8.0, 50 mM) hergestellt. Als Referenz wird die entsprechende Pufferlösung (Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0 – 8.0, 50 mM) bei 340 nm gemessen. Anschließend werden 2850 μL der entsprechenden Pufferlösung mit 150 μL der FeTSPP-Stammlösung in eine Küvette gegeben. Die resultierende FeTSPP-Lösung (5 μM) wird gerührt und die Messung der Absorption bei 340 nm gestartet. Nun wird während die Messung läuft, NADH (7.5 μL , 20 mM, entsprechend einer Endkonzentration von 50 μM)

NADH) mit einer Hamilton-Spritze zur FeTSPP-Lösung gegeben und die Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm verfolgt. (Die Zugabe von 7.5 µL NADH-Lösung zu 3000 µL FeTSPP-Lösung entspricht einer Verdünnung <1%.) Aus der erhaltenen Absorptionskurve wird die Anfangssteigung bestimmt. Mit diesem Wert kann nun die „biomimetische spezifische Aktivität“ bezogen auf die entsprechende FeTSPP-Menge (in mg) berechnet werden. Hierzu wird die Gleichung zur Berechnung der volumetrischen Aktivität umgeformt:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot V_g \cdot f}{\epsilon \cdot V_p \cdot t \cdot d}$$

Zunächst wird die molare Aktivität / U mmol⁻¹ berechnet: Hierbei ist V_g = V_p = 3007.5 µL und f = 1.

$$\frac{U}{\text{mmol}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{\epsilon \cdot t \cdot d \cdot n_p}$$

Anschließend wird die „biomimetische spezifische Aktivität“ / U mg⁻¹ durch Multiplikation mit der molaren Masse M_p erhalten:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{\epsilon \cdot t \cdot d \cdot n_p \cdot M_p}$$

Die Berechnung der Umsatzfrequenz (TOF / s⁻¹) erfolgt durch Umformung der molaren Aktivität / µmol (min · mmol)⁻¹:

$$\frac{1}{\text{s}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot \text{mmol} \cdot 60}{\epsilon \cdot t \cdot d \cdot n_p \cdot \mu\text{mol}}$$

U mL⁻¹: volumetrische Enzymaktivität

U mg⁻¹: spezifische Enzymaktivität

ΔE_{340nm} t⁻¹: Anfangssteigung der Absorptionskurve

V_g / mL: Gesamtprobenvolumen

f: Probenverdünnungsfaktor

ϵ / mL ($\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$)⁻¹: molarer Extinktionskoeffizient für NAD(P)H

V_p / mL: Probenvolumen

d / cm: Küvettendicke

n_p / mmol: Stoffmenge der Probe

M_p / g mol⁻¹: molare Masse der Probe

TOF / s⁻¹: Umsatzfrequenz

Hier ist $\epsilon = 6.3 \text{ mL } (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$, $d = 1.0 \text{ cm}$.

7.2.18.1 Oxidation von NADH (10 – 125 μM) mittels FeTSP (5 μM) bei pH 7.0

Entsprechend der AAV 18 werden Stammlösungen von FeTSP (8) und NADH in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) hergestellt und Absorptionskurven erstellt.

Tabelle 72. Oxidation von NADH bei pH 7.0

Eintrag	NADH / μM	Steigung / min ⁻¹	spez. Aktivität / U mg ⁻¹	TOF / s ⁻¹
1	10	0.4512	14	0.23
2	20	0.6546	20	0.33
3	50	1.683	52	0.87
4	100	3.0216	94	1.57
5	125	3.609	112	1.87

7.2.18.2 Oxidation von NADH (50 μM) mittels FeTSPP (5 μM) bei pH 6.0 – 8.0

Entsprechend der AAV 18 werden Stammlösungen von FeTSPP (**8**) und NADH in Phosphatpuffer (pH 6.0 – 8.0, 50 mM) hergestellt und Absorptionskurven erstellt.

Tabelle 73. Oxidation von NADH bei pH 6.0 – 8.0

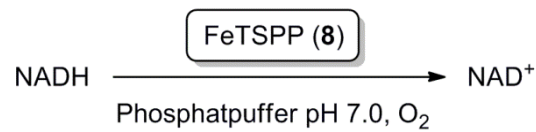
Eintrag	pH-Wert	Steigung / min^{-1}	spez. Aktivität / U mg^{-1}	TOF / s^{-1}
1	6.0	0.52	16	0.27
2	6.5	1.03	29	0.48
3	7.0	1.68	52	0.87
4	8.0	1.10	34	0.57

7.2.19 Allgemeine Arbeitsvorschrift 19 (AAV 19): Bestimmung der Langzeitstabilität von FeTSPP (**8**) in Lösung

Eine Stammlösung aus FeTSPP (**8**) (0.1 mM) in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) wird 58 Tage lang in einem verschlossenen Gefäß gerührt. Die spezifische Aktivität dieser Lösung wird entsprechend der AAV 17 einmal pro Woche mit jeweils frisch angesetzten Stammlösungen aus NADH (250 – 500 μM) in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) bestimmt.

7.2.19.1 Oxidation von NADH

Entsprechend der AAV 19 wird eine Stammlösung aus FeTSPP (**8**) hergestellt und entsprechend der AAV 17 wird die spezifische Aktivität dieser Stammlösung bezüglich der Oxidation von NADH gemessen.

Tabelle 74. Langzeitstabilität der künstlichen NAD(P)H-Oxidase **8**

Eintrag	Zeit / d	NADH / μM	FeTSPP 8 / μM	spezifische Aktivität / U mg^{-1}	TOF / s^{-1}
1	0	125	25.0	4.6	0.08
2	14	125	25.0	4.5	0.08
3	21	125	25.0	4.2	0.07
4	28	125	25.0	3.0	0.05
5	58	125	25.0	3.3	0.06

7.2.20 Allgemeine Arbeitsvorschrift 20 (AAV 20): Absorptionsspektren von FeTSPP (**8**)

7.2.20.1 Absorptionsspektren von FeTSPP (**8**) bei pH 4.0 – 10.0

Es werden Lösungen von FeTSPP (**8**) ($7.5 \mu\text{M}$) in Kaliumphosphatpuffer (50 mM) mit den pH-Werten pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0 und pH 10.0 hergestellt. Der pH-Wert wird jeweils nach dem Ansetzen überprüft. Mittels Spektralphotometer (Shimadzu, UV-2450) werden Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 250 – 700 nm aufgenommen. Als Referenz wird jeweils die entsprechende Pufferlösung gemessen.

7.2.20.2 Absorptionsspektrum einer 58 Tage alten FeTSPP-Lösung

Eine Stammlösung von FeTSPP (**8**) (0.1 mM) in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) wird 58 Tage lang in einem verschlossenen Gefäß gerührt (siehe 7.2.19.1). Anschließend gibt man 50 μL dieser Stammlösung und 950 μL Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM) in eine Küvette. Von der erhaltenen FeTSPP-Lösung ($5.0 \mu\text{M}$) wird nun mittels Spektralphotometer ein

Experimenteller Teil

Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 250 – 700 nm aufgenommen. Als Referenz wird die entsprechende Pufferlösung gemessen.

8 Appendix

Das kommerziell erhältliche $[\text{FeTSP}]\text{Cl}$ (**8a**) liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht zwischen der Diaqua-Form $[\text{FeTSP}(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**8b**), der Monoaquamonohydroxy-Form $[\text{FeTSP}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ (**8c**), der Dihydroxy-Form $[\text{FeTSP}(\text{OH})_2]$ (**8d**) und der Dimer-Form $[\text{Fe}(\text{TSP})_2]$ (**8e**) vor (Abbildung 23). Soweit nicht weiter spezifiziert wird in dieser Arbeit als Molekül **8**, das kommerziell erhältliche $[\text{FeTSP}]\text{Cl}$ (**8a**) oder eine Gleichgewichtsmischung der Porphyrine **8b** – **8e** bezeichnet.

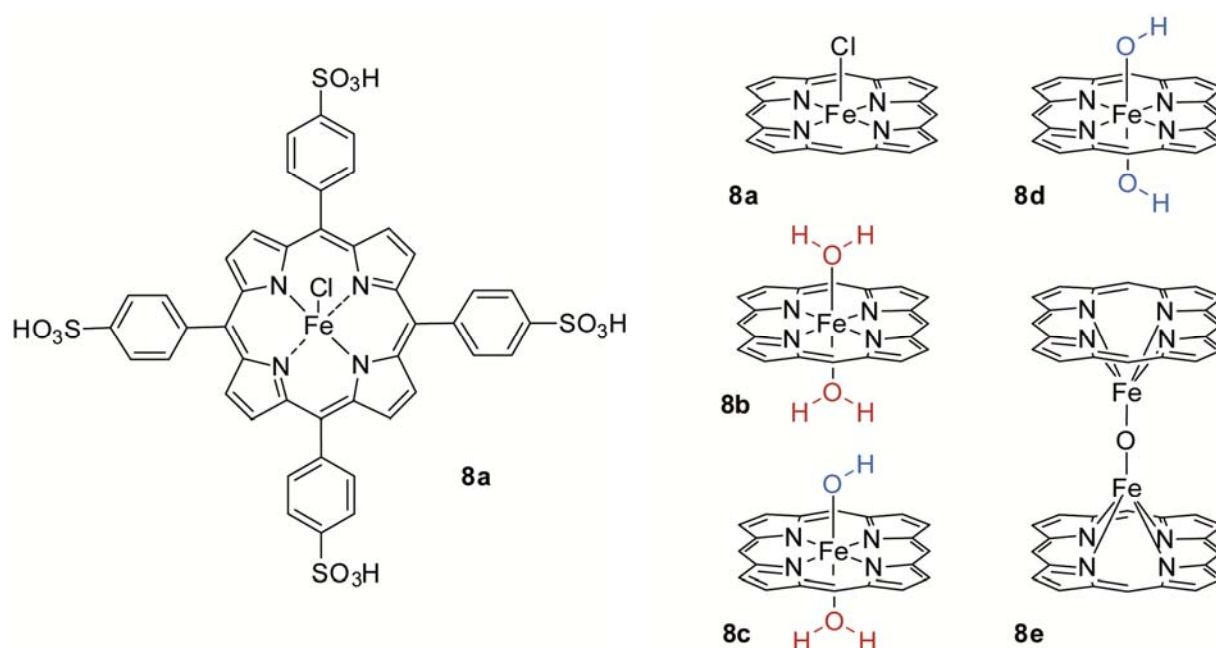


Abbildung 23. Die verschiedenen Formen von FeTSP (**8**); Bei den Strukturen **8a** – **8e** (rechts) werden die *meso*-ständigen Sulfonatophenylgruppen für eine bessere Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt.

9 Literaturverzeichnis

- [1] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [2] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5. Aufl., Springer, Berlin, **2004**.
- [3] M. Petersen, A. Kiener, *Green Chem.* **1999**, *1*, 99.
- [4] R. L. Antrim, W. Colilla, B. J. Schnyder, in: *Appl. Biochem. Bioeng.* (Hrsg.: L. B. Wingard, E. Katchalski-Katzir, L. Goldstein), Band 2, Academic Press, New York, **1979**, S. 97-207. .
- [5] A. C. Bulhões, H. A. S. Goldani, F. S. Oliveira, U. S. Matte, R. B. Mazzuca, T. R. Silveira, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 1441.
- [6] W. Marconi, F. Morisi, in: *Appl. Biochem. Bioeng.* (Hrsg.: L. B. Wingard, E. Katchalski-Katzir, L. Goldstein), Band 2, Academic Press, New York, **1979**, S. 219-258. .
- [7] P. S. J. Cheetham, in: *Handbook of Enzyme Biotechnology* (Hrsg.: A. Wiseman), Ellis Horwood, London, **1995**, S. 493-498. .
- [8] *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*, **2001**, OECD, S. 22.
- [9] D. Rozzell, in: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Gröger, O. May), 3. Auflage, Band 3, Wiley-VCH, Weinheim, Kapitel 46, S. 1847-1938, **2012**.
- [10] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *407*, 258.
- [11] C. Wrotnowski, *Genet. Eng. News* **1997**, *17*, 14.
- [12] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226.
- [13] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125.
- [14] B. Join, K. Möller, C. Ziebart, K. Schröder, D. Gördes, K. Thurow, A. Spannenberg, K. Junge, M. Beller, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3023.
- [15] A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **2010**, *120*, 195.
- [16] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762.
- [17] W. Hummel, M. Kuzu, B. Geueke, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3649.
- [18] B. Geueke, B. Riebel, W. Hummel, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 205.

- [19] B. R. Riebel, P. R. Gibbs, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 707.
- [20] W. Hummel, B. Riebel, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 51.
- [21] B. R. Riebel, P. R. Gibbs, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 1156.
- [22] S. L. Pival, M. Klimacek, B. Nidetzky, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 2305.
- [23] I. Schröder, E. Steckhan, A. Liese, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 541, 109.
- [24] G. Hilt, B. Lewall, G. Montero, J. H. P. Utley, E. Steckhan, *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 2289.
- [25] H. Maid, P. Böhm, S. M. Huber, W. Bauer, W. Hummel, N. Jux, H. Gröger, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2445; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 2397.
- [26] H. Maid, S. M. Huber, H. Gröger, teilweise unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Erlangen-Nürnberg.
- [27] H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, 299, 1694.
- [28] F. Xu, *Ind. Biotechnol.* **2005**, 1, 38.
- [29] D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 4111.
- [30] F. Hollmann, K. Bühler, B. Bühler, in: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Gröger, O. May)*, 3. Auflage, Band 3, Wiley-VCH, Weinheim, Kapitel 32, S. 1325-1438, **2012**.
- [31] H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, 155, 1773.
- [32] H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, 14, 147.
- [33] W. Hummel, M. R. Kula, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 184, 1.
- [34] W. Tischer, W. Tiemeyer, H. Simon, *Biochimie* **1980**, 62, 331.
- [35] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, M.-R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, 23, 2789.
- [36] Z. Shaked, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7104.
- [37] W. Hummel, H. Schütte, E. Schmidt, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, 26, 409.
- [38] C. Wandrey, *Proceedings of the Fourth European Congress on Biotechnology*, Vol. 4, Elsevier Science Publisher B. V., O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, K. Ch. A. M. Luyben, Eds., Amsterdam, **1987**.
- [39] R. Wichmann, D. Vasic-Racki, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **2005**, 92, 225.

- [40] U. Kragl, D. Vasic-Racki, C. Wandrey, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1993**, *32*, 103.
- [41] A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Stingl, M. Kottenhahn, K. Huthmacher, K. Drauz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2851.
- [42] A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 1.
- [43] K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, A. M. Egorov, C. Wandrey, U. Kragl, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1377.
- [44] R. Hatrongjit, K. Packdibamrung, *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 557.
- [45] V. I. Tishkov, V. O. Popov, *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 89.
- [46] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2672.
- [47] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257.
- [48] R. Woodyer, W. A. van der Donk, H. Zhao, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11604.
- [49] T. W. Johannes, R. D. Woodyer, H. Zhao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5728.
- [50] H. Gröger, Y. Asano, U. T. Bornscheuer, J. Ogawa, *Chem. Asian. J.* **2012**, *7*, 1138.
- [51] T. Daußmann, T. C. Rosen, P. Dünkemann, *Eng. Life Sci.* **2006**, *6*, 125.
- [52] T. Daußmann, H.-G. Hennemann, T. C. Rosen, P. Dünkemann, *Chem. Eng. Technol.* **2006**, *78*, 249.
- [53] M. Rafiee, *Synlett* **2007**, 503.
- [54] R. A. Sheldon, *Chem. Commun.* **2008**, 3352.
- [55] S. H. Baik, C. Kang, I. C. Jeon, S. E. Yun, *Biotechnol. Tech.* **1999**, *13*, 1.
- [56] E. Siu, K. Won, C. B. Park, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 293.
- [57] H. Jaegfeldt, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *128*, 355.
- [58] C. Kane, T. Tzédakis, *AIChE J.* **2008**, *54*, 1365.
- [59] C. Ramírez-Molina, M. Boujtita, N. El Murr, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1095.
- [60] R. DiCosimo, C.-H. Wong, L. Daniels, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4622.
- [61] H. T. Zheng, Y. Ohno, T. Nakamori, S. Suye, *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *107*, 16.
- [62] R. Yuan, S. Watanabe, S. Kuwabata, H. Yoneyama, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2494.
- [63] M. Schulz, H. Leichmann, H. Günther, H. Simon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *42*, 916.
- [64] J. S. Bus, S. D. Aust, J. E. Gibson, *Environ. Health Perspect.* **1976**, *16*, 139.

- [65] H.-Z. Bu, S. R. Mikkelsen, A. M. English, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4320.
- [66] M. H. Kim, S. E. Yun, *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 21.
- [67] S. Cosnier, M. Fontecave, C. Innocent, V. Niviere, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 685.
- [68] G. F. Hall, A. P. F. Turner, *Electroanalysis* **1994**, *6*, 217.
- [69] S. Tsujimura, K. Kano, T. Ikeda, *Chem. Lett.* **2002**, *31*, 1022.
- [70] A. Salimi, M. Izadi, R. Hallaj, S. Soltanian, H. Hadadzadeh, *J. Solid State Electrochem.* **2009**, *13*, 485.
- [71] T. Tzedakis, C. Kane, J. Roche, S. K. Groenen, O. Reynes, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 2286.
- [72] H. S. Kang, B. K. Na, D. H. Park, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1277.
- [73] A. A. Karyakin, O. A. Bobrova, E. E. Karyakina, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *399*, 179.
- [74] Y. Okamoto, T. Kaku, R. Shundo, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1417.
- [75] J. Canivet, G. Süß-Fink, P. Štěpnička, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4736.
- [76] F. Hildebrand, C. Kohlmann, A. Franz, S. Lütz, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 909.
- [77] E. Steckhan, S. Herrmann, R. Ruppert, E. Dietz, M. Frede, E. Spika, *Organometallics* **1991**, *10*, 1568.
- [78] D. Westerhausen, S. Herrmann, W. Hummel, E. Steckhan, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1496.
- [79] D. Westerhausen, S. Herrmann, W. Hummel, E. Steckhan, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1529.
- [80] Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 483.
- [81] P. S. Wagenknecht, J. M. Penney, R. T. Hembre, *Organometallics* **2003**, *22*, 1180.
- [82] J. H. van Esch, M. A. M. Hoffmann, R. J. M. Nolte, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1599.
- [83] H. C. Lo, O. Buriez, J. B. Kerr, R. H. Fish, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1524.
- [84] H. C. Lo, O. Buriez, J. B. Kerr, R. H. Fish, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1429.
- [85] H. C. Lo, C. Leiva, O. Buriez, J. B. Kerr, M. M. Olmstead, R. H. Fish, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6705.
- [86] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1150.
- [87] F. Hollmann, B. Witholt, A. Schmid, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 167.
- [88] M. M. Grau, M. Poizat, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Appl. Organomet. Chem.* **2010**, *24*, 380.

- [89] U. Kölle, H. Fränzl, *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 1321.
- [90] F. Hollmann, A. Kleeb, K. Otto, A. Schmid, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3512.
- [91] S. H. Lee, D. H. Nam, J. H. Kim, J.-O. Baeg, C. B. Park, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1621.
- [92] S. H. Lee, D. H. Nam, C. B. Park, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2589.
- [93] D. H. Nam, C. B. Park, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1278.
- [94] W. A. van der Donk, H. Zhao, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 421.
- [95] Y.-W. Zhang, M. K. Tiwari, H. Gao, S. S. Dhiman, M. Jeya, J.-K. Lee, *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *50*, 255.
- [96] I. Schröder, Dissertation, Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie **2003**.
- [97] L. Greiner, Dissertation, Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie **2003**.
- [98] M. D. Leonida, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 345.
- [99] G. L. Lemièrè, J. A. Lepoivre, F. C. Alderweireldt, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4527.
- [100] A. Huwig, S. Emmel, G. Jäkel, F. Griffhorn, *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 337.
- [101] S. Kochius, A. O. Magnusson, F. Hollmann, J. Schrader, D. Holtmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 2251.
- [102] C.-H. Wong, S. D. McCurry, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7938.
- [103] C.-H. Wong, R. J. Matos, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1992.
- [104] L. G. Lee, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 25.
- [105] G. Carrea, R. Bovara, P. Cremonesi, R. Lodi, *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 560.
- [106] G. Carrea, R. Bovara, R. Longhi, S. Riva, *Enzyme Microb. Technol.* **1985**, *7*, 597.
- [107] S. Aksu, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *2009*, 1211.
- [108] J. R. Matos, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2388.
- [109] M. D. Bednarski, H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1283.
- [110] H. C. Chenault, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 400.
- [111] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6*, 221.
- [112] J. W. Burgner, II, W. R. Ray, Jr., *Biochemistry* **1984**, *23*, 3626.
- [113] J. W. Burgner, II, W. R. Ray, Jr., *Biochemistry* **1984**, *23*, 3636.
- [114] J. H. Griffin, R. S. Criddle, *Biochemistry* **1970**, *9*, 1195.
- [115] E. Fossati, F. Polentini, G. Carrea, S. Riva, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *93*, 1216.
- [116] S. Riva, R. Bovara, P. Pasta, G. Carrea, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2902.

- [117] I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155.
- [118] M. Higuchi, Y. Yamamoto, L. B. Poole, M. Shimada, Y. Sato, N. Takahashi, Y. Kamio, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5940.
- [119] L. B. Poole, M. Higuchi, M. Shimada, M. L. Calzi, Y. Kamio, *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 108.
- [120] C. Leitner, W. Neuhauser, J. Volc, K. D. Kulbe, B. Nidetzky, D. Haltrich, *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 365.
- [121] W. V. Hecke, C. Salaheddin, R. Ludwig, J. Dewulf, D. Haltrich, H. V. Langenhove, *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 5566.
- [122] H. Gao, M. K. Tiwari, Y. C. Kang, J.-K. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1931.
- [123] J. Rocha-Martín, D. Vega, J. M. Bolivar, C. A. Godoy, A. Hidalgo, J. Berenguer, J. M. Guisán, F. López-Gallego, *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 101.
- [124] P. Ödman, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2933.
- [125] J.-i. Hirano, H. Ohta, S. Yoshida, K. Miyamoto, Cofactor Recycling Using a Thermostable NADH Oxidase, Chemical Biology, Prof. Deniz Ekinci (Ed.), **2012**.
- [126] E. E. Ferrandi, D. Monti, I. Patel, R. Kittl, D. Haltrich, S. Riva, R. Ludwig, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2821.
- [127] R. Jiang, A. S. Bommarius, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2939.
- [128] X. Wu, H. Kobori, I. Orita, C. Zhang, T. Imanaka, X.-H. Xing, T. Fukui, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 53.
- [129] A. Fassouane, J.-M. Laval, J. Moiroux, C. Bourdillon, *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *35*, 935.
- [130] A.-E. Biade, C. Bourdillon, J.-M. Laval, G. Mairesse, J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 893.
- [131] A. Anne, C. Bourdillon, S. Daninos, J. Moiroux, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *64*, 101.
- [132] C. Degrand, L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5728.
- [133] A. S. N. Murthy, J. Sharma, *Talanta* **1998**, *45*, 951.
- [134] S. I. Bailey, I. M. Ritchie, *Electrochim. Acta* **1985**, *30*, 3.
- [135] H. R. Zare, S. M. Golabi, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464*, 14.
- [136] H. R. Zare, S. M. Golabi, *J. Solid State Electrochem.* **2000**, *4*, 87.
- [137] G. Hilt, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1706.

- [138] J. Komoschinski, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3299.
- [139] C. R. Raj, T. Ohsaka, *Electrochem. Commun.* **2001**, 3, 633.
- [140] J. M. Obón, P. Casanova, A. Manjón, V. M. Fernández, J. L. Iborra, *Biotechnol. Prog.* **1997**, 13, 557.
- [141] W. B. Nowall, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3583.
- [142] G. Hilt, T. Jarbawi, W. R. Heineman, E. Steckhan, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 79.
- [143] H. Ju, D. Leech, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 345, 51.
- [144] A. Malinauskas, T. Ruzgas, L. Gorton, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 224, 325.
- [145] M. Sadakane, E. Steckhan, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 219.
- [146] N. F. Atta, A. Galal, A. E. Karagözler, H. Zimmer, H. F. Rubinson, H. B. Mark, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1347.
- [147] D. Degenring, I. Schröder, C. Wandrey, A. Liese, L. Greiner, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, 8, 213.
- [148] S. Itoh, H. Fukushima, M. Komatsu, Y. Ohshiro, *Chem. Lett.* **1992**, 21, 1583.
- [149] S. Itoh, T. Terasaka, M. Matsumiya, M. Komatsu, Y. Ohshiro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 3253.
- [150] Y. Kashiwagi, T. Osa, *Chem. Lett.* **1993**, 22, 677.
- [151] J. B. Jones, K. E. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 205.
- [152] A. J. Irwin, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 556.
- [153] A. J. Irwin, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 1625.
- [154] K. P. Lok, I. J. Jakovac, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 2521.
- [155] I. J. Jakovac, H. B. Goodbrand, K. P. Lok, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4659.
- [156] V. Höllrigl, F. Hollmann, A. C. Kleeb, K. Buehler, A. Schmid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 81, 263.
- [157] J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 1412.
- [158] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauser, M. Kessler, R. Sturmer, T. Zelinski, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 788.
- [159] H. Gröger, F. Chamouleau, N. Orologas, C. Rollmann, K. Drauz, W. Hummel, A. Weckbecker, O. May, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 5677.
- [160] U. Kragl, W. Kruse, W. Hummel, C. Wandrey, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 52, 309.
- [161] C. Kohlmann, W. Märkle, S. Lütz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 51, 57.

- [162] S. Eigler, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Organische Chemie **2006**.
- [163] K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, *The Porphyrin Handbook*, 1-10, Academic Press, New York, **2000**.
- [164] K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, *The Porphyrin Handbook*, 11-20, Academic Press, New York, **2003**.
- [165] E. Rose, B. Andreatti, S. Zrig, M. Quelquejeu-Ethève, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 573.
- [166] E. B. Fleischer, J. M. Palmer, T. S. Srivastava, A. Chatterjee, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162.
- [167] J. R. Sutter, P. Hambright, P. B. Chock, M. Krishnamurthy, *Inorg. Chem.* **1974**, *13*, 2764.
- [168] M. A. Ivanca, A. G. Lappin, W. R. Scheidt, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 711.
- [169] A. A. El-Awady, P. C. Wilkins, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2053.
- [170] V. T. Taniguchi, Ph.D. Thesis, University of California, Irvine **1978**.
- [171] I. J. Ostrich, G. Liu, H. W. Dodgen, J. P. Hunt, *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 619.
- [172] T. Schnepf, A. Zahl, R. van Eldik, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1678.
- [173] C.-M. Che, J.-S. Huang, *Chem. Commun.* **2009**, 3996.
- [174] G. Lente, I. Fábián, *Dalton Trans.* **2007**, 4268.
- [175] G. Labat, J.-L. Seris, B. Meunier, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1488.
- [176] G. Labat, J.-L. Seris, B. Meunier, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1471.
- [177] C. Crestini, P. Tagliatesta, in: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, 11, Academic Press, New York, **2003**.
- [178] G. Labat, B. Meunier, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5008.
- [179] B. Meunier, R. Belal, A. Momenteau, G. Labat, *La Chimica & L'Industria* **1990**, *72*, 433.
- [180] I. Artraud, K. Ben-Aziza, D. Mansuy, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3373.
- [181] J. Bernadou, M. Bonnafous, G. Labat, P. Loiseau, B. Meunier, *Drug Metab. Dispos.* **1991**, *19*, 360.
- [182] O. Vakuliuk, F. G. Mutti, M. Lara, D. T. Gryko, W. Kroutil, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3555.
- [183] F. G. Mutti, M. Lara, M. Kroutil, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 14142.
- [184] Q.-Z. Ren, Y. Yao, X.-J. Ding, Z.-S. Hou, D.-Y. Yan, *Chem. Commun.* **2009**, 4732.

- [185] B. Meunier, A. Robert, G. Pratviel, J. Bernadou, in: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, 4, Academic Press, New York, **2000**.
- [186] M. R. Nabid, M. Shamsianpour, R. Sedghi, S. Osati, N. Safari, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2010**, 14, 129.
- [187] V. Rumbau, J. A. Pomposa, A. Eleta, J. Rodriguez, H. Grande, D. Mecerreyes, E. Ochoteco, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 315.
- [188] S. Masoudian, H. Yahyaei, *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Phys., Theor. Anal.* **2011**, 50, 1002.
- [189] H. Maid, H. Gröger, unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Erlangen-Nürnberg.
- [190] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2005**.
- [191] S. M. Huber, W. Bauer, H. Gröger, unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Erlangen-Nürnberg.
- [192] Der produktbezogene Umsatz gibt an, wieviel Edukt (in %) zum entsprechenden Produkt umgesetzt wird und schließt dabei eventuell gebildete Nebenprodukte aus.
- [193] H. Maid, S. Huber, P. Böhm, H. Gröger, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [194] R. Rahimi, S. Z. Ghoreishi, M. G. Dekamin, *Monatsh. Chem.* **2012**, 143, 1031.
- [195] K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 231.
- [196] C. J. Jeffrey, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 8.
- [197] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 91.
- [198] G. Lente, J. H. Espenson, *Int. J. Chem. Kinet.* **2004**, 36, 449.
- [199] W. Bauer, Department Chemie und Pharmazie Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 42, 91054 Erlangen (Deutschland)
- [200] S. Schramm, *Nicht-statistische Isotopenverteilung in Naturstoffen: Anwendungen zu Fragen von Nahrung und Ernährung und Erprobung der quantitativen ¹³C-, ¹⁷O-NMR-Spektroskopie als neues Meßverfahren*, Zugl. Dissertation, Herbert Utz Verlag, München, **1999**.
- [201] *Die vollständige Bruttoreaktionsgleichung ist in Schema 46, Kapitel 4.3.4 angegeben.*
- [202] J. Hagen, *Industrial Catalysis: A Practical Approach*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH, **2006**.
- [203] *Das Bestimmtheitsmaß (auch Determinationskoeffizient) ist eine Maßzahl, welche eine Aussage über die Abweichungen der tatsächlichen Beobachtungen der*

Regressionshyperebene zulässt. Mit Hilfe des Bestimmtheitsmaßes ist es möglich zu beurteilen welcher Funktionstyp besser mit einer gegebenen Punktwolke übereinstimmt.

- [204] H. Motulsky, A. Christopoulos, *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*, Oxford University Press, New York, **2004**.
- [205] W. Assenmacher, *Einführung in die Ökonometrie*, 6. Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, **2002**.
- [206] L. Fahrmeir, T. Kneib, S. Lang, *Regression - Modelle, Methoden und Anwendungen*, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [207] J. Hallbach, *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2006**.
- [208] G. Richter, *Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**.
- [209] M. Hübel, M. Büchli, C. Dandois, V. Definti, R. Müller, J. Saner, *Laborpraxis*, 5. Auflage, Band 4, Springer Verlag, Basel, **2005**.
- [210] B. Meunier, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1411.
- [211] G. McLendon, M. Bailey, *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 2120.
- [212] M. F. Zippies, W. A. Lee, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4433.
- [213] K. Kano, H. Kitagishi, S. Tamura, A. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202.
- [214] J.-i. Setsune, Y. Ishimaru, A. Sera, *Chem. Lett.* **1992**, 377.
- [215] L. Que, Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 643.
- [216] L. Que, Jr., W. B. Tolman, *Nature* **2008**, *455*, 333.
- [217] I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, R. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko, S. G. Sligar, *Science* **2000**, *287*, 1615.
- [218] I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar, I. Schlichting, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253.
- [219] Y. J. Jeong, Y. Kang, A.-R. Han, Y.-M. Lee, H. Kotani, S. Fukuzumi, W. Nam, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 7321.
- [220] H. Maid, P. Böhm, S. M. Huber, W. Bauer, W. Hummel, N. Jux, H. Gröger, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2445.
- [221] H. Maid, P. Böhm, S. M. Huber, W. Bauer, W. Hummel, N. Jux, H. Gröger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2397.

- [222] E. Burda, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Organische Chemie **2010**.
- [223] J.-E. Jee, S. Eigler, N. Jux, A. Zahl, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3336.
- [224] M. Speck, Department Chemie und Pharmazie Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 42, 91054 Erlangen (Deutschland)
- [225] M. Gouterman, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1139.
- [226] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*, Spektral Database for Organic Compounds SDBS: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.
- [227] C. J. Charles, J. Behnke, *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra*, Vol. 1, Aldrich Chemical: Milwaukee, **1993**.
- [228] M. Hlaïbi, M. Hor, M. Riri, A. Benjjar, J.-F. Verchère, *J. Mol. Struct.* **2009**, *920*, 310.
- [229] F. Malz, Dissertation, Berlin, Humboldt-Universität **2003**.
- [230] J. Cossy, N. Furet, S. BouzBouz, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11751.
- [231] G. Ragagnin, B. Betzemeier, S. Quici, P. Knochel, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3985.
- [232] G. Urgoitia, R. SanMartin, M. T. Herrero, E. Dominguez, *Green Chemistry* **2011**, *13*, 2161.
- [233] *Die rekombinante, in E. coli überexprimierte (S)-ADH aus Rhodococcus sp. wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner Hummel entwickelt und ist bei evocatal GmbH, Merowinger Platz 1a, 40225 Düsseldorf (Internet: <http://www.evocatal.com>) unter der Produktnummer 1.1.030 erhältlich.*

10 Abkürzungsverzeichnis

7 α -HSDH	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
12 α -HSDH	12 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADH evo-200	Alkohol-Dehydrogenase 200 von Evocatal
AMAPORS	engl.: " <u>artificial mediator accepting pyridin-nucleotide oxidoreductases</u> "
C _p	Enzymkonzentration der Probe / mg mL ⁻¹
d	Küvettendicke / cm
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient für NAD(P)H / mL ($\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$) ⁻¹
EC-Nummer	engl.: " <u>Enzyme Commission number</u> ", numerisches Klassifikationssystem für Enzyme
ee-Wert	engl.: " <u>enantiomeric excess</u> ", Enantiomerenüberschuss
f	Probenverdünnungsfaktor
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FeTSPP	5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid
FID	engl.: " <u>free induction decay</u> "
FMN	<u>Flavinmononucleotid</u>
FMNH ₂	reduzierte Form von FMN
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucose-Dehydrogenase
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
H ₂ TSPP	5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-21,23H-porphyrin
HL-ADH (iso E)	Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber, ADH evo-210 von Evocatal

HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> “), Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie
LeuDH	Leucin-Dehydrogenase
Lk-ADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
MB	Meldolablauf
MnTSPP	5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Mn(III)- acetat
NAD(P)H	Nicotinsäureamidadenindinukleotid und Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Formen)
NADH-Oxidase	Nicotinsäureamidadenindinukleotid-Oxidase
NAD(P) ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotid und Nicotinsäureamid- adenindinukleotidphosphat (oxidierte Formen)
NHE	engl.: „ <i>normal hydrogen electrode</i> “, Normalwasserstoffelektrode
NMR	engl.: „ <i>nuclear magnetic resonance</i> “, magnetische Kernresonanz
PdTSPP	5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Pd(II)
PTDH	Phosphit-Dehydrogenase
Rel. Aktivität	Relative Aktivität / %
Rsp-ADH:	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Rhodococcus species</i>
SCE	engl.: „ <i>Saturated Calomel Electrode</i> “, gesättigte Kalomelelektrode (GKE)
Spez. Aktivität	Spezifische Aktivität / U mg ⁻¹
TADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Thermus sp. ATN1</i>
TOF	engl.: „ <i>turnover frequency</i> “, Umsatzfrequenz
TON	engl.: „ <i>turnover number</i> “, Wechselzahl
t _R	Retentionszeit für das (R)-Enantiomer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t _S	Retentionszeit für das (S)-Enantiomer
TSPP	5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin

TTN	engl.: „ <i>total turnover number</i> “, Summe der Wechselzahlen
U	Units
V_g	Gesamtprobenvolumen / mL
V_p	Probenvolumen / mL
Vol. Aktivität	Volumetrische Aktivität / U mL ⁻¹
KHSO ₅	Kaliummonopersulfat